

UNIVERSITÉ DE LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

THÈSE N°

**Cas groupés de salmonelloses à *Salmonella* Montevideo :
Epidémiologie et caractérisation des supports génétiques
de résistance aux antibiotiques**

Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Tenant lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 03 octobre 2014 à Limoges

par

Violaine WALEWSKI

Née le 24 avril 1986, à Montluçon

Membres du jury :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ..... Président

Mme le Professeur Christiane FORESTIER Juge

Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY..... Juge

M. le Docteur Simon LE HELLO..... Juge

M. le Docteur Olivier BARRAUD Directeur de Thèse

Mme le Docteur Alice ROUX Membre invité

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

THÈSE N°

<p>Cas groupés de salmonelloses à <i>Salmonella</i> Montevideo : Epidémiologie et caractérisation des supports génétiques de résistance aux antibiotiques</p>

Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Tenant lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 03 octobre 2014 à Limoges

par

Violaine WALEWSKI

Née le 24 avril 1986, à Montluçon

Membres du jury :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ..... Président

Mme le Professeur Christiane FORESTIER Juge

Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY..... Juge

M. le Docteur Simon LE HELLO..... Juge

M. le Docteur Olivier BARRAUD Directeur de Thèse

Mme le Docteur Alice ROUXMembre invité

DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNÈRE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur le Professeur Serge **BATTU**

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
DESMOULIÈRE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS ÉMÉRITES DES UNIVERSITÉS

CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHÂTRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIÈNE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES : (en détachement)

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
-----------------------	---------------

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNÈRE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LÉGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

SIMON Alain

CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE

TROUILLAS Patrick

BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET
INFORMATIQUE

VIGNOLES Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET
INFORMATIQUE

PROFESSEUR de LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël

ANGLAIS

ATTACHÉ TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

MAMMARI Nour (1/10/13 au 31/08/14)

MICROBIOLOGIE

VEDRENNE Nicolas (1/11/13 au 31/08/14)

CHIMIE ANALYTIQUE

Remerciements

A Madame le Professeur Sylvie Rogez, de me faire l'honneur de présider ce jury. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de mon internat à Limoges, veuillez trouver l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy, de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Merci de m'avoir transmis votre savoir et d'avoir cru en moi. Votre confiance et votre estime me sont chères, j'espère ne jamais vous décevoir.

A Madame le Professeur Christiane Forestier, sans qui je ne soutiendrais probablement pas une thèse de bactériologie aujourd'hui. Je garde un très bon souvenir de mes cours de 3^e année et de mon stage de master au sein de votre unité. Merci de m'avoir fait découvrir la microbiologie, veuillez trouver en cette thèse l'expression de toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Simon Le Hello, pour tout le travail et l'aide apportés à cette étude. Merci pour votre sympathie lors de nos différents échanges et de me faire l'honneur de juger ce travail.

A Madame le Docteur Alice Roux, d'avoir accepté de juger ce travail. Croyez en mes plus sincères remerciements.

A Olivier, par où commencer ? Pour ton enseignement journalier à la paillasse depuis le début, pour tes précieux conseils tout au long de ma formation de biologiste en herbe, pour nos soirées parisiennes de Master 2 et pour les dizaines de cafés ratés de l'internat. Merci de m'avoir confié ce travail, je ne te remercierai jamais assez de ta disponibilité, de ta patience et de ces longues heures passées à analyser les séquences. Tu es le moteur de ce travail. J'espère être un jour aussi compétente que toi, trouve dans ce travail l'expression de ma sincère admiration.

Merci à la team NGS, Emilie G. pour ton aide et ta patience pour les manips et Rémi, pour l'énorme travail d'analyse des données générées, pour ta gentillesse et le temps que tu m'as accordé.

Merci aux membres de l'unité UMR Inserm1092 pour leurs conseils avisés et leur sympathie. Merci à Benjamin pour la colocation (forcée !) de tiroir, pour ton aide et ta bonne humeur.

Je remercie l'ensemble des biologistes, techniciens, ainsi que l'ensemble du personnel des services de Biochimie, Hématologie, Bactériologie-Virologie-Hygiène et Parasitologie de Limoges, du laboratoire de microbiologie de l'HEGP pour leur participation active à ma formation professionnelle.

Un grand big up aux techniciennes (et au technicien) du laboratoire de bactériologie pour m'avoir supportée moi et mes chansons pendant 2 ans (Bingo, bingo, on est les meilleurs !).

Merci à tous mes cointernes, particulièrement Ana, Coralie, Jasmine, Laure, Marion (pas une vraie, mais une cointerne de cœur), Sandra, Thomas et Yamen, d'avoir fait de mon internat une grande partie de rigolade ! Merci aux Limougeauds d'origine ou d'adoption d'avoir rendu ces 4 années à Limoges inoubliables ! Une pensée pour tous ceux qui ont été là pendant ces 10 longues années d'études, Jean Simon, Sophie, Thomas, Sarah, Elodie, Maxime, Pierre, Guillaume, Nicolas, Stéphanie, Lucas... et pour les nouveaux copains parisiens qui m'attendent !

A Cécile (et à Clément !) d'être là depuis le début de toute cette histoire, de ton accueil, de tes encouragements, de tes « je comprends pas », de ton amitié tout simplement.

A ma famille pour votre soutien, parce qu'aujourd'hui je peux enfin vous dire que j'ai fini mes études (ou presque) !

A Paulin, merci d'être mon canard et de rendre ma vie si belle.

A mes parents, de m'avoir soutenue pendant ces longues années d'étude. Merci de tous ces sacrifices pour en arriver là, de m'avoir rassurée, protégée et stimulée pendant toutes ces années. Maman, ma réussite est la tienne.

Sommaire

Remerciements	7
Abréviations	14
Préambule.....	15
Introduction	16
1. Les salmonelles	17
1.1 Historique et taxonomie.....	17
1.2 Identification et sous-typage des salmonelles.....	18
1.2 Réservoir	20
1.3 Contamination.....	20
1.4 Physiopathologie.....	21
1.5 Tableau clinique et impact médico-économique de la maladie.....	22
1.6 Epidémiologie	23
1.7 Traitement	26
1.8 Résistance aux antibiotiques des SNT	26
1.9 <i>Salmonella</i> Montevideo	29
2. Les intégrons	31
2.1 Structure.....	31
2.2 Dynamique d'échange des cassettes	36
2.3 Expression des gènes de cassettes.....	38
2.4 Epidémiologie des intégrons.....	39
Matériels et Méthodes	42
1. Souches étudiées	43
2. Antibiogramme.....	44
3. Extraction d'ADN	44
4. PCR en temps réel triplex intégron	45

5. PCR en point final	45
6. Séquençage classique méthode Sanger	45
7. Séquençage haut débit	45
7.1 Préambule	46
7.2 Protocole	46
8. Analyses effectuées par le CNR.....	53
8.1. Comparaison des souches par PFGE	53
8.2. Caractérisation des plasmides	53
8.3. Détermination du type CRISPR.....	53
Résultats	54
1. Description de l'épidémie	55
2. Clonalité des souches de <i>Salmonella</i> Montevideo	57
2.1 PFGE.....	57
2.2 MLST.....	58
2.3 Analyse des CRISPR	58
2.4 Comparaison des génomes de Lo et D.....	60
3. Sensibilité aux antibiotiques.....	61
4. Caractérisation des supports génétiques de la résistance	62
4.1 qPCR intégron.....	62
4.2 Gènes de résistance	63
5. Détermination du plasmide	75
5.1 Résultats CNR.....	75
5.2 Résultats du séquençage haut débit (NGS).....	76
Discussion	77
Conclusions	85
Références	87
Annexes.....	96

Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique des différents antigènes déterminant le sérotype de <i>Salmonella</i> spp.	17
Figure 2 : Structures du système CRISPR/ <i>cas</i> de différentes souches de <i>S. enterica</i> et <i>S. bongori</i>	20
Figure 3 : Physiopathologie des infections entériques à <i>Salmonella</i>	22
Figure 4 : Répartition mondiale des sérotypes de <i>Salmonella</i> selon une étude multicentrique avec 1,5 million de cas humains et 360 000 non humains entre 1995 et 2008	24
Figure 5 : Pourcentage des isolats non humains de <i>Salmonella</i> Montevideo, entre 1968 et 2011 aux Etats-Unis, rapportés par les laboratoires des services vétérinaires américains.....	29
Figure 6 : Structure schématique d'un intégron.....	31
Figure 7 : Structure des sites <i>attI</i>	33
Figure 8 : Structure schématique d'une cassette	34
Figure 9 : Structure d'une cassette et d'un site de recombinaison <i>attC</i>	35
Figure 10 : Structure schématique d'un intégron complexe	36
Figure 11 : Mécanisme d'insertion et d'excision des cassettes.....	37
Figure 12 : Mécanisme d'intégration des cassettes au niveau du site <i>attI</i>	37
Figure 13 : Régulation de l'expression de l'intégrase <i>IntI</i> par <i>LexA</i>	39
Figure 14 : Protocole de construction d'une librairie d'ADN	47
Figure 15 : Principe de la PCR émulsion	48
Figure 16 : Principe de l'enrichissement en ISP.....	49
Figure 17 : Réaction d'incorporation d'un nucléotide par la polymérase	49
Figure 18 : Principe du IonProton™	50
Figure 19 : Principe et processus du séquençage sur Ion Proton	51
Figure 20 : Principe de l'alignement de novo	52
Figure 21 : Principe de l'alignement <i>mapping</i> contre un génome de référence	52
Figure 22 : Synoptique des hospitalisations des cas positifs de <i>Salmonella</i> Montevideo au sein de l'unité Mère-enfant.....	56
Figure 23 : Profil PFGE de 19 souches de <i>S. Montevideo</i> de l'épidémie "Limoges"	57
Figure 24 : Alignement des génomes Lo, D et CP007530 (<i>Mauve algorithm</i>).....	60
Figure 25 : Intégron de la souche C1	65
Figure 26 : Intégron et gènes de résistance retrouvés chez la souche C2	66
Figure 27 : Intégron de la souche E.....	67

Figure 28 : Intégrons et gènes de résistance retrouvés chez la souche A11	69
Figure 29 : Intégron et gènes de résistance retrouvés chez la souche A12	70
Figure 30 : Intégrons et gènes de résistance retrouvés chez la souche C3	71
Figure 31 : Intégron et gènes de résistance retrouvés chez la souche Ai1	73
Figure 32 : Intégrons et gènes de résistance hébergés par Ai2	74
Figure 33 : Analyse des plasmides extraits des souches C3, A11 et de leurs transconjugants respectifs.....	75
Figure 34 : Alignement du plasmide de C1 à 3 plasmides d' <i>E. cloacae</i> (<i>Mauve algorithme</i>).	76

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre de sérotypes pour chaque sous espèce, selon Grimont <i>et al.</i>	18
Tableau 2 : Formules antigéniques de quelques sérotypes de <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	18
Tableau 3 : Répartition des 20 principaux sérotypes de <i>Salmonella</i> en 2000, 2005, 2009-2011, 2013 en France	25
Tableau 4 : Incidence des souches résistantes aux C3G et de sensibilité diminuées aux quinolones dans plusieurs états	27
Tableau 5 : Profils de résistance des souches de <i>Salmonella</i> Montevideo envoyées au CNR de 2011 à 2013	30
Tableau 6 : Principaux gènes de résistance décrits dans des cassettes.....	34
Tableau 7 : Souches de <i>Salmonella</i> Montevideo isolée à partir des coprocultures de patients	43
Tableau 8 : Souches d'entérobactéries BLSE isolées de coprocultures et de l'environnement	44
Tableau 9 : Composition des <i>loci</i> CRISPR 1 et 2 de 8 souches de <i>S. Montevideo</i>	59
Tableau 10 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des salmonelles	61
Tableau 11 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries multirésistantes.....	62
Tableau 12 : Gènes de résistance mis en évidence pour chaque souche de salmonelles et famille d'antibiotiques	63
Tableau 13 : Gènes de résistances mis en évidence dans les entérobactéries BLSE	63
Tableau 14 : Phénotypes de résistance et gènes de résistance mis en évidence pour les souches C3, A11 et leurs transconjugants	75

Abréviations

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
Ag	:	Antigène
ANSES	:	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
BGN	:	Bacille à Gram négatif
BLSE	:	Béta-lactamase à spectre étendu
C3G	:	Céphalosporine de 3 ^e génération
CH	:	Centre hospitalier
CNR-ESS	:	Centre Nationale de Référence - <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> et <i>Salmonella</i>
CRISPR	:	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CS	:	<i>Conserved Segment</i>
dNTP	:	Désoxyribonnucléotide triphosphate
DR	:	<i>Direct repeat</i>
IR	:	Intégron de résistance
IS	:	<i>Insertion sequence</i>
ISCR	:	<i>Insertion Sequence Common Region</i>
ISP	:	<i>Ion Sphere Particle</i>
LPS	:	Lipopolysaccharide
MLST	:	<i>MultiLocus sequence typing</i>
MALDI-TOF	:	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight</i>
NGS	:	<i>Next-Generation Sequencing</i>
Orf	:	<i>Open reading frame</i> (cadre de lecture ouvert)
Pb	:	Paire de bases
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	:	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
SGI	:	<i>Salmonella Genomic Island</i>
SNP	:	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNT	:	<i>Salmonella non typhique</i>

Préambule

Les salmonelles sont l'une des premières causes de gastro-entérites bactériennes dans le monde et sont responsables d'une importante mortalité infantile. Depuis le début des années 1990, l'isolement de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques a considérablement augmenté, compromettant l'efficacité des traitements.

Entre 2011 et 2013, 20 souches de *Salmonella enterica subspecies enterica* sérotype Montevideo ont été isolées à partir de selles de 14 enfants de moins de 1 an, hospitalisés dans une même unité Mère-enfant d'un Centre Hospitalier. Certaines de ces souches étaient caractérisées par leur multirésistance aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines et/ou aux quinolones, molécules de choix dans le traitement des salmonelloses. Malgré leur différence de sensibilité aux antibiotiques, la clonalité de ces souches a été démontrée *via* une analyse de leur génome par électrophorèse en champ pulsé réalisée par le Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris).

Différents éléments génétiques mobiles sont impliqués dans l'évolution de la résistance des salmonelles. A côté des plasmides et des transposons, les intégrons, initialement décrits à la fin des années 1980, permettent la capture et l'expression de gènes sous forme de cassettes. Ils jouent un rôle majeur dans la résistance aux antibiotiques, notamment chez les bactéries à Gram négatif.

Nous décrivons ici une épidémie nosocomiale à *Salmonella* Montevideo multirésistante aux antibiotiques. Les objectifs de ce travail étaient (i) de réaliser un bilan épidémiologique de cette épidémie, (ii) d'affirmer la clonalité des souches isolées et (iii) d'identifier les supports génétiques de la résistance en se focalisant sur la caractérisation des intégrons de résistance hébergés par ces souches.

Introduction

1. Les salmonelles

1.1 Historique et taxonomie

Le nom du genre *Salmonella* fut attribué en 1900, en l'honneur du chercheur et vétérinaire Daniel Elmer Salmon ayant fait la découverte en collaboration avec Theobald Smith en 1885 du bacille responsable du choléra du porc (*Salmonella Choleraesuis*). Toutefois, la découverte de *Salmonella* Typhi revient à Karl Joseph Eberth en 1880, qui met en évidence le bacille d'Eberth sur des coupes de rate et de ganglions lymphatiques d'un malade mort de la fièvre typhoïde. En 1896, Fernand Widal met en évidence la diversité antigénique des souches de salmonelles.

Les bactéries *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif (BGN) usuellement mobiles appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (phylum γ Proteobacteria). En 2005, des études d'hybridation ADN-ADN ont modifié la taxonomie moléculaire et ont permis de distinguer deux espèces: *Salmonella bongori*, exceptionnellement isolée chez l'homme et l'espèce majoritaire, *Salmonella enterica* (1). Cette dernière est divisée en 6 sous-espèces sur la base de critères phénotypiques : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica*. Chacune de ces sous-espèces se divise en sérovars ou sérotypes, définis selon les antigènes somatiques du lipopolysaccharide (LPS) ou Ag O, les antigènes flagellaires ou Ag H (mono ou diphasiques) et les antigènes de capsule ou Ag Vi (Fig.1).

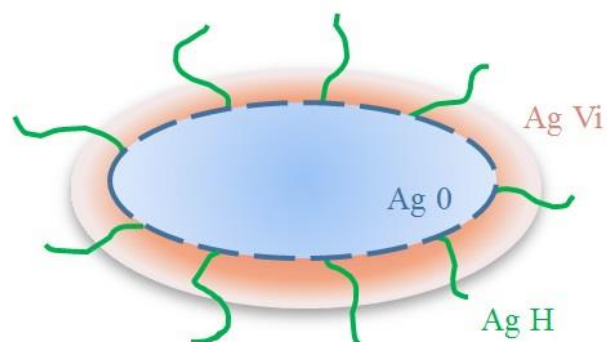


Figure 1 : Représentation schématique des différents antigènes déterminant le sérotype de *Salmonella* spp. Antigène O somatique, Antigène H flagellaire, Antigène Vi capsulaire.

Il existe actuellement plus de 2500 sérotypes dont les formules antigéniques sont décrites dans le schéma de Kaufmann-White-Le Minor (2). Ceux appartenant à la sous-espèce *enterica* sont

affectés d'un nom correspondant fréquemment à un lieu géographique, les autres sont désignés par leur formule antigénique (Tab.1 et 2).

Tableau 1 : Nombre de sérotypes pour chaque sous espèce, selon Grimont *et al.* (2)

Espèce	Sous-espèce	Nombre de sérotypes
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1531
	<i>salamae</i> (II)	505
	<i>arizonae</i> (IIIa)	99
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	336
	<i>houtenae</i> (IV)	73
	<i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i> (V)	-	22
Total		2579

On distingue 4 sérotypes dits « majeurs » strictement humains, responsables des fièvres typhoïde (*S. Typhi*) et paratyphoïde (*S. Paratyphi* A, B et C). Les autres sérovars dits « mineurs » sont encore appelés *Salmonella* non typhiques (SNT).

Tableau 2 : Formules antigéniques de quelques sérotypes de *Salmonella enterica subsp. enterica*
 _ : caractère déterminé par la conversion phagique ; { } : Ag O exclusif, les facteurs mentionnés ne peuvent coexister avec d'autres facteurs présents dans les autres accolades ; [] : caractère à déterminisme chromosomique, présent ou absent sans relation avec une conversion phagique

Sérotype	Ag 0	Ag H Phase1	Ag H Phase2	Autre
Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2	
Enteritidis	1,9,12	g,m	-	
Paratyphi A	1,2,12	a	[1,5]	
Abortusovis	4,12	c	1,6	
Typhi	9,12[Vi]	d	-	[j],[z66]
Montevideo	{6,7,14}{54}	g,m,s	-	

1.2 Identification et sous-typage des salmonelles

Usuellement, l'identification de l'espèce est réalisée selon les caractères biochimiques ou par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight*). L'identification du sérotype est assurée grâce à des antisérums poly et monovalents dirigés contre les différents antigènes O, H et Vi. Cependant cette technique ne permet pas de différencier les souches épidémiques ou clonales au sein d'un même sérotype.

Plusieurs techniques ont été développées pour le sous-typage des salmonelles notamment lors de contextes épidémiques. Initialement, le « phage typing », basé sur la sensibilité de certaines souches à des suspensions de bactériophages a largement été utilisé puis des méthodes basées sur l'analyse de l'ADN ont été développées.

L'analyse du polymorphisme de segments d'ADN après restriction enzymatique par électrophorèse en champs pulsé (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) est aujourd'hui le *gold standard* dans les études épidémiologiques des salmonelloses malgré sa lourdeur technique.

Des techniques alternatives de sous-typage moléculaire ont alors été appliquées notamment la technique MLVA (*MultiLocus Variable number of tandem repeat Analysis*) basée sur le nombre de séquences répétées contiguës présentes dans plusieurs *loci* ou la technique MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) basée sur l'analyse de 7 gènes de ménages hautement conservés au sein des espèces. Considérée comme peu discriminante pour les sérotypes très répandus, de nombreuses équipes ont proposé son association à l'analyse de gènes de virulence (*spaM*, *hilA*) ou de gènes fimbriaux (*pefB*, *fimH*) ou flagellaires (*fliC*, *fliB*) pour augmenter sa sensibilité (3).

Plus récemment, le polymorphisme des « *spacers* » des séquences CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) a été utilisé pour typer les salmonelles (4). Les CRISPR sont caractérisés par des séquences répétées directes (DRs *Direct Repeats*) de 27 à 47 paires de bases (pb) séparées par des séquences variables de 21 à 72 pb, appelées « *spacers* ». Une séquence dite « *leader* » et des gènes *cas* (CRISPR-associated sequence) sont souvent identifiés à proximité d'un *locus* CRISPR. Les séquences « *spacers* » intégrées correspondent aux dérivés d'ADN exogène issus des phages ou des plasmides (Fig.2). Les CRISPR semblent conférer une résistance à de l'ADN exogène ressemblant aux séquences exogènes déjà rencontrées (5). Deux *loci* CRISPR sont retrouvés chez les salmonelles. Leur analyse constitue un outil informatif sur l'évolution du génome et cette méthode de sous-typage a déjà été appliquée à l'étude épidémiologique d'autres espèces telles que *Mycobacterium tuberculosis* ou *Yersinia pestis*.

Enfin, l'analyse des génomes et notamment des polymorphismes nucléotidiques (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) a largement montré son intérêt dans l'investigation d'épidémies d'origine alimentaire (6).

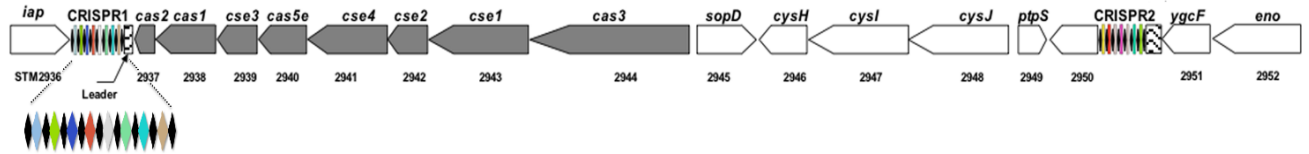


Figure 2 : Structures du système CRISPR/cas de différentes souches de *S. enterica* et *S. bongori* (4)
 Deux loci CRISPR (CRISPR-1 et 2) sont présents, les gènes *cas* sont situés entre les 2 loci CRISPR. Les losanges noirs représentent les *DRs* et les losanges colorés indiquent les séquences *spacers*.

1.2 Réservoir

Le réservoir des salmonelles est principalement animal : elles colonisent le tube digestif des vertébrés et sont disséminées par les fèces dans l'environnement, où elles peuvent survivre plusieurs mois. La sous-espèce *enterica* est plus adaptée aux animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) et à l'homme. Certains sérotypes ont un tropisme d'hôte exclusivement humain (Typhi, Paratyphi A et C, Sendai) ou animal (Abortusovis chez les ovins, Gallinarum chez la volaille). La grande majorité des sérotypes est ubiquiste (Typhimurium, Enteridis, Montevideo...) et a la capacité d'infecter un large spectre d'hôtes en provoquant des symptômes différents (7). Certaines souches peuvent également être isolées d'autres sources, telles que les animaux à sang froid (reptiles, tortues) et les animaux aquatiques (mollusques, poissons) (8).

1.3 Contamination

La transmission des SNT s'effectue essentiellement par la consommation d'aliments contaminés crus ou insuffisamment cuits (viandes, charcuterie, œufs et préparations à base d'œufs, volailles, produits laitiers...). Certains sérotypes sont associés plus volontiers à certains aliments (Enteridis avec les œufs et les poulets par exemple). Plus rarement, les salmonelloses peuvent être liées à un contact direct avec un homme ou un animal infecté ou porteur sain. Ainsi, les nouveaux animaux de compagnie (reptiles) constituent une nouvelle source de contamination non négligeable (9). Pour les souches ayant un réservoir strictement humain, la contamination est interhumaine par voie directe (mains sales) ou indirecte (par des aliments ou de l'eau souillés par des déjections humaines). Certains individus peuvent par ailleurs être porteurs asymptomatiques de salmonelles pendant plusieurs semaines (10). Les mécanismes du portage chronique sont cependant imprécis pour les SNT, il est probable que les bactéries persistent dans les formations lymphoïdes intestinales ou au niveau de la vésicule biliaire (11).

→ Infections nosocomiales à *Salmonella*

Une infection est dite nosocomiale si elle apparaît au cours ou à la suite d'une hospitalisation (ou d'un soin ambulatoire) et si elle n'était ni présente, ni en incubation à l'admission et qu'elle se développe 48 heures au moins après l'admission. Une épidémie nosocomiale se caractérise par une augmentation anormale du nombre de cas incidents sur un temps donné. En comparaison avec d'autres agents bactériens, les salmonelles sont rarement impliquées dans des infections nosocomiales. Les populations particulièrement à risque sont les personnes hospitalisées souffrant de dysimmunité (thérapies immunosuppressives post transplantation, chimiothérapies anticancéreuses, corticothérapie, autres comorbidités), les nouveau-nés et les personnes âgées. Dans une méta-analyse, les auteurs retiennent 52 épidémies nosocomiales à salmonelles à travers le monde entre 1995 et 2011 (12). Les voies de transmission les plus courantes étaient l'alimentation (60%) et le contact direct (13%). Dans plus de 20% des cas, la source de contamination reste inconnue. Plus rarement, les équipements hospitaliers (robinets, jouets des services de pédiatrie, boutons d'appels infirmier...) ont été incriminés. Ces épidémies sont essentiellement rapportées dans les services de néonatalogie, pédiatrie, psychiatrie et les institutions de personnes âgées et sont généralement dues à des souches multirésistantes.

1.4 Physiopathologie

Après ingestion, les salmonelles transitent par l'estomac où elles résistent au pH acide et parviennent alors au niveau de l'intestin grêle. Les salmonelles sont des bactéries entéropathogènes invasives : elles pénètrent dans les entérocytes par invagination de la membrane par un mécanisme actine-dépendant bactério-induit. Dans les entérocytes, elles se multiplient au sein de vacuoles d'endocytose qui progressent vers le pôle basal et gagnent ainsi la lamina propria. L'invasion de la lamina propria entraîne une réponse inflammatoire associée au recrutement de polynucléaires neutrophiles responsable des signes d'entérite (Fig.3). Les salmonelles provoquent *in vitro* une altération des jonctions serrées des entérocytes participant à la sécrétion d'eau et d'électrolytes qui se traduit par une diarrhée aqueuse. L'infection par les SNT chez le sujet sain reste généralement restreinte à l'intestin (13). Cependant les cellules cibles privilégiées des salmonelles sont les cellules M phagocytaires des plaques de Peyer ; ces macrophages intestinaux permettent l'envahissement des organes lymphatiques et leur diffusion systémique. Chez les patients immunodéficients, les salmonelles peuvent ainsi gagner la circulation sanguine et être responsables de localisations secondaires extra-intestinales.

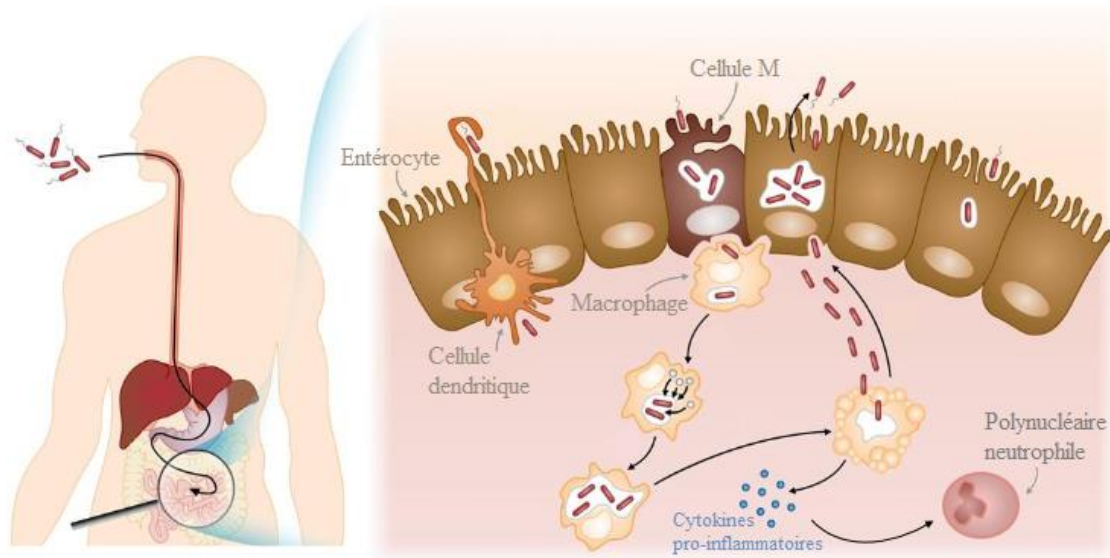


Figure 3 : Physiopathologie des infections entériques à *Salmonella* (d'après (13))

1.5 Tableau clinique et impact médico-économique de la maladie

Les SNT représentent la première étiologie bactérienne des toxi-infections d'origine alimentaire collectives (TIAC) en France. La dose minimale infectante n'est pas connue avec exactitude pour les SNT, mais plus elle est importante, plus la durée d'incubation semble courte. Les salmonelloses intestinales se manifestent par une gastro-entérite fébrile, après 6 à 72 heures d'incubation, associant douleurs abdominales, nausées, vomissements à des selles diarrhéiques. L'évolution est le plus souvent favorable en 3 à 5 jours, mais varie selon l'âge, le statut immunitaire et la virulence du sérotype (14). Cette infection peut se compliquer d'une déshydratation majeure parfois mortelle chez les sujets âgés ou les nourrissons. Elle peut également évoluer vers une forme bactériémique ou des localisations secondaires chez les sujets aux âges extrêmes de la vie, immunodéficients, drépanocytaires ou porteurs de matériel prothétique. Les manifestations extra-digestives sont multiples: pleuropulmonaires, neuroméningées, cardio-vasculaires ou ostéo-articulaires (15).

Les SNT représentent une charge importante en santé publique et un coût considérable pour la société dans de nombreux pays. Aux Etats-Unis une étude de 1996 à 1999 par le réseau de surveillance FoodNet recense 1,4 millions de cas annuels entraînant 168000 visites chez le médecin, 15000 hospitalisations et 400 décès (16). Le coût annuel des salmonelloses non typhiques dans ce pays est estimé à 3 milliards de dollars en 2012 (17). En France, une étude menée par l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) entre 1995 et 1999, faisait état de 32000 à 43000 cas annuels (dont 98% de cas d'origine alimentaire) entraînant 6000 à 10700

hospitalisations, compliquées de 100 à 560 décès (18). Une revue de la littérature en 2010 estime le nombre annuel mondial de gastroentérites à SNT à 93,8 millions de cas (dont 80,3 millions d'origine alimentaire) responsables de 155 000 décès (19).

1.6 Epidémiologie

Les SNT ont une distribution mondiale. D'un point de vue médical, seules les sous-espèces *enterica*, *arizonae* et *diarizonae* sont intéressantes car les sous-espèces *salamae* et *houteanae* sont plutôt spécifiques des reptiles et ne sont pas très répandues tandis que la sous-espèce *indica* est très rarement isolée. Malgré l'existence de plus de 2000 sérotypes, moins de 400 sérotypes sont isolés chaque année. Les deux principaux isolés ces dix dernières années en santé humaine sont les sérotypes Typhimurium et Enteritidis, représentant à eux seuls près des trois quarts des isollements de *Salmonella* en pathologie humaine (Fig.4) (20). *S. Enteritidis* a émergé au début des années 1990 et a diffusé dans le monde entier à la faveur d'une intensification de l'élevage industriel et de la mondialisation du commerce des volailles. Le sérotype Typhimurium a augmenté au cours des années 1990 et s'est étendu dans de nombreux pays du nord grâce au commerce du bétail.

→ Epidémiologie française

La surveillance des cas de salmonelloses est menée par le Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR-ESS, Institut Pasteur, Paris). Près des 2/3 des salmonelles isolées en France font l'objet d'un envoi au CNR, sous forme de souches ou de fiches informatives. Cette surveillance est complétée par celle des TIAC à déclaration obligatoire, gérée par l'InVS. Ainsi, en 2010, 92 TIAC confirmées à *Salmonella* ont été déclarées, représentant environ 40% des foyers de TIAC dont l'agent étiologique a été confirmé. A l'instar de l'épidémiologie mondiale, les sérotypes Enteritidis et Typhimurium prédominent et constituent à eux seuls plus de 70% des isollements humains envoyés au CNR (Tab.3)(21). Depuis 2005, on observe néanmoins une baisse constante du sérotype Enteritidis associée à une montée du sérotype Typhimurium et de son variant monophasique (formule antigénique 1,4,[5],12:i:-). Sa prévalence parmi les cas humains de salmonelloses est en augmentation depuis le milieu des années 1990 dans de nombreux pays et devient en 2011 le 2^e sérotype le plus fréquemment isolé en France.

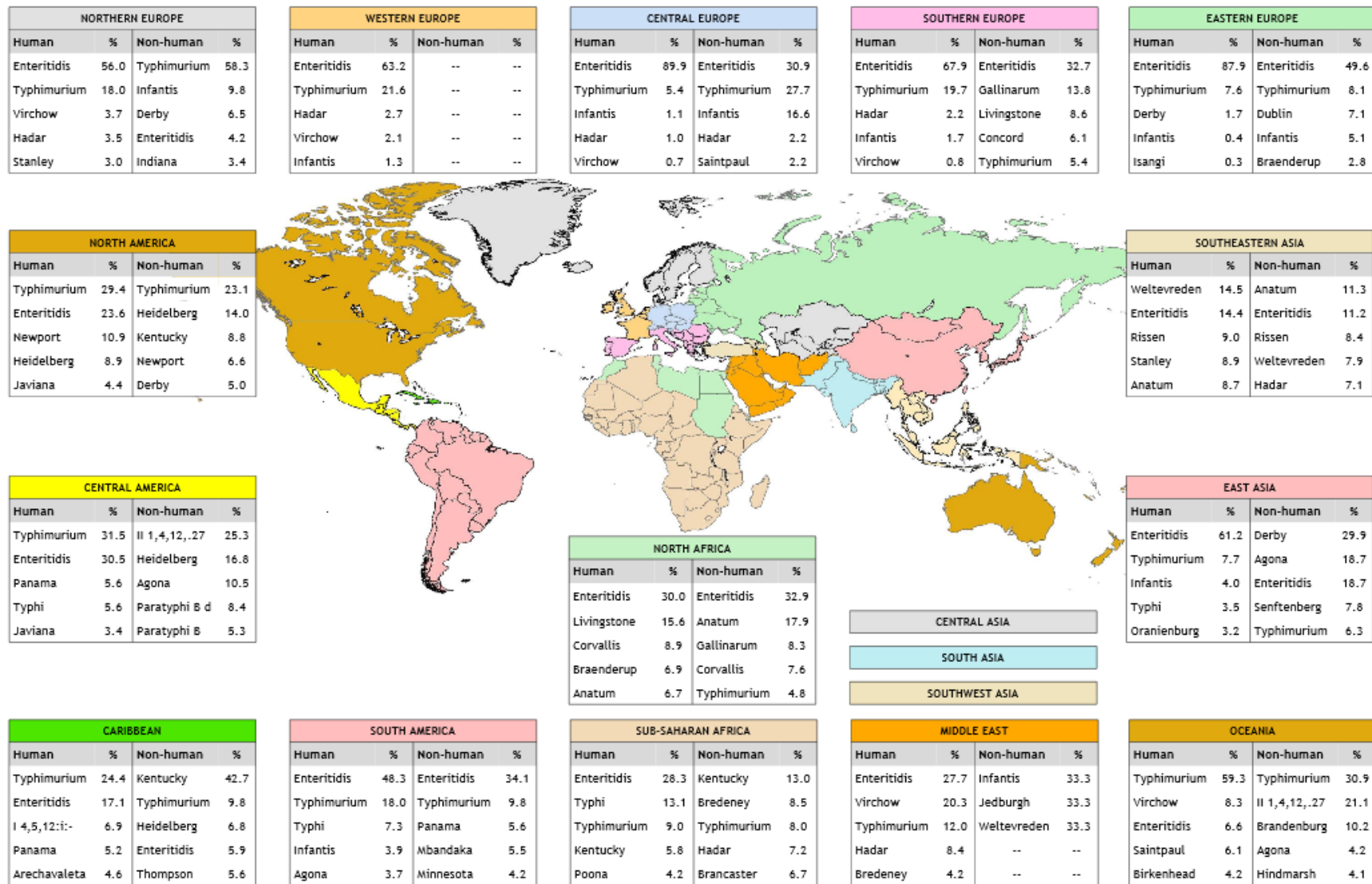


Figure 4 : Répartition mondiale des sérotypes de *Salmonella* selon une étude multicentrique avec 1,5 million de cas humains et 360 000 non humains entre 1995 et 2008 (20)

Tableau 3 : Répartition des 20 principaux sérotypes de *Salmonella* en 2000, 2005, 2009-2011, 2013 en France. (Rapports annuels du CNR-ESS (21))

	2000	2005	2009	2010	2011	2013
1	Enteritidis (4656)	Typhimurium (3992)	Typhimurium (3867)	Typhimurium (3027)	Typhimurium (3600)	Typhimurium (3102)
2	Typhimurium (3800)	Enteritidis (3638)	Enteritidis (1777)	Enteritidis (1711)	1, 4, [5],12:i:- (2248)	1, 4, [5],12:i:- (2430)
3	Hadar (787)	Agona (274)	1, 4, [5],12:i:- (1011)	1, 4, [5],12:i:-(1098)	Enteritidis (1809)	Enteritidis (1575)
4	Virchow (321)	Infantis (210)	Hadar (177)	Kentucky (208)	Infantis (187)	Infantis (206)
5	Heidelberg (226)	Typhi (187)	Typhi (170)	Newport (191)	Napoli (151)	Derby (178)
6	Infantis (209)	Derby (158)	Derby (160)	Typhi (181)	Kentucky (150)	Kentucky (176)
7	Brandenburg (187)	Hadar (147)	Newport (139)	Derby (167)	Newport (149)	Panama (137)
8	Derby (164)	Virchow (142)	Infantis (134)	Panama (148)	Derby (147)	Typhi (134)
9	Typhi (152)	Newport (133)	Kentucky (130)	Infantis (128)	Panama (146) Typhi (146)	Newport (130)
10	Newport (137)	Panama (124)	Panama (107)	Napoli (100)		Saintpaul (111)
11	Panama (125)	1, 4, [5],12:i:-(101)	Virchow (85)	Dublin (81)	Dublin (99)	Bovismorbificans (104)
12	Dublin (105)	Manhattan (95)	Napoli (81)	Hadar (76)	Saintpaul (86)	Napoli (90)
13	Indiana (87)	Napoli (93)	Saintpaul (77)	Corvallis (70)	Montevideo (67) Virchow (67)	Paratyphi A (66)
14	Blockley (83)	Indiana (86)	Dublin (74)	Kottbus (66) Virchow (66)		Agona (61) Montevideo (61)
15	1, 4, [5],12:i:-(75)	Brandenburg (82)	Montevideo (57)		Bovismorbificans (56)	
16	Bredeney (63)	Dublin (73)	Agona (56)	Saintpaul (64)	Hadar (55)	Dublin (60) Virchow (60)
17	Bovismorbificans (58)	Manhattan (62)	Bredeney (52) Rissen (52)	Montevideo (61)	Agona (51) Weltevreden (51)	Bredeney (58)
18	Livingstone (56)	Worthington (55)		Rissen (60)		
19	Montevideo (51)	Kentucky (48)	Paratyphi A (49)	Bovismorbificans (59)	Brandenburg (50) Rissen (50)	Hadar (53)
20	Agona (50)	Dublin (45)	Brandenburg (47)	Brandenburg (56)		Weltevreden (51)

1.7 Traitement

Dans les formes habituelles, la guérison est spontanée en quelques jours et seul un traitement symptomatique associé à une bonne hydratation est préconisé. Une revue de la Cochrane a en effet conclu qu'il n'y avait aucune preuve justifiant une antibiothérapie dans les gastroentérites non sévères de l'enfant et de l'adulte (22). Le traitement antibiotique est donc à réserver aux patients présentant une forme sévère ou à risque de complications. Chez l'adulte, les fluoroquinolones constituent le traitement de première intention. Les céphalosporines de 3^e génération (C3G) sont préférées chez l'enfant. La durée de traitement est variable selon le tableau clinique et la molécule utilisée. Ainsi, pour les gastroentérites, une C3G injectable pendant 3 jours est préconisée chez le nourrisson, un traitement de 5 jours par une fluoroquinolone est recommandé chez l'adulte à risque de complications ou immunodéprimé. L'antibiothérapie ne diminue cependant pas la durée de la diarrhée et n'a pas d'incidence sur le portage digestif. La durée de traitement conseillée est de 14 jours pour une bactériémie, de 21 jours pour une méningite, de 6 à 8 semaines pour une ostéo-arthrite.

Il n'existe pas de recommandations sur le traitement du portage chronique chez l'enfant. Chez l'adulte, l'utilisation de la norfloxacine ou de l'azithromycine *versus* placebo n'a pas montrée d'intérêt dans l'éradication bactérienne et a été associée au contraire à des taux plus élevés de réinfection et de sélection de souches résistantes (23).

1.8 Résistance aux antibiotiques des SNT

Salmonella spp. est naturellement sensible à de nombreux antibiotiques. Les β -lactamines, l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole), les tétracyclines et les fluoroquinolones ont une bonne activité à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les aminosides présentent une bonne activité *in vitro* mais une faible efficacité clinique.

La résistance des SNT aux « vieilles » molécules, telles que le chloramphénicol et la tétracycline, est devenue commune dans les années 60, imputée rapidement à l'utilisation systématique des tétracyclines dans l'alimentation des volailles d'élevage (24). Augmentant progressivement, la résistance des SNT s'intensifie dès la fin des années 80, avec l'émergence rapide et la diffusion mondiale du clone *S. Typhimurium* lysotype DT104. Ce clone possède un îlot de résistance chromosomique (SGI1, *Salmonella Genomic Island*) lui conférant une résistance à l'amoxicilline, au chloramphénicol, à la spectinomycine, aux sulfamides et au triméthoprim (phénotype penta-résistant ACSSulTmp) (25). Initialement responsable d'épidémies chez le bétail au Royaume-Uni, ce clone s'est largement répandu

chez l'homme, notamment aux Etats-Unis, au Royaume-Uni et au Canada et représente en 2001 plus de 40% des souches de *S. Typhimurium* isolées (26).

Les premières SNT résistantes aux C3G apparaissent à la fin des années 1980 avec l'acquisition de gènes codant des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Les BLSE détectées sont alors des dérivés mutés des bêta-lactamases de classe A de type TEM-1/2 ou SHV-1. L'épidémiologie de la résistance aux C3G des SNT évolue dans les années 2000 avec l'émergence et la diffusion de BLSE de type CTX-M, puis de céphalosporinases AmpC de type CMY-2 majoritairement (27).

Parallèlement, la résistance aux quinolones augmente. Elle est principalement due à des mutations ponctuelles chromosomiques dans les régions QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) des gènes de l'ADN gyrase, mais aujourd'hui de nombreux gènes de résistance plasmidiques (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *qnrVC*) ont largement été décrits chez les salmonelles (28). Ainsi, en 1994-95 aux Etats-Unis, seulement 0,5% des souches étaient résistantes à l'acide nalidixique contre 2,5% en 2000 (29). L'enquête Enter-Net en 2000, incluant 10 pays européens, rapporte un taux de résistance d'isolats humains de 0,6% au céfotaxime, de 14% à l'acide nalidixique et de 0,5% à la ciprofloxacine (30). En 2012, la sensibilité aux antibiotiques de 23625 souches cliniques de *Salmonella* spp. isolées dans 19 pays européens (représentant 25.6 % des cas confirmés de salmonelloses en Europe) a été testée : les taux de résistances les plus importants étaient observés pour la tétracycline (30.0 %), les sulfamides (28.9 %), l'ampicilline (27.6 %) et la streptomycine (23.6 %). Les résistances au céfotaxime, à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine étaient respectivement de 1,1%, 14,4% et 5,1% (31). Ces données varient néanmoins selon les sérotypes et les pays. Ainsi, *S. Enteritidis* reste relativement sensible, malgré une augmentation de la résistance à l'acide nalidixique, alors que les sérotypes Typhimurium, Virchow, Newport et Heidelberg sont souvent associés à la multirésistance (Tab.4).

Tableau 4 : Incidence des souches résistantes aux C3G et de sensibilité diminuées aux quinolones dans plusieurs états (28)
Ac Nal : acide nalidixique, Cip : ciprofloxacine, R : résistant

Origine	Année	Sérotype	Nombre d'isolats	Ac Nal R (%)	Cip R (%)	C3G R (%)
Europe	2004	Enteritidis	17155	26	0,9	0,1
Europe	2004	Typhimurium	5749	7	0,6	0,4
Europe	2004	Virchow	492	59	4	1
Koweït	2003-2005	Divers	267	14,2	1,2	1,6
Sénégal	2004-2006	Divers	249	4,8	0	0
Thaïlande	2005	Divers	135	ND	5,2	17,8
Emirats Arabes Unis	2003-2004	Divers	123	7,4	0,8	1,6
Indonésie	2003-2005	Divers	56	5	0	0

Plusieurs équipes ont par ailleurs décrits l'apparition de SNT résistantes aux carbapénèmes chez l'homme et l'animal (32). La première description d'une SNT productrice d'une carbapénémase chez l'homme correspond à une souche de *S. Cubana* produisant une enzyme KPC-2, isolée chez un enfant de 4 ans dans le Maryland (33). Cette enzyme a récemment été décrite chez *S. Typhimurium* chez un patient hospitalisé en Colombie (34). Plusieurs sérotypes et plusieurs carbapénémases ont été décrites depuis, notamment les OXA-48 et VIM chez les sérotypes Kentucky et Saintpaul (35), ou encore NDM-1 chez *S. Senftenberg* et *S. Stanley* (32).

Parallèlement à ce qui se passe dans la plupart des pays développés, en France, le nombre d'isolats humains de SNT multirésistantes aux antibiotiques n'a cessé d'augmenter depuis ces dernières années (21). Les sérotypes Typhimurium (phénotype penta-résistant majoritaire), Hadar, Newport sont particulièrement touchés. La résistance aux C3G est presque inexistante pour les sérotypes Typhimurium ou Enteritidis. Depuis le début des années 2000, le CNR observe une augmentation des souches résistantes aux C3G pour les sérotypes Newport (CMY-2) et Virchow (CTX-M) principalement. La résistance à la ciprofloxacine est particulièrement associée au sérotype Kentucky, due à l'émergence d'un clone particulier depuis 2002 (36). Les souches résistantes à la ciprofloxacine sont rares en dehors de ce sérotype.

L'utilisation massive et le mésusage des antibiotiques en thérapeutique humaine ne sont pas les seules causes d'émergence de résistance. L'utilisation massive d'antibiotiques dans les filières animales et aquacoles a sans doute largement contribué à la sélection de bactéries résistantes et à leur diffusion dans l'environnement. En 1998, l'OMS émettait un rapport reliant l'utilisation des antibiotiques et des promoteurs de croissance dans la filière animale et l'émergence d'infections humaines à *Salmonella* multirésistantes (37). Le microbiote intestinal des animaux et de l'homme constitue un incroyable réacteur d'échange d'informations génétiques entre bactéries. La diffusion de la résistance chez les salmonelles est principalement due aux transferts horizontaux de gènes portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons) souvent associés à des intégrons (38).

Plusieurs études ont par ailleurs montré une augmentation de la sévérité et de la mortalité des salmonelloses causées par des souches multirésistantes. Ces infections sont liées à un plus grand risque d'échec thérapeutique et sujettes à plus de complications invasives (39,40).

1.9 *Salmonella* Montevideo

Les *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possédant les antigènes O de type 6,7 et les antigènes H de type g, m et s (monophasique) correspondent au sérotype Montevideo, abrégé *Salmonella* Montevideo ou *S.* Montevideo.

→ Epidémiologie

En pathologie humaine, *S.* Montevideo est un sérotype assez fréquent en France, mais représente seulement 0,6% des souches déclarées au CNR en 2013 (Tab.3). Dans la littérature, on retrouve de nombreuses épidémies humaines liées à la consommation d'aliments contaminés. En 1993, une épidémie associée à l'ingestion de tomates non cuites a fait 100 cas dans le Minnesota (41). En France, « l'épidémie des reblochons » de 2006 a concerné 23 personnes (42). L'épidémie la plus importante reste américaine en 2010, liée à la consommation de salamis contaminés par du poivre noir et rouge importé d'Asie (43), où 272 cas ont été identifiés dans 44 états différents.

Du côté de la surveillance animale française, ce sérotype est encore plus souvent isolé. Ainsi, en 2010 selon l'inventaire conduit par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (ANSES) *Salmonella* Montevideo est le 4^e sérotype le plus fréquemment isolé chez l'animal, tous secteurs confondus. Ce sérotype est principalement associé aux productions bovines (4^e), à la filière volaille (sous-filière canard : 3^e) et aux produits d'alimentation animale (1^{er}) (44). Aux Etats-Unis, on retrouve une association avec les mêmes sources animales (Fig.5). En 2012, une épidémie de 93 cas, touchant plus de 20 états a d'ailleurs été reliée aux élevages de poulets issus du même couvoir au Missouri (45).

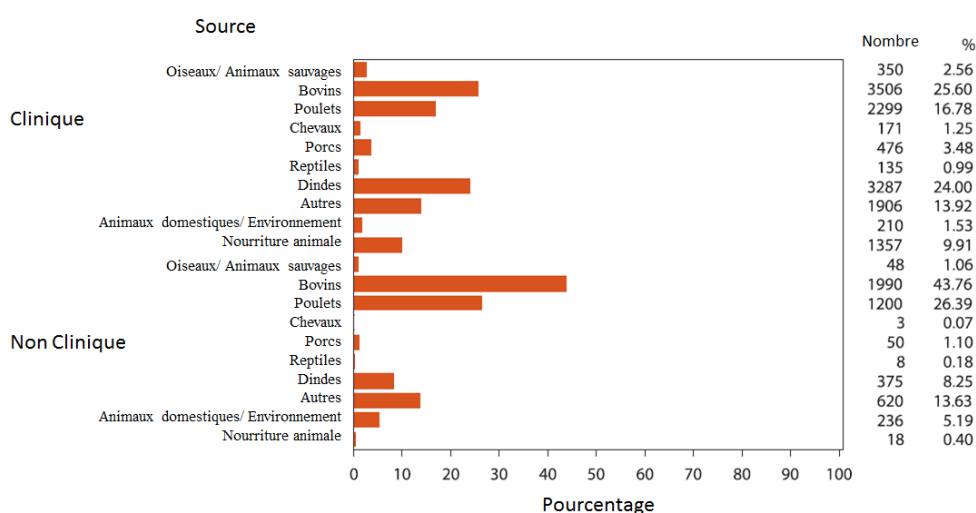


Figure 5 : Pourcentage des isolats non humains de *Salmonella* Montevideo, entre 1968 et 2011 aux Etats-Unis, rapportés par les laboratoires des services vétérinaires américains (USDA-FSIS) (46)

clinique : souches isolées chez des animaux symptomatiques, non cliniques : isolats obtenus lors de surveillance

De manière anecdotique, des souches de *S. Montevideo* ont pu être retrouvées chez certains reptiles (boa constrictor domestique, caïman (47)) et ont pu être responsables de rares infections humaines (48).

Une épidémie nosocomiale à *Salmonella* Montevideo a déjà été décrite en 1984 dans une unité de néonatalogie d'un hôpital allemand. Les souches de *S. Montevideo* isolées à partir des fèces de 26 nourrissons présentaient cinq antibiogrammes différents. Les auteurs avaient relié la multirésistance de ces souches à la présence d'un unique plasmide IncC, également présent dans des entérobactéries de la flore fécale des enfants (49).

→ Sensibilité aux antibiotiques

Le sérotype Montevideo est plutôt épargné par la multirésistance. Dans une étude américaine, les souches de *Salmonella* Montevideo sont habituellement sensibles aux antibiotiques (95,5% des isolats) ; sur 22 souches isolées d'hémocultures entre 1996 et 2007, aucune n'était résistante aux C3G ni aux quinolones (50). En 2011, selon les données du CNR (Tab.5), sur 56 isolats testés, 47 étaient totalement sensibles, seulement 2 souches étaient rapportées résistantes aux C3G. Ces 2 souches sont issues de l'épidémie, sujet de notre étude. En 2012 et 2013, en excluant les souches de l'épidémie, aucune souche résistante aux C3G n'a été rapportée.

Par ailleurs, il n'existe pas à ce jour de description de *S. Montevideo* BLSE dans la littérature, de rares souches de sensibilité diminuée aux quinolones par l'acquisition d'un gène *qnrSI* ont été rapportées en Espagne (51).

Tableau 5 : Profils de résistance des souches de *Salmonella* Montevideo envoyées au CNR de 2011 à 2013 (21)

A : amoxicilline, Cro : ceftriaxone, Caz : ceftazidime, Fox : cefoxitine, S : streptomycine, Sp : spectinomycine, K : kanamycine, T : tobramycine, G : gentamicine, N : nétilmicine, Sul : sulfamide, Tmp : triméthoprim, C : chloramphénicol, Te : tétracycline, Nal : acide nalidixique,

n : nombre de souches étudiées, N: nombre de souches (une seule par patient) reçues au CNR-ESS ;

* souches en lien avec l'épidémie Limoges

Profil de résistance	Nombre de souches possédant ce profil en		
	2011 n =56 N=62	2012 n=39 N=39	2013 n=56 N=56
ASulTmp	1	0	0
A	0	2	1
ACroSSpKTGSulTmpCTeNal	0	3*	1*
ACroSSpKTGSulTe	0	1*	0
ACroSSpKTGSulTmpCTe	0	0	1*
ACroSSpKTSul	1*	0	0
ACroSSSpKTSulTmpC	1*	0	0
ACazFoxSSpKTNGSulTmpCTeNal	0	0	1*
SSpSulTmpTe	1	1	0
Nal	5	1	1
Tmp	0	0	2
Sensible	47	31	48

2. Les intégrons

Les intégrons sont des éléments génétiques décrits initialement par Stockes et Hall en 1989 (52). Ils forment un système original de capture, d'expression et de dissémination de gènes sous forme de cassettes.

On distingue deux grands types d'intégrons:

- Les superintégrons (SI) strictement chromosomiques, peuvent contenir jusqu'à 200 cassettes dont la grande majorité code des protéines de fonction inconnue. Isolés chez de nombreuses souches environnementales (*Vibrionaceae*, *Pseudomonaceae*...), ces SI semblent jouer un rôle de réservoir de gènes à haute valeur adaptative.

- Les intégrons de résistance (IR) aux antibiotiques contiennent un nombre plus restreint de cassettes (moins de 10 décrits) hébergeant pour la plupart des gènes de résistances aux antibiotiques. Ils sont portés par des plasmides et/ou des transposons et peuvent être ainsi transférés entre bactéries.

2.1 Structure

Un intégron se définit par une plateforme fonctionnelle, aussi appelée région 5'CS (5' conserved segment), associant 3 éléments : un gène *intI* codant une intégrase IntI, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur de cassettes Pc orienté dans le sens inverse de *intI* (Fig.6). En aval, se situe une partie variable constituée de cassettes, éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique catalysé par l'intégrase IntI (53).

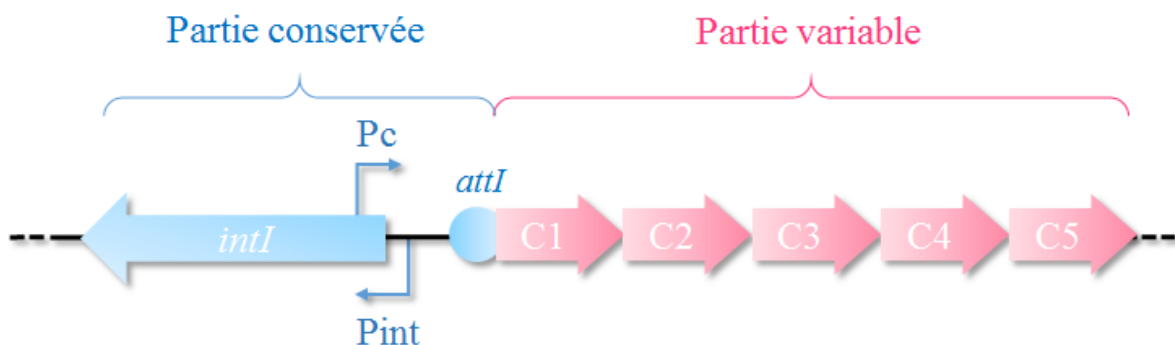


Figure 6 : Structure schématique d'un intégron

2.1.1 Intégrase

L'intégrase IntI est une recombinase à tyrosine spécifique de site capable de catalyser des recombinaisons entre 2 sites spécifiques situés sur une ou deux molécules d'ADN.

Cinq classes d'IR ont été définies en fonction de la séquence en acides aminés de l'intégrase IntI (54). Les 3 premières sont les plus prévalentes et les mieux caractérisées. Les IR de classe 1 sont principalement décrits chez des BGN tels que les entérobactéries, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio* et sont largement impliqués dans la diffusion de la résistance chez les souches cliniques, ils hébergent une grande diversité de cassettes. Les IR de classe 2 possèdent une intégrase IntI2 le plus souvent non fonctionnelle, tronquée du fait d'un codon STOP prématuré dans le gène *intI2* (55) ; leur réseau de cassette est donc généralement très conservé. Les intégrons de classe 3 sont très peu décrits dans la littérature. Les intégrons de classe 4 et 5 ont été décrits chez des espèces du genre *Vibrio*, associés à des transposons conjugatifs, conférant une résistance au triméthoprime. Leur implication en microbiologie clinique est considérée à ce jour comme nulle.

2.1.2 Site *attI*

Le site *attI* est un site d'attachement spécifique de l'intégrase IntI. A chaque intégrase correspond un site *attI* propre, mais des recombinaisons peuvent intervenir de façon moins efficace avec les sites *attI* d'autres IR (56). La séquence du site *attI* varie fortement d'une classe à l'autre à l'exception d'un motif conservé GTTRRRY (R: purine; Y: pyrimidine) nommé boîte R (57). La recombinaison et donc l'intégration d'une nouvelle cassette s'effectue au niveau du site GTT entre le G et le premier T. La boîte R forme avec une boîte L située plus en amont un site « core » de liaison essentiel à l'activité d'IntI. Deux autres régions d'interaction avec l'intégrase ont été localisées en amont du site *core*. Le premier site DR1 est un site de fixation fort indispensable à l'activité de l'intégrase, le deuxième DR2 est un site de fixation faible qui améliore l'efficacité de recombinaison (58).

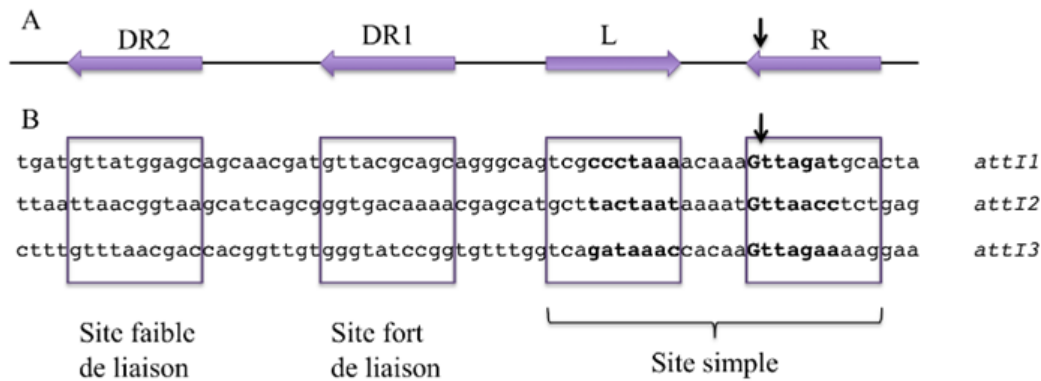


Figure 7 : Structure des sites *attI* (58)

2.1.3 Région promotrice Pc

Le promoteur Pc est responsable de l'expression des gènes contenus dans les cassettes qui ne possèdent, à quelques exceptions près, pas de promoteur propre. Plus les cassettes sont proches de Pc, plus les gènes qu'elles hébergent sont exprimés.

La région promotrice des cassettes a été essentiellement étudiée chez les intégrons de classe 1. Chez ces derniers, le promoteur Pc se situe dans la séquence codante du gène *intI1*, plus de 200 bases en amont de la première cassette. Il existe au moins 13 variants du promoteur Pc, de force et de fréquence variables, définis sur la base de la séquence des boîtes -35 et -10 (59). Dans certains intégrons de classe 1, un second promoteur P2 est présent dans le site *attI*, en aval de Pc, créé par l'insertion de 3 résidus guanine entre des séquences potentielles des hexamères -10 et -35. Il permet d'augmenter le niveau de transcription des cassettes, d'autant plus que la force du variant Pc est faible.

2.1.4 Réseau de cassettes

→ Gènes de cassettes

Les cassettes constituent la partie variable des intégrons, en aval de la plateforme fonctionnelle. Ce sont des unités fonctionnelles mobilisables pouvant exister de manière transitoire sous une forme libre circulaire ou sous une forme linéaire intégrée (60). Plusieurs cassettes peuvent être contenues dans un même intégron et permettre à la bactérie hôte de résister en bloc à différentes familles d'antibiotiques. Elles ont des tailles et des fonctions très variables mais possèdent une organisation commune. Elles se composent d'un cadre ouvert de lecture (*orf*) suivi d'un unique site spécifique de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase (Fig.8).

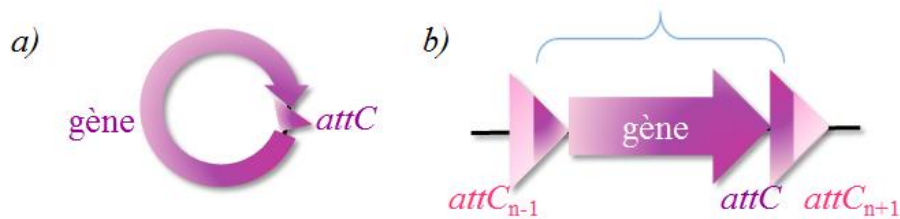


Figure 8 : Structure schématique d'une cassette a) forme circulaire, b) forme intégrée linéaire

En 2009, une revue recense au sein des IR 132 cassettes différentes codant des résistances à des antibiotiques et 62 cassettes *gcu* (*gene cassette of unknown function*) codant des protéines de fonction inconnue (55). Presque toutes les familles d'antibiotiques sont concernées (Tab.6).

Tableau 6 : Principaux gènes de résistance décrits dans des cassettes (39)

Famille d'antibiotiques	Mécanisme de résistance	Gènes de résistance
β-lactamines	Pénicillinase	<i>blaP</i>
	BLSE	<i>bla_{GES}</i> , <i>bla_{VEB}</i>
	Oxacillinase	<i>bla_{OXA}</i>
	Carbapénèmase	<i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i>
Aminosides	Acétyltransférase	<i>aacA</i> , <i>aacC</i> , <i>aac(6')-Ib</i>
	Adénylyltransférase	<i>aadA</i> , <i>aadB</i> ,
	Streptothricine acétyltransférase	<i>sat</i>
Triméthoprime	Dihydrofolate réductase	<i>dfrA</i> , <i>dfrB</i>
Chloramphénicol	Chloramphénicol acétyltransférase	<i>catB</i>
	Efflux	<i>cmlA</i> , <i>cmlB</i>
Fosfomycine	Glutathion-S-transférase	<i>fos</i>
Macrolides	Erythromycine estérase	<i>ere</i>
	Lincomycine nucléotidyltransférase	<i>lin</i>
Rifampicine	ADP-ribosyl transférase	<i>arr</i>
Quinolones	Acétyltransférase	<i>acc(6')-Ib-cr</i>
	Protection de la cible	<i>qnrVC</i>
Ammoniums quaternaires	Pompe d'efflux	<i>qac</i>

→ Site *attC*

Le site *attC* possède à ses extrémités deux sites simples encadrant une région centrale de taille et de séquence variable. Initialement décrit comme des éléments stables de 59 pb, leur taille varie en réalité entre 57 et 141 pb (61). Chaque site simple est composé de 2 séquences inversées répétées désignées

respectivement L'-L'' et R'-R''. Les séquences R' et R'' sont aussi appelées site *core* (généralement GTTRRRY) et site *core* inverse (RYYAAC) (62).

R' et R'' sont habituellement complémentaires, mais les séquences L'' et L'' n'ont pas une complémentarité parfaite. L'' possèdent en effet une base guanine supplémentaire. Les séquences L'-L'' et R'-R'' forment des duplex permettant de former des structures « tige boucle » lorsque le site *attC* est sous forme simple brin (Fig.9).

Lors de l'appariement de L' et L'', la base supplémentaire de L'' provoque un mésappariement et est repoussée vers l'extérieur. Cette base extrude permet la reconnaissance par l'intégrase (63).

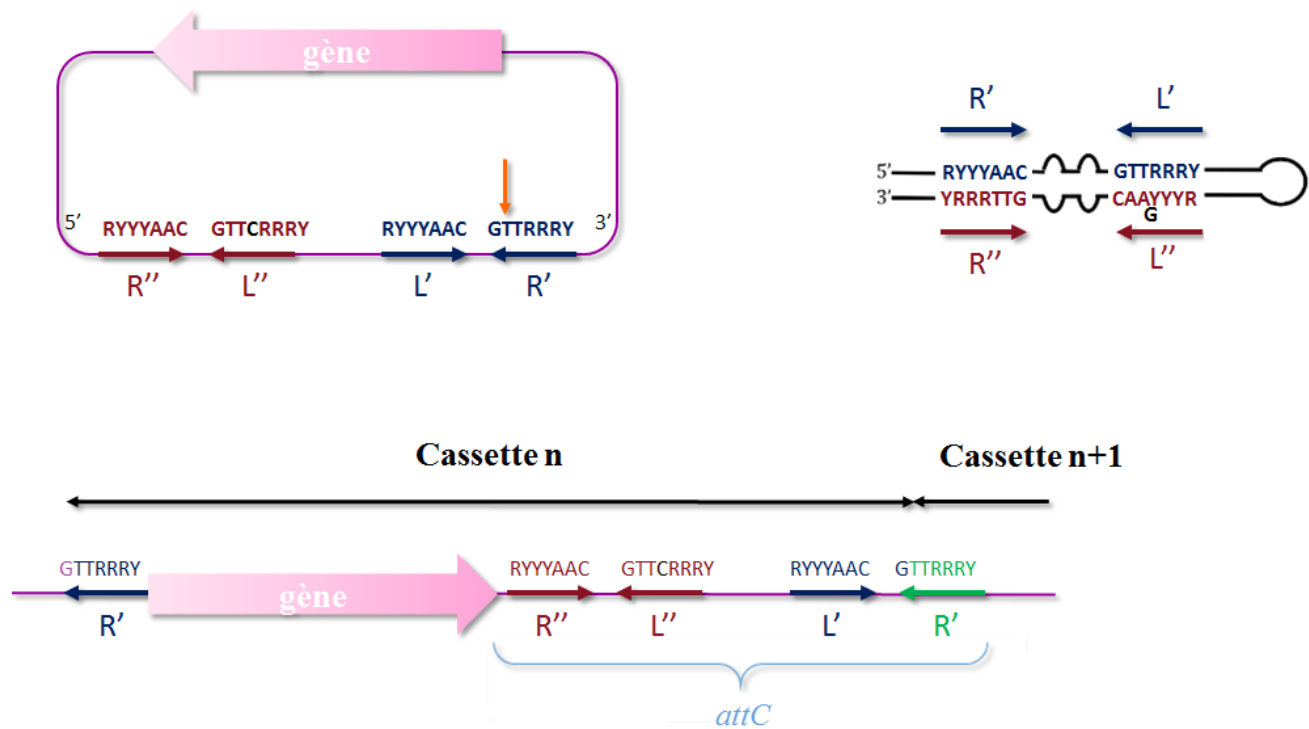


Figure 9 : Structure d'une cassette et d'un site de recombinaison *attC*

2.1.5 Région 3' des intégrons de classe 1

La région en aval du réseau de cassettes diffère selon les classes d'intégrons (52). Celle-ci revêt un intérêt en termes de résistance uniquement pour les IR de classe 1. En effet, chez certains IR de classe 1, peut se trouver en aval des cassettes, tout ou une partie d'une région nommée 3'CS (3' conserved segment) comportant en général 3 gènes : *qacEΔ1*, *sul1* et *orf5*.

Le gène *qacEΔ1* (348 pb) est un dérivé tronqué de *qacE*, codant une pompe d'efflux et conférant à la bactérie une résistance aux ammoniums quaternaires et aux agents intercalants (64). Le gène *sul1*

(840 pb) code une dihydroptéroate synthétase essentielle à la synthèse des folates, conférant une résistance aux sulfamides. La séquence codante *orf5* (501 pb) code une protéine de fonction inconnue.

Un certain nombre d'IR de classe 1 ont la particularité de posséder une duplication de la région 3'CS, associé à la présence d'un élément transposable ISCR1 (*Insertion Sequence Common Region*). Ces intégrons sont parfois appelés intégrons complexes ou *sul1*-type intégrons (Fig.10). Initialement dénommée *orf513*, cette région montre des homologies avec des séquences d'insertion IS91, capables de mobiliser des séquences d'ADN (65). De nombreux gènes de résistances sont décrits en aval de cette région : *catA2* (résistance au chloramphénicol), *bla_{DHA-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-9}* (résistance aux β -lactamines), *qnrA*, *qnrB* (résistance aux quinolones), *dfrA10*, *dfrA19* (résistance aux triméthoprime) (66). Ces gènes ne sont pas inclus dans des cassettes et ne sont pas associés à un site *attC* ; ils ne sont donc pas mobilisables par l'intégrase IntI. De plus, cette ISCR1 apporte un promoteur actif permettant l'expression des gènes en aval (67).

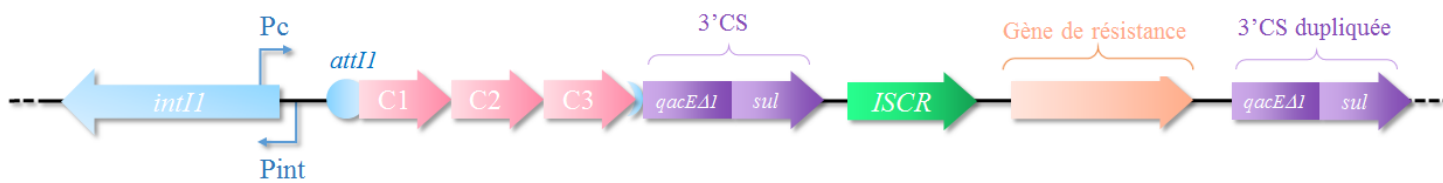


Figure 10 : Structure schématique d'un intégron complexe

2.2 Dynamique d'échange des cassettes

L'intégration et l'excision d'une cassette au sein d'un IR se produit par l'intermédiaire de recombinaisons site-spécifique catalysées par l'intégrase IntI. Trois réactions (*attC* x *attI*, *attC* x *attC* et *attI* x *attI*) correspondent aux événements de recombinaison normaux et 2 autres correspondent à des recombinaisons possibles entre un site *attI* ou *attC* et un site non spécifique contenant la séquence GTT (68). Des études ont montré que les événements de recombinaison impliquant deux sites *attI* sont beaucoup moins efficaces que les réactions impliquant deux sites *attC*. La recombinaison entre *attI* et *attC* est considérée comme la réaction la plus efficace. L'insertion d'une cassette se produit donc préférentiellement au site *attI* (69). Le gène est ainsi au plus proche du promoteur Pc, assurant une expression maximale. La recombinaison entre deux sites *attC* situés dans le même IR conduit à l'excision d'une cassette circulaire. Les événements de recombinaison s'effectuent au sein du même intégron (Fig.11) ou également sur des intégrons portés par des réplicons différents, conduisant à une cointégration.

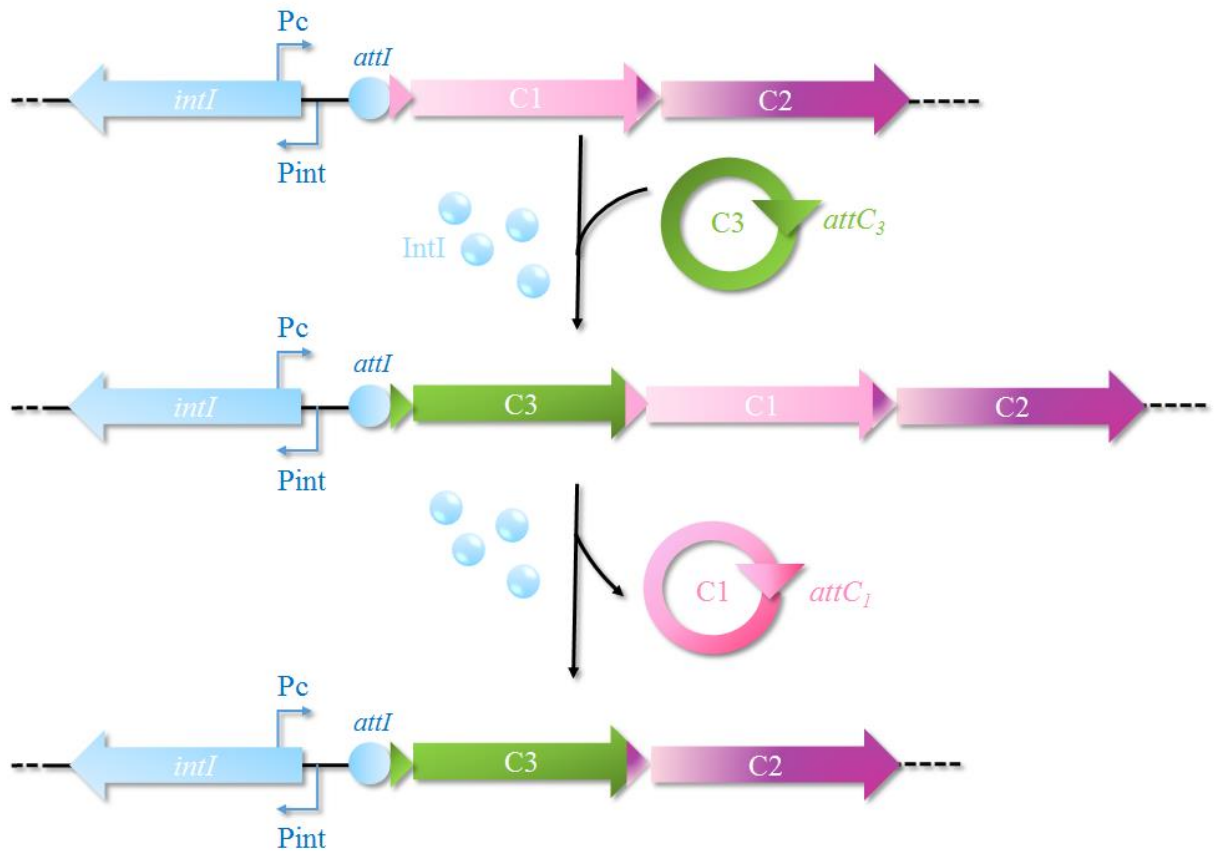


Figure 11 : Mécanisme d'insertion et d'excision des cassettes

Les recombinaisons d'excision ou d'intégration se font toujours entre deux sites double brin. Dans le cas du site *attC*, il s'agit toujours de sa configuration monobrin due au repliement tige-boucle (70). L'intégrase se fixe sur les sites *core* d'*attI* et *attC* et catalyse un échange de brin permettant la formation d'une pseudo-jonction de Holliday qui est résolue au cours de la réplication (Fig.12).

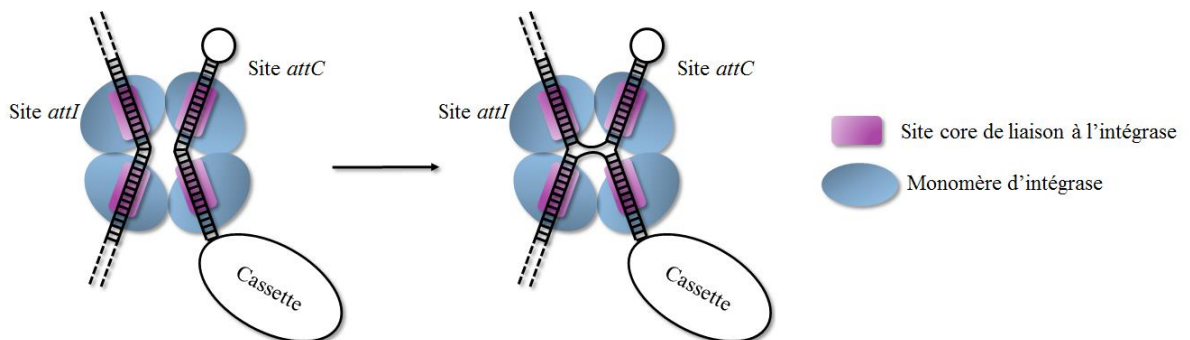


Figure 12 : Mécanisme d'intégration des cassettes au niveau du site *attI*

2.3 Expression des gènes de cassettes

Les cassettes sont orientées dans la même direction et ne contiennent pas, à de rares exceptions près, de promoteur. Les gènes sont donc co-transcrits comme dans un opéron sous la dépendance du promoteur Pc localisé dans la région 5'CS. L'expression des gènes de cassettes est donc dépendante de la force du Pc et de leur localisation dans le réseau : les gènes de cassettes éloignées du promoteur sont les plus faiblement exprimés. La pression de sélection antibiotique peut favoriser des réarrangements de cassettes afin de repositionner une cassette faiblement exprimée plus près du promoteur.

La plupart des gènes de cassettes possède une région d'initiation de traduction (TIR) potentielle, constituée d'un site de liaison des ribosomes (ou RBS pour *Ribosome Binding Site*) espacé de manière optimale du codon d'initiation (71). Certaines cassettes sont dépourvues de région TIR, dans ce cas, l'initiation se fait au niveau d'un *orf* court (*orf11*) présent chez les intégrons de classe 1 qui possèdent une région TIR efficace au sein de la 5'CS.

Les sites *attC* interfèrent également avec la traduction des gènes. Ils agiraient comme des atténuateurs traductionnels, leurs structures tige-boucle pouvant en effet gêner la progression du ribosome le long de l'ARNm (72).

2.3.1 Régulation de l'expression de l'intégrase

Expérimentalement, il a été démontré que la transcription de l'intégrase IntI1 est sous la dépendance de la réponse SOS. La protéine LexA est un répresseur transcriptionnel de la réponse SOS impliquée dans la réparation de l'ADN occasionnée lors de différents stress. Lex A possède en effet un site de fixation (boîte LexA) au niveau du site -10 du promoteur P_{int} de l'intégrase.

Lors d'un stress, il y a formation d'ADN simple brin (ADN_{sb}), reconnu par la protéine RecA. Leur association forme un filament nucléoprotéique permettant le recrutement de LexA. Ce complexe active la capacité protéolytique de LexA, entraînant son propre clivage et la libération de son site de fixation et permettant ainsi l'expression des gènes du régulon SOS (Fig.13). Plusieurs antibiotiques, comme la ciprofloxacine, l'ampicilline ou le triméthoprime, sont connus pour induire directement, à des concentrations sub-inhibitrices, la réponse SOS chez divers microorganismes. En présence d'antibiotiques, l'induction de l'expression de l'intégrase augmente d'un facteur 4, corrélée à une augmentation de 140 fois de son activité recombinase (73). Ce système permet d'une part la réduction des coûts énergétiques, l'intégrase étant synthétisée lorsque cela est nécessaire, et assure d'autre part la stabilité des cassettes en dehors des périodes de stress.

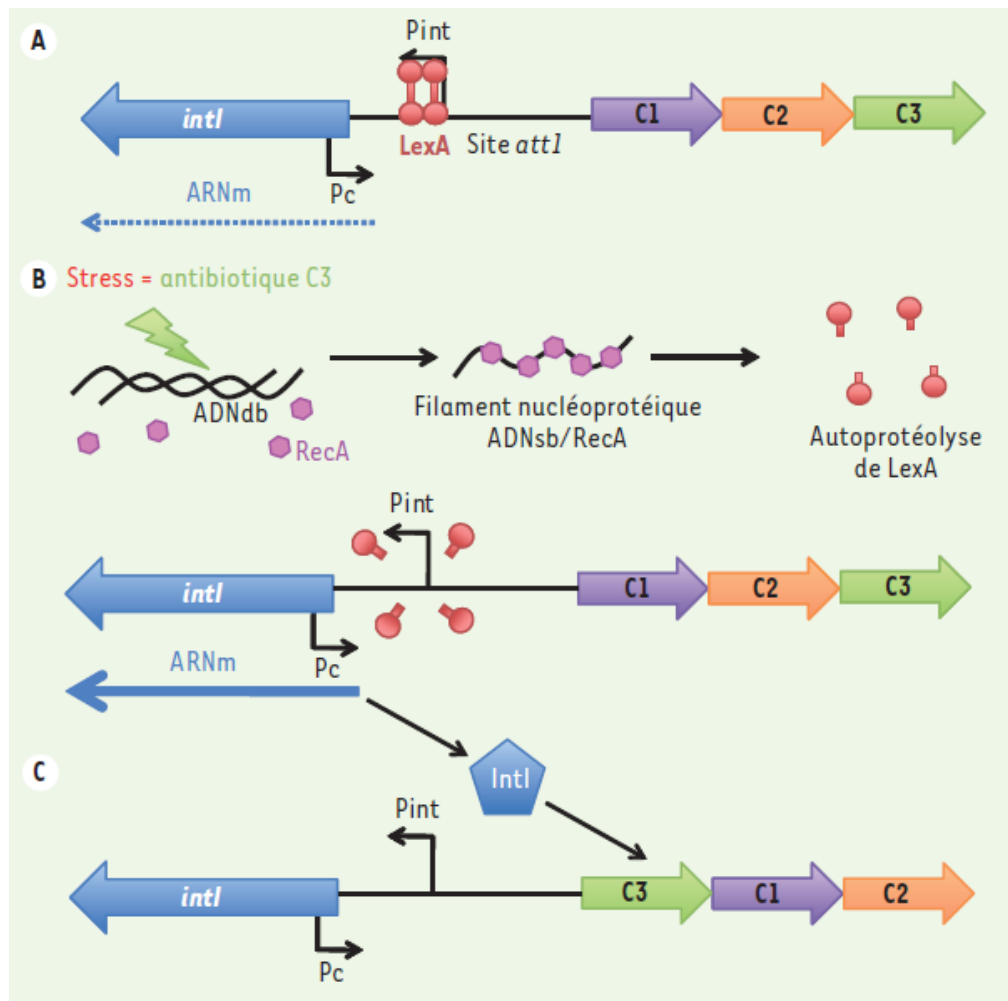


Figure 13 : Régulation de l'expression de l'intégrase IntI par LexA (A) Schéma de la plateforme fonctionnelle d'un intégron, la protéine LexA chevauche le promoteur de l'intégrase Pint. (B) Lors d'un stress conduisant à la formation d'ADNsb, par exemple par un antibiotique dont la résistance est codée par la 3^e cassette, le filament nucléoprotéique ADNsb/RecA conduit à l'autoprotéolyse de LexA et donc à l'activation de la réponse SOS. Le promoteur de l'intégrase est alors libéré. (C) L'intégrase produite effectue un réarrangement des cassettes, ramenant la 3^e cassette en première position, pour permettre à la bactérie de résister au stress antibiotique qu'elle subit (74)

2.4 Epidémiologie des intégrons

Les études épidémiologiques ont surtout porté sur les IR de classe 1 très répandus chez différents BGN: entérobactéries, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Campylobacter*. Des intégrons ont aussi bien été retrouvés chez des bactéries d'origine animale, humaine ou environnementale. Leur prévalence semble particulièrement élevée chez des souches multirésistantes aux antibiotiques, mais il peut s'agir d'un biais de sélection (75). Des intégrons de classe 1 ont également été mis en évidence chez des bactéries à Gram positif, notamment chez diverses espèces des genres *Corynebacterium*, *Enterococcus* et *Staphylococcus* faisant redouter la dissémination des cassettes de résistance aux antibiotiques à d'autres bactéries à Gram positif (76,77).

Après les intégrons de classe 1, les intégrons de classe 2 sont les plus souvent retrouvés, également chez les BGN (*Acinetobacter*, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*) de diverses origines. Ils sont associés au transposon Tn7 leur conférant une grande mobilité, mais possèdent un réseau de cassette très stable. Quelques souches ont été décrites avec une protéine IntI2 fonctionnelle ou un réseau de cassettes atypique (75). Certaines souches peuvent posséder à la fois des intégrons de classe 1 et 2.

Les intégrons de classe 3 sont très peu décrits. Le premier intégron de classe 3 a été décrit chez *Serratia marcescens* (78). Il contient la cassette *bla_{IMP}*, codant la résistance à l'imipénème par production d'une métalloenzyme et la cassette *aac(6')-Ib* (*aacA4*). Ils ont depuis été décrits chez *Delftia*, *Klebsiella*, *Escherichia* et *Enterobacter* (75,79).

→ Epidémiologie des intégrons chez *Salmonella*.

Les intégrons de classe 1 sont les plus prévalents chez les SNT, décrits aussi bien à partir de souches d'origines humaines, animales ou alimentaires. Ils ont été retrouvés chez un grand nombre de sérovars: Typhi, Agona, Brandenburg, Goldcoast Hadar, Infantis, Newport, Ohio, Panama, Poona, Saintpaul, Virchow, Worthington (80)... Ces intégrons sont pour la plupart localisés sur des plasmides qui ont également montré un rôle important dans la diffusion et l'acquisition de gènes de virulence et de résistance (81). Des intégrons de classe 2 ont rarement été décrits (82,83)

Une étude sur plus de 1900 SNT isolées de 13 pays différents, rapporte 104 souches penta-résistantes dont 90 (86.5%) possédant un ou 2 intégrons de classe 1. Les principales cassettes de résistance retrouvées conféraient une résistance aux aminosides (*aadA1*, *aadA2*, *aadA7*, *aadB*, *aacA4*, *aac3A-Id*, *aac(6')-IIc*), au triméthoprimine (*dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17*) et aux β -lactamines (*bla_{PSE1}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-30}*) (84). Une équipe portugaise a testé 1183 SNT d'origine humaines, animales ou alimentaires, et retrouve 21% de souches multirésistantes dont 77% détenant un ou plusieurs intégrons de classe 1 et 2 associés aux mêmes gènes de résistance précédemment décrits (83). Récemment, des gènes de carbapénèmases ont été décrits dans le réseau de cassettes d'intégrons de classe 1 (34,35).

La diffusion de l'îlot génomique de résistance SGI1 a largement contribué à la résistance chez *Salmonella enterica*, notamment pour le sérotype Typhimurium (85). Cet îlot de résistance a été également décrit chez d'autres sérotypes et entérobactéries et sous différents variants, suggérant son transfert horizontal et sa grande plasticité. Le SGI1 héberge un intégron complexe nommé In104. Il est constitué de deux sites 5'CS. Le premier est suivi d'une cassette *aadA2* et du gène *sulI* tronqué (Δ *sulI*), le deuxième de la cassette *bla_{PSE-1}* et du gène *sulI* entier. Entre les deux 5'CS s'insèrent les gènes *floR*, *tetR* et *tetG* codant

respectivement la résistance au florphénicol/chloramphénicol et aux tétracyclines et une séquence ISCR3.

Les intégrons complexes associés aux séquences ISCR ont largement été décrits chez les SNT multirésistantes, mobilisant fréquemment des gènes de résistances aux C3G tels que *bla_{DHA-1}* (86), *bla_{CMY-2}* (87) ou *bla_{CTXM-9}* (88) mais également aux fluoroquinolones (*qnrA1*, *qnrS* et *qnrB*) (89,90) ou au triméthoprimine (*dfrA19*) (90) chez différents sérotypes.

Matériels et Méthodes

1. Souches étudiées

Les souches de salmonelles ont été isolées à partir des coprocultures de patients hospitalisés dans une unité Mère-enfant d'un Centre Hospitalier. Elles ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Vitek MS, bioMérieux). La détermination du sérotype a été réalisée à l'aide d'antisérums Bio-Rad par agglutination.

Au total, 23 souches de *S. Montevideo* ont été isolées chez 17 patients, dont 20 souches chez 14 enfants. Pour les patients La, C, Ai et Cl, les isolats ont été retrouvés dans la même coproculture ; pour le patient Al, 2 isolats différents ont été retrouvés dans 2 prélèvements distants. Les souches Lo, P et G ont été isolées de coprocultures chez des adultes. Lo était un patient hospitalisé dans une autre unité du CH, P un membre du personnel et G la mère de l'enfant Ang. En novembre 2013, une campagne de prélèvements environnementaux a été effectuée par le Laboratoire National de Référence (LNR) *Salmonella* (ANSES-Ploufragan) sur 105 sites (chambres des enfants, chambres des mamans, salles de bains, salles de jeux, sols, vestiaires...). La souche Env a été isolée à partir d'un prélèvement effectué sur le sol de la chambre d'un enfant porteur de salmonelle. L'ensemble des souches de *Salmonella Montevideo* est listé dans le tableau 7.

Tableau 7 : Souches de *Salmonella Montevideo* isolée à partir des coprocultures de patients

*souches isolées de patients adultes ; ** souche isolée de l'environnement.

Souche	Date d'isolement	Souche	Date d'isolement
Lo*	30/11/2010	Li	30/01/2013
Al 1	04/10/2011	Ar	24/04/2013
La1	04/10/2011	P*	23/05/2013
La2	04/10/2011	An	27/05/2013
Al2	18/02/2012	Ai1	25/06/2013
M	24/04/2012	Ai2	25/06/2013
C1	23/05/2012	Ang	31/08/2013
C2	23/05/2012	G*	06/09/2013
C3	23/05/2012	Lil	21/10/2013
Z	26/05/2012	Cl1	29/10/2013
D	04/06/2012	Cl2	29/10/2013
E	03/01/2013	Env**	11/2013

Parallèlement, une recherche d'entérobactéries résistantes aux C3G a été effectuée sur certaines coprocultures et à partir des prélèvements environnementaux, après ensemencement sur les milieux sélectifs AES-BLSE (BioMérieux). Les entérobactéries BLSE retrouvées sont listées dans le tableau 8.

Les souches Env-Ec1 à 7 ont été isolées dans 2 chambres de bébés (mobilier, interrupteurs, murs), d'une chambre de maman (murs), d'une salle de jeux (mobilier, jouets) et d'une salle de soins.

Tableau 8 : Souches d'entérobactéries BLSE isolées de coprocultures et de l'environnement

* souche isolée de l'environnement.

Souche	Espèce	Date d'isolement	Souche	Espèce	Date d'isolement
D-Ko	<i>Klebsiella oxytoca</i>	04/06/2012	Lil-Eh	<i>Escherichia hermanii</i>	04/11/2013
Ar-Ec	<i>Enterobacter cloacae</i>	02/05/2012	Lil-Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18/11/2013
Ar-Ko	<i>Klebsiella oxytoca</i>	02/05/2012	Cl-Ec	<i>Enterobacter cloacae</i>	29/10/2013
P-Ko	<i>Klebsiella oxytoca</i>	23/05/2013	Env-Ec1*	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/2013
An-Ko	<i>Klebsiella oxytoca</i>	30/05/2013	Env-Ec2*	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/2013
Ai-Ko	<i>Klebsiella oxytoca</i>	25/06/2013	Env-Ec3*	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/2013
Ang-Ec	<i>Enterobacter cloacae</i>	31/08/2013	Env-Ec4*	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/2013
Ang-Eh	<i>Escherichia hermanii</i>	24/10/2013	Env-Ec5*	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/2013
Ang-Cs	<i>Citrobacter sedlakii</i>	24/10/2013	Env-Ec6*	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/2013
E-Ec	<i>Enterobacter cloacae</i>	15/09/2013	Env-Ec7*	<i>Enterobacter cloacae</i>	11/2013
Lil-Ec	<i>Enterobacter cloacae</i>	21/10/2013			

2. Antibiogramme

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Muller Hinton II, bioMérieux) avec les disques Biorad, selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

3. Extraction d'ADN

Pour les PCR classiques, l'ADN total bactérien a été extrait à l'aide de l'automate NucliSens® easyMag (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les préconisations du fabricant.

Pour la génération de bibliothèques dans le cadre du séquençage haut-débit (NGS), l'ADN total bactérien a été extrait avec le kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France) selon les recommandations du fournisseur. La quantité d'ADN a été dosée grâce à l'appareil Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies), avec le kit DsDNA HS (high sensitivity), basé sur l'intensité de fluorescence d'un marqueur de l'ADN double brin.

4. PCR en temps réel triplex intégron

La présence d'intégrons a été recherchée par une PCR triplex en temps réel sur le thermocycleur MX3005P™ (Stratagene) directement à partir des souches bactériennes. Elle est basée sur l'utilisation d'amorces ciblant les gènes des intégrases (*intI1*, *intI2*, *intI3*) associées à des sondes TaqMan® marquées de fluorophores différents (91). Les amorces et sondes sont rappelées en annexe.

5. PCR en point final

Les PCR d'amplification des réseaux de cassettes des intégrons ont été réalisées avec la Crimson Taq DNA Polymerase (BioLabs). Différentes PCR ont été réalisées avec différent couples d'amorces afin de déterminer les réseaux de cassettes des intégrons. Les différentes amorces utilisées sont rappelées en annexe.

6. Séquençage classique méthode Sanger

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit Wizard SV Gel (Promega®), selon les recommandations du fournisseur. Les réactions de séquence à partir des produits de PCR obtenus ont été réalisées grâce au kit Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing (Life Technologie). Les produits de séquence obtenus ont été purifiés à l'aide de mini-colonnes Sephadex G-50 Superfine. Les séquences d'ADN ont été acquises *via* le séquenceur ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems) et analysées avec le logiciel Geneious (Biomatters, Nouvelle-Zélande). Les séquences étaient alors comparées avec les séquences présentes dans la base de données GenBank grâce au logiciel en ligne BLAST disponible sur le site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

7. Séquençage haut débit

Etant donné la complexité génétique des différents intégrons retrouvés dans les souches de salmonelles et les difficultés rencontrées lors de l'utilisation des méthodes « classiques » de biologie moléculaire (PCR, séquençage Sanger), nous nous sommes tournés vers la technologie du séquençage haut débit.

Grâce à l'appui de la plateforme hospitalo-universitaire Genolim, nous avons pu avoir accès à la technologie de séquençage haut-débit Ion Proton™ (Life Technologies) dont les grands principes sont décrits ci-dessous.

Cette technologie a été employée pour analyser le génome de 10 souches de *S. Montevideo* : Lo, A11, A12, C1 C2, C3, D, E, Ai1, Ai2.

7.1 Préambule

Les séquenceurs de nouvelle génération sont apparus entre 2005 et 2010. Ces technologies sont dites de haut débit car elles produisent des millions de séquences (ou « reads ») en quelques dizaines d'heures, pour un coût bien moins élevé qu'auparavant. Le séquençage de nouvelle génération est souvent abrégé en HTS, pour *High-Throughput Sequencing*, ou NGS, pour *Next-Generation Sequencing*. Ces séquenceurs permettent par ailleurs un séquençage parallèle de milliers de fragments d'ADN simultanément pouvant provenir de différents échantillons.

Plusieurs technologies NGS sont commercialisées, se distinguant principalement sur leur chimie. Elles se décomposent cependant toutes en 4 grandes étapes principales : (i) la préparation des librairies, (ii) l'amplification clonale par PCR émulsion, (iii) les réactions de séquençage avec la détection des signaux d'incorporation des différentes bases et (iv) l'analyse bioinformatique des données.

7.2 Protocole

7.2.1 Préparation des librairies

La préparation d'une librairie a pour but de fragmenter le génome d'un microorganisme ou d'une cellule. Les fragments d'ADN sont associés à des adaptateurs (A et P1) (Fig.14) indispensables à la PCR émulsion précédant le séquençage et à un code-barres permettant l'identification de l'échantillon lors du séquençage de plusieurs échantillons en parallèle. Dans notre étude, 10 codes-barres différents ont été utilisés pour distinguer les 10 souches de salmonelles analysées.

Pour chaque échantillon, 50 à 100 ng d'ADN extrait ont été soumis à une fragmentation enzymatique à l'aide du kit Ion Shear™ Plus Reagent Kit (Life Technologies) contenant un mélange d'endonucléases. A chaque étape, l'ADN a subi une étape de purification à l'aide des billes magnétiques Agencourt AMPure™ XP beads (Beckman Coulter). L'ADN fragmenté a été réparé et lié aux adaptateurs P1, A (d'environ 30 pb chacun) et aux codes-barres (Ion Xpress™ Barcode d'environ 10 pb) sous l'action d'une nick-repair polymérase et d'une ADN ligase. Une étape de sélection des fragments purifiés selon leur taille a été effectuée à l'aide du E-Gel® size select 2% agarose sur le support adapté E-Gel® iBase™ Power System, E-Gel® (Life Technologies). Les fragments d'environ 200 pb ont été sélectionnés puis purifiés. Les fragments obtenus ont subi une courte amplification de 8 cycles avec la polymérase Platinum PCR Super Mix High Fidelity (Life Technologies) associée à des amorces ciblant A et P1 (Fig.14).

Un contrôle de qualité des librairies obtenues a été réalisé par électrophorèse couplée à une détection d'un agent intercalant fluorescent grâce au BioAnalyzer 2100 (Agilent) afin de vérifier la taille moyenne, la concentration et la qualité de la purification des différents échantillons.

Enfin, les librairies obtenues pour les 10 souches de salmonelles ont été mélangées entre elles de manière équimolaire afin de pouvoir être soumises à l'étape de PCR émulsion.

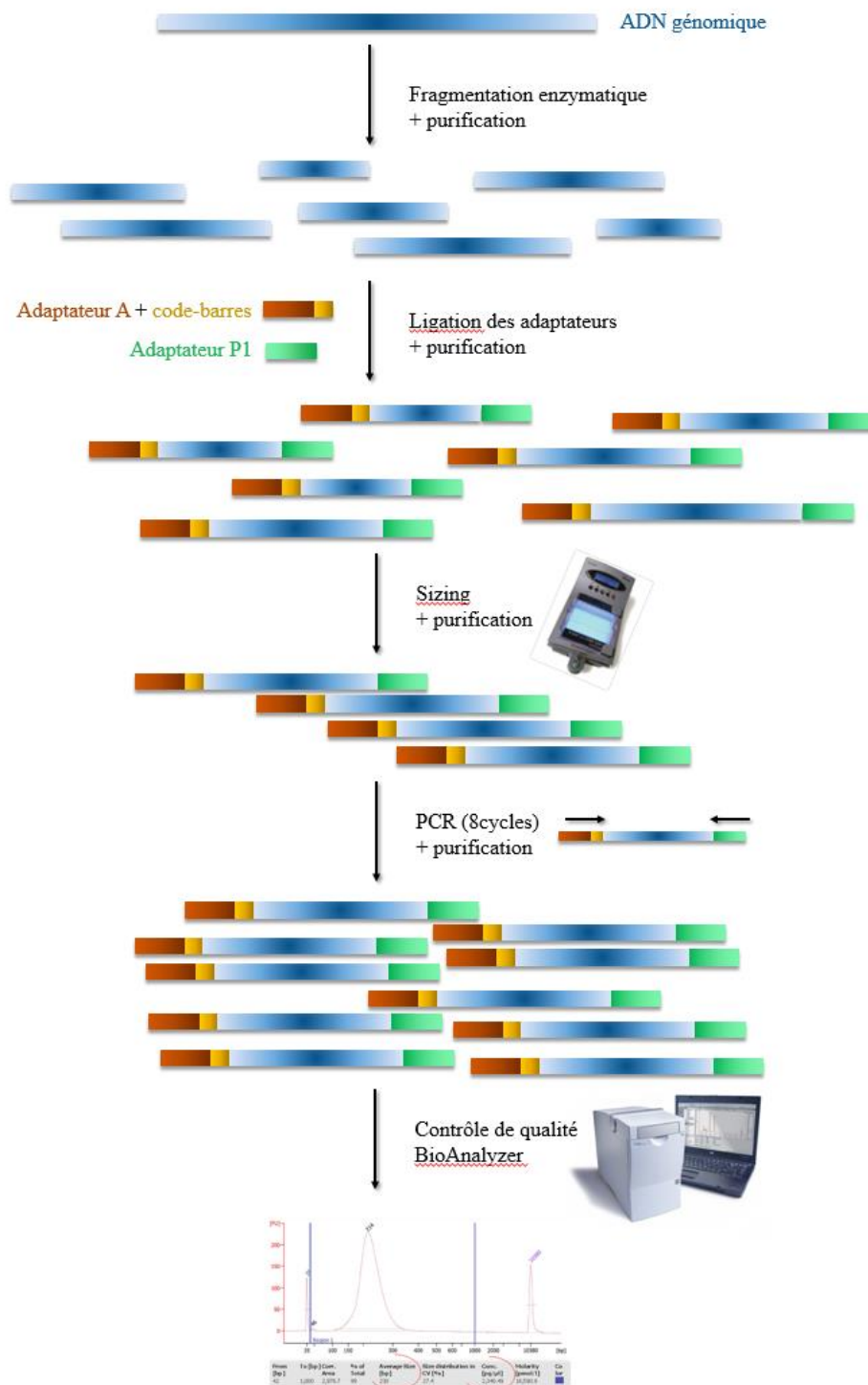


Figure 14 : Protocole de construction d'une librairie d'ADN

7.2.2 Amplification clonale par PCR émulsion

Cette étape automatisée (One Touch™ 2 System, Life technologies) permet l'amplification clonale des fragments à la surface de sphères « *ion sphere particles* » (ISP). Cette PCR émulsion est réalisée dans un mélange eau/huile afin de former des microgouttelettes (ou microréacteurs) contenant les ISP et l'ensemble des réactifs de la PCR. L'amplification clonale est réalisée en conditions limitantes, de manière à obtenir un fragment d'ADN et une ISP par microréacteur. Les fragments se fixent sur l'ISP par le biais de l'adaptateur P1, l'amplification se fait grâce à l'amorce e-PCR-A ciblant l'adaptateur A (Fig.15). Malgré l'optimisation des conditions de PCR, des ISP nues et des ISP polyclonales sont générées. Les ISP nues sont éliminées lors de l'étape suivante, les ISP polyclonales sont évincées lors de l'étape de *base calling* (cf *infra*).

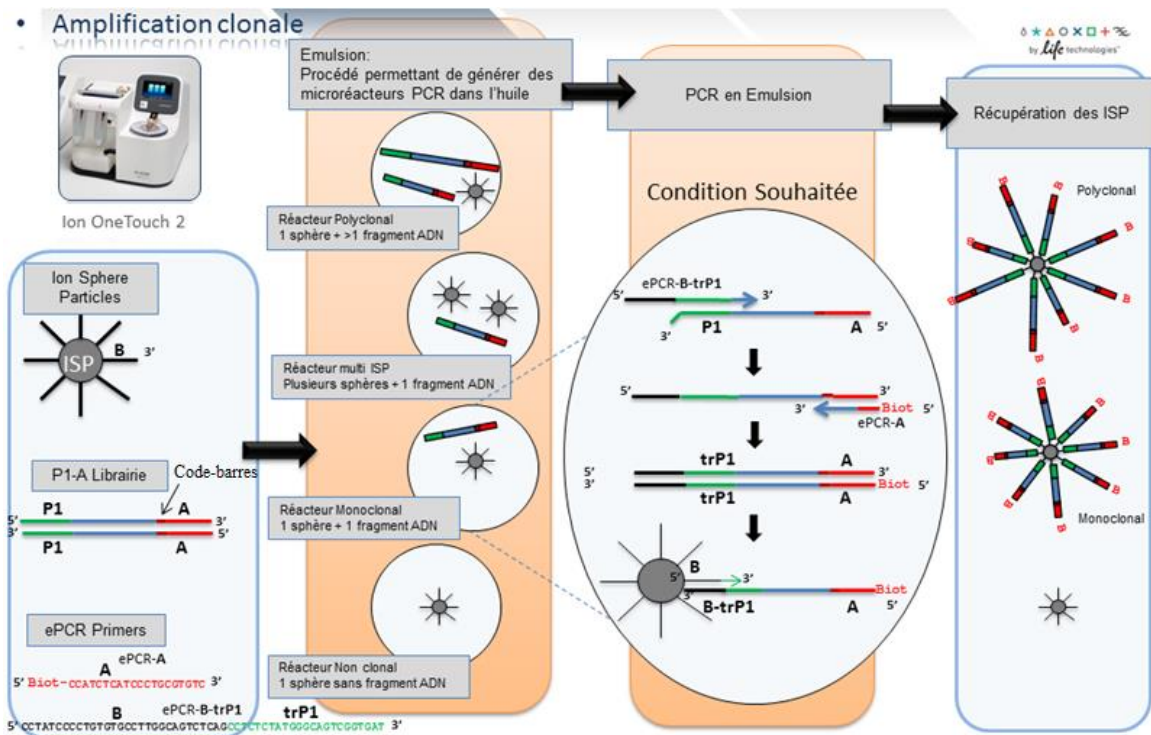


Figure 15 : Principe de la PCR émulsion

L'étape d'enrichissement est réalisée par l'automate Ion One Touch™ Enrichissement System (Life Technologies). L'amorce ePCR-A biotinyllée est captée par des billes recouvertes de streptavidine. Une étape de lavage permet d'éliminer les ISP nues, suivie d'une étape de dénaturation de l'ADN par la soude permettant de récupérer des ISP recouvertes de fragments monobrin (Fig.16).

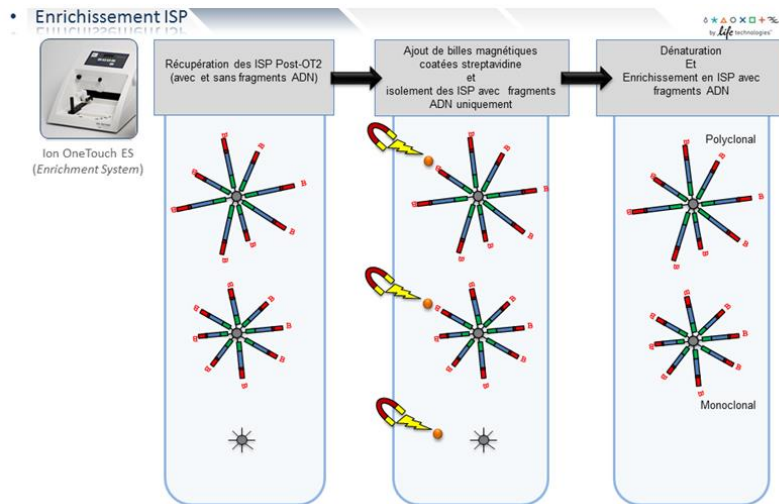


Figure 16 : Principe de l'enrichissement en ISP

7.2.3 Réaction de séquençage sur Ion proton™

A la différence des autres séquenceurs basés sur la détection lumineuse ou fluorescente associée à la libération de pyrophosphate, la technologie Ion Proton™ repose sur la détection d'ions H^+ libérés lors de l'incorporation d'un nucléotide dNTP (désoxynucléotide triphosphate) par la polymérase (Fig.17).

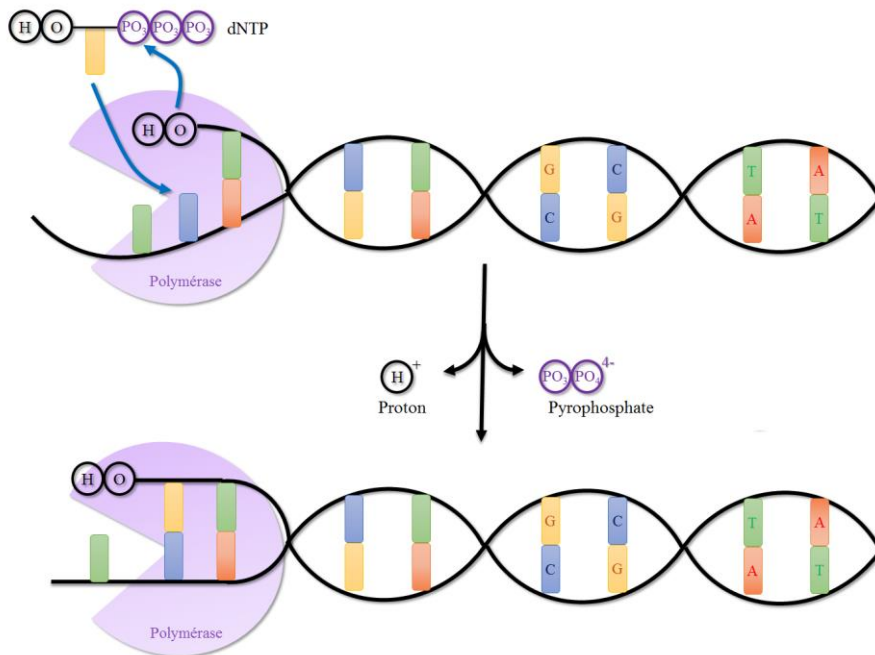


Figure 17 : Réaction d'incorporation d'un nucléotide par la polymérase

Le phénomène entraîne une modification du pH pouvant être détectée par une puce semi-conductrice constituée de plusieurs millions de puits. Cette méthode utilise le séquençage par synthèse, l'automate inonde tour à tour la puce contenant l'ADN avec un des 4 nucléotides. Les nucléotides sont incorporés l'un après l'autre, sans terminaison de chaîne. (Fig.18)

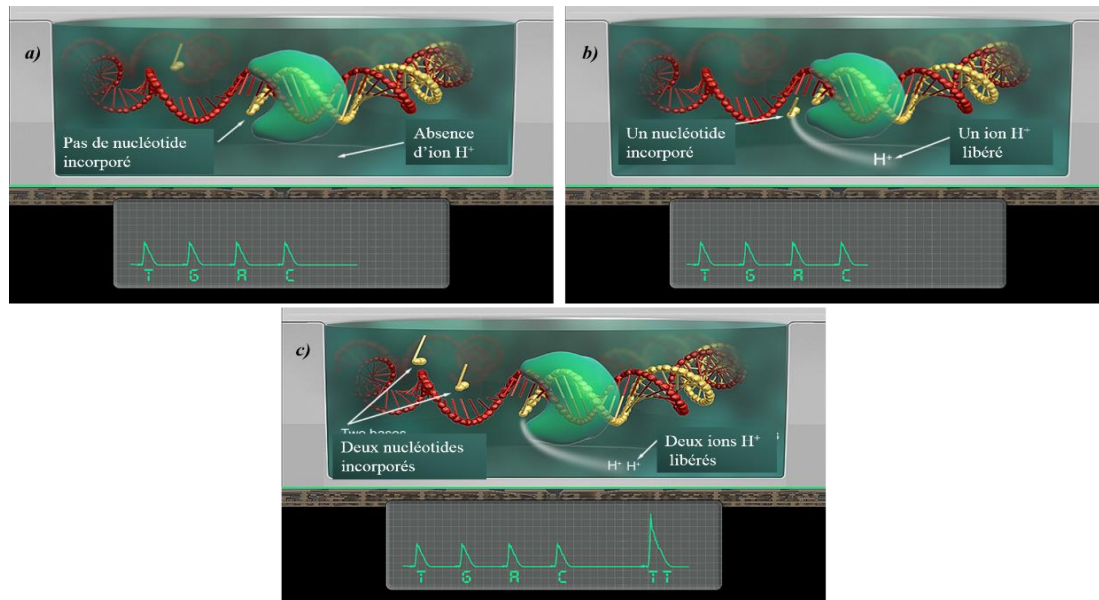


Figure 18 : Principe du IonProton™ a) la base proposée n'est pas incorporée, pas d'émission de signal b) le dNTP proposé est incorporé dans le brin d'ADN en formation, un ion H⁺ est libéré transformé en signal électrique c) Deux dNTP identiques sont incorporés, deux ions H⁺ sont libérés le voltage double et est transformé en signal électrique.

En amont de l'étape de séquençage, une étape d'initialisation de l'automate Ion Proton™ est requise, l'étape critique étant l'ajustement du pH des différents réactifs de l'appareil (programme « Auto-pH »). Des billes « ISP contrôles » sont ajoutées aux ISP purifiées, constituant un contrôle interne de qualité du séquençage. Le mélange d'ISP, les amorces de séquençage et la polymérase sont chargés sur la puce Ion Chip 316™ v2 selon les recommandations du fournisseur. Un puits est normalement comblé d'une seule ISP. Le séquençage s'effectue à partir du bord libre de l'ADN fixé en direction de l'ISP grâce à des amorces ciblant l'adaptateur A.

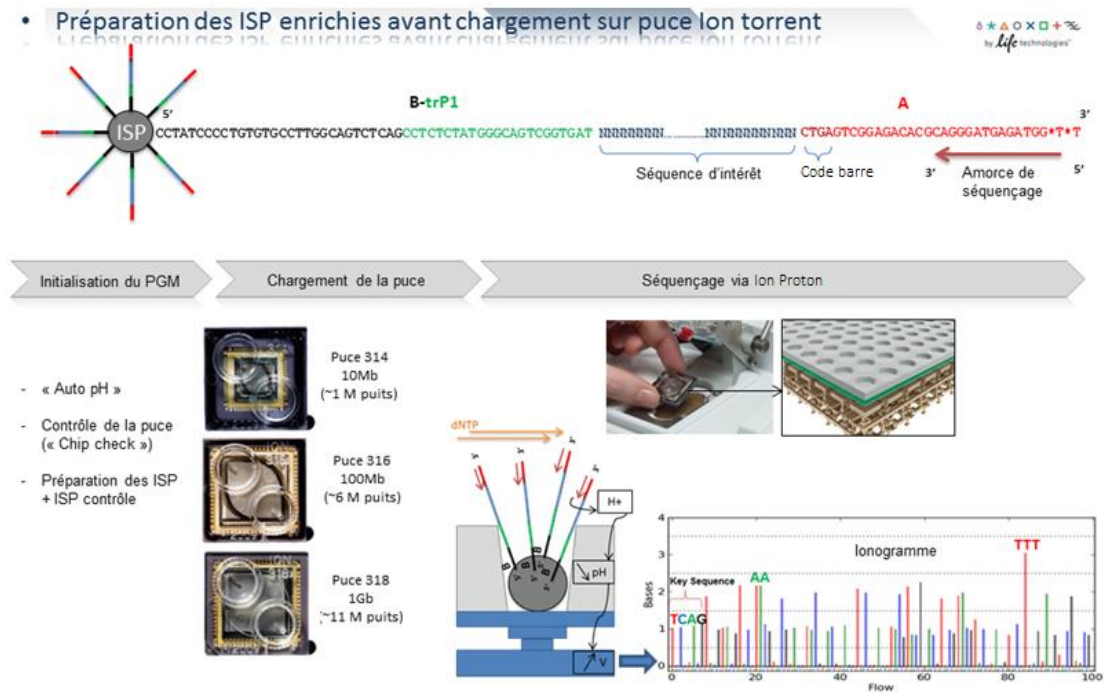


Figure 19 : Principe et processus du séquençage sur Ion Proton

7.2.4 Analyse bioinformatique

A l'issue du « run » de séquençage, les fichiers regroupant l'ensemble des données brutes (ionogrammes, fichier .well) ont été transférés du IonProton™ vers le *Torrent Server* où ils sont traités par le programme *Torrent Suite*. L'algorithme de « *base calling* » permet la conversion des données sous forme de lettres en séquences (A,T,C,G) formant des millions de séquences ou « *reads* » (séquence au format .fasta) associées à un score de qualité pour chaque base incorporée (Score *Phred* relié de façon logarithmique à la probabilité d'erreur d'identification d'une base), les deux types de données étant associés dans un fichier .fastq.

Deux approches, *de novo* et *mapping* ont été envisagées pour l'alignement des séquences obtenues, avec le logiciel MIRA (*Mimicking Intelligent Read Assembly*).

L'alignement *de novo*, permet de reconstruire le génome en générant des contigs par le recouplement de séquences chevauchantes des différents reads (Fig.20). Les contigs obtenus (en format .fasta) sont non chevauchants (séparés par des « gaps ») et peuvent être liés ensemble dans un « *scaffold* ».

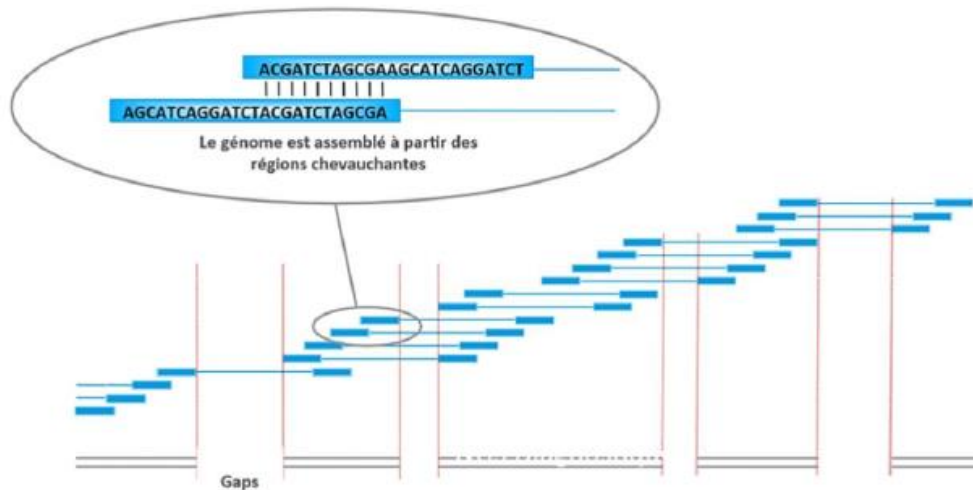


Figure 20 : Principe de l'alignement de novo

L'alignement « *mapping* » consiste à aligner directement les *reads* sur un génome de référence connu (Fig.21). Nous avons utilisé en premier lieu le génome de *S. Enteridis* (NC_011294), puis le génome d'une souche américaine de *S. Montevideo* récemment ajouté à la GenBank (CP007530).

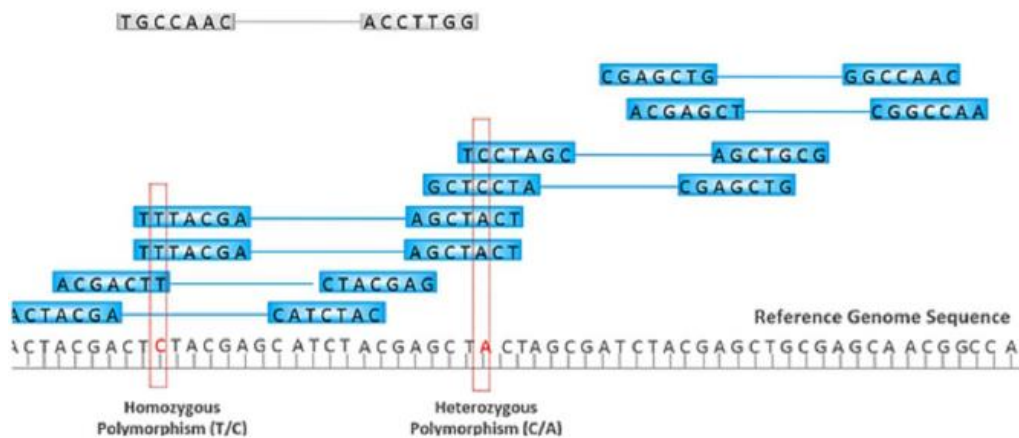


Figure 21 : Principe de l'alignement *mapping* contre un génome de référence

Les contigs générés ont été analysés, assemblés et annotés grâce au logiciel Geneious.

La détection *in silico* du type de plasmide a été réalisée grâce au module en ligne PlasmidFinder 1.2 du site Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org>) (92). Le sous-typage des plasmides a été obtenu grâce au module pMLST 1.3 (*plasmid* MLST) (92). L'identification des contigs

contenant des gènes de résistance a été réalisée avec le module ResFinder 2.1 (93) et la détermination *in silico* du profil MLST grâce au module MLST 1.7 (94).

L'alignement des génomes de Lo et D ou des plasmides été réalisée à l'aide du logiciel Mauve (95). Cet outil d'alignement de génomes est basé sur la détection de régions génomiques conservées et permet de mettre en évidence les réarrangements et inversions entre plusieurs génomes ou plasmides.

8. Analyses effectuées par le CNR

Toutes les souches de *Salmonella* Montevideo ont été envoyées au Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris). Outre la confirmation du sérotypage et des antibiogrammes, le CNR a réalisé des analyses spécialisées : la comparaison des souches par PFGE, la caractérisation du type et de la taille des plasmides et enfin le CRISPR-typing.

8.1. Comparaison des souches par PFGE

Les souches ont été caractérisées par électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction de l'ADN total avec l'enzyme *XbaI* selon le protocole Foodnet (96).

8.2. Caractérisation des plasmides

Des expériences de conjugaison ont été réalisées à partir de 2 souches épidémiques : C3 et A11, en milieu solide sur la souche réceptrice *E. coli* K12J5 résistante à l'azide de sodium. Les concentrations des milieux solides sélectifs étaient de 2 mg/L de ceftriaxone ou 16 mg/L de kanamycine. Après extraction des plasmides, le groupe d'incompatibilité a été obtenu par «*PCR-based replicon typing* » selon Caratolli *et al.* (97). La détermination de la taille du plasmide a été estimée par PFGE après digestion par l'endonucléase S1 (98).

8.3. Détermination du type CRISPR

Les salmonelles possèdent deux *loci* CRISPR (CRISPR1 et CRISPR2) qui diffèrent par leur séquence et leur nombre de « *spacers* » et de « *repeats* ». L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR a été obtenue par PCR suivie d'un séquençage Sanger.

Résultats

1. Description de l'épidémie

Rétrospectivement, l'épidémie a en réalité débuté en novembre 2011, avec l'isolement concomitant de souches de *S. Montevideo* multirésistantes chez 2 enfants La et Al. Les souches La1 et La2 ont été isolées de la même coproculture d'un enfant hospitalisé dans l'unité Mère-enfant du CH et la souche Al1 a été isolée par un autre laboratoire dans une région limitrophe du CH. Une nouvelle coproculture réalisée chez le même enfant en février 2012 a objectivé la présence d'une souche Al2 présentant un phénotype de résistance aux antibiotiques différent.

Quatre cas groupés de salmonelloses à *S. Montevideo* chez des nourrissons séjournant dans la même unité Mère-enfant en avril et mai 2012 donneront l'alerte, malgré des phénotypes de résistance différents (souches M, Z, D, C1, C2, C3). La souche D était une souche totesensible associée à la présence d'une autre entérobactérie BLSE (*K. oxytoca*). Après recoupement des données, les enfants Al et La avaient séjourné dans la même unité 7 mois auparavant.

Parallèlement une étude rétrospective a permis de mettre en évidence un cas, supposé index, en novembre 2010, chez une personne âgée Lo, hospitalisée au sein du même CH dans une autre unité.

Six mois plus tard, un nouveau cas était détecté chez un enfant hospitalisé (E) dans un autre centre hospitalier de Limoges. Cet enfant avait séjourné plusieurs mois auparavant dans l'unité Mère-enfant du CH. L'épidémie s'est poursuivie en avril 2013 avec la survenue de 3 cas groupés d'enfants (Ar, An, Ai) conduisant à la mise en place de prélèvements à visée de dépistage chez le personnel médical de l'unité et à l'identification d'un porteur sain de *S. Montevideo* parmi les membres du personnel (P).

En septembre 2013, 2 souches totesensibles ont ensuite été mises en évidence chez un nourrisson (Ang) et sa mère (G). Des recherches systématiques d'entérobactéries multirésistantes dans les selles des enfants hospitalisés dans l'unité ont permis de mettre en évidence plusieurs entérobactéries BLSE. Enfin en octobre 2013, deux derniers cas (Lil et Cl) ont été détectés, dont un enfant présentant 2 souches de *S. Montevideo*, une sensible (Cl1) et une multirésistante (Cl2).

Un seul des 105 prélèvements environnementaux réalisés en novembre 2013 par le LNR a identifié une souche totesensible de *S. Montevideo* sur le sol de la chambre d'un enfant porteur toujours hospitalisé. La très grande majorité de ces cultures mettait en évidence la présence de bactéries environnementales de type *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp. Une entérobactérie multirésistante a été mise en évidence dans 17 prélèvements. Il s'agissait toujours d'un *E. cloacae*. Parmi ces 17 isolats, 7 produisaient une BLSE et 10 produisaient une céphalosporinase déréprimée.

Au total, entre novembre 2010 et octobre 2013, 23 souches ont été isolées chez 17 patients, dont 20 souches chez 14 enfants (Fig.22, Tab.7). Les symptômes allaient de simples troubles digestifs à de la diarrhée. Une résolution spontanée sans traitement a toujours été observée. Aucun décès ni complications n'ont été rapportés, néanmoins, plusieurs enfants sont restés porteurs pendant plusieurs mois.

2. Clonalité des souches de *Salmonella* Montevideo

2.1 PFGE

Sur 19 souches testées, toutes présentaient le même profil PFGE. Les isolats sauvages présentaient le même pulsotype que les isolats résistants. Par ailleurs, la souche du patient supposé index Lo présentait également le même profil.

Les résultats du CNR indiquent que ces souches présentaient le même profil que des souches épidémiques isolées en France fin 2009-début 2010 et dont l'étiologie n'a pas été retrouvée.

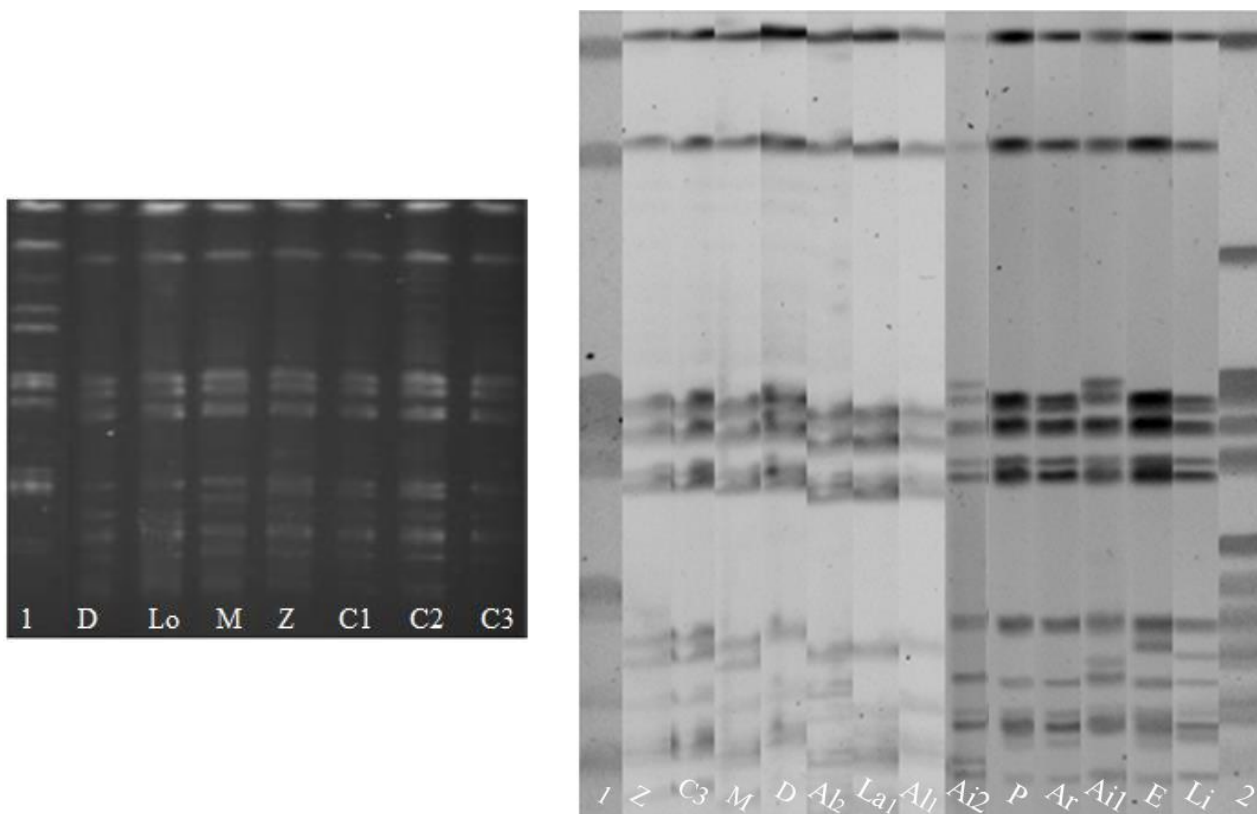


Figure 23 : Profil PFGE de 19 souches de *S. Montevideo* de l'épidémie "Limoges"
1 et 2 correspondent à des souches de *S. Montevideo* d'une autre origine.

2.2 MLST

L'analyse *in silico* obtenue par NGS des 7 gènes de ménages, *aroc*, *dnan*, *hemd*, *hisd*, *pure*, *suca*, *thra*, indique que les 10 souches dont le génome a été séquencé, appartiennent au *sequence type* ST4. A noter que la seule souche américaine de *S. Montevideo* dont le génome a été entièrement séquencé appartient à un ST différent (ST316).

2.3 Analyse des CRISPR

La taille des *loci* CRISPR était identique pour toutes les salmonelles de notre étude : la région CRISPR-1 était de 600pb et CRISPR-2 de 1800pb. Les 8 souches de l'épidémie analysées (Lo, La1, A11, D, C3, Ar, P, G) présentaient le même profil CRISPR A1-B1 alors qu'une souche sporadique isolée en 2011 dans une autre région française avait le profil A2-B3. Le contenu des *spacers* est détaillé dans le tableau 9.

Souche	CRISPR 1		CRISPR2	
	taille (profil)	Spacers	taille (profil)	Spacers
Lo	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
Al1	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
La1	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
C3	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
D	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
Ar	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
P	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
G	600 (A1)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon43	1800 (B1)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB59-MonB60-MonB61-MonB46-MonB47-MonB48-MonB49-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54
2011-04062	1800 (A2)	Mon21 var1-Mon39-Mon40-Mon41-Mon42-Mon44-Alt30-Mon68-Mon69-Mon70-Mon71-Mon72-Mon81-Mon92-Mon73-Mon45-Mon74-Mon75-Mon76-Mon77-Mon45-Mon46-Mon47-Mon43	1500 (B3)	JavB1-MonB39-MonB40-MonB41-MonB42-MonB43-MonB44-MonB45-MonB56-MonB57-MonB58-MonB61-MonB50-MonB51-MonB52-MonB53-MonB54

Tableau 9 : Composition des *loci* CRISPR 1 et 2 de 8 souches de *S. Montevideo* de l'épidémie
La souche 2011-04062 est une souche sporadique isolée à Colmar en 2011.

2.4 Comparaison des génomes de Lo et D

Le caractère clonal des souches isolées chez les enfants étant certain, nous avons concentré notre analyse de comparaison des génomes entre la souche D (souche isolée fin 2011 chez un enfant) et la souche Lo (autre souche isolée fin 2010 chez un sujet âgé hospitalisé dans une autre unité du CH). Ces souches présentaient de plus l'avantage d'être totosensibles et donc de ne pas héberger, *a priori*, de plasmide portant de gènes de résistance, limitant ainsi leur patrimoine génétique. Grâce au NGS, la taille des génomes des souches Lo et D a été estimée à environ 4,6 Mb. En alignant, à l'aide du logiciel Mauve, les *reads* issus de ces 2 génomes au génome de *S. Montevideo* disponible dans la Genbank (CP007530), on observe plus de 27000 SNP entre Lo ou D et *S. Montevideo* CP007530 (Fig.24). Les souches Lo et D ne présentent que 424 SNP entre eux suggérant une proximité phylogénétique proche.

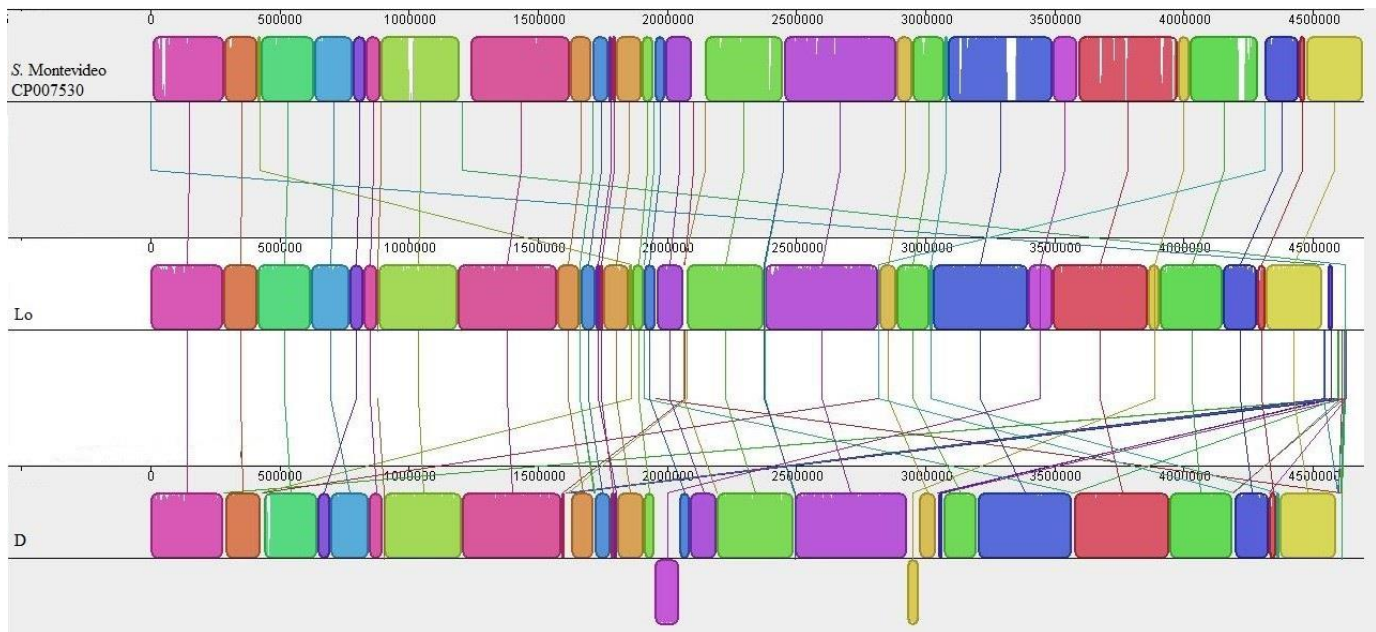


Figure 24 : Alignement des génomes Lo, D et CP007530 (*Mauve algorithme*)

Les blocs colorés représentent les régions homologues entre les génomes, les régions colorées en blanc représentent les régions de faibles homologies.

3. Sensibilité aux antibiotiques

Au total, 9 profils de sensibilité aux antibiotiques ont été mis en évidence chez les différentes souches de salmonelles isolées.

Tableau 10 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des salmonelles

A : ampicilline, Cro : ceftriaxone, Caz : ceftazidime, Nal : acide nalidixique, S : streptomycine, Sp : spectinomycine, Sul : sulfamides, Tmp : triméthoprime, Te : tétracycline, C : chloramphénicol

*souches isolées de patients adultes ; ** souche isolée de l'environnement.

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
Profil 1 : Sensible											
Lo*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
An	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ang	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
G*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lil	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cl1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Env**	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Profil 2 : ACro SSpTG Sul (BLSE)											
C1	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	S
La2	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	S
Profil 3 : Nal SSpTG Sul Te											
C2	S	S	S	I	R	R	I	R	S	R	S
Profil 4 : ACro SSp Sul Tmp (BLSE)											
E	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S
Profil 5 : ACro SSpTG Sul Tmp C (BLSE)											
A11	R	R	S	S	R	R	I	R	R	S	R
Profil 6 : ACro SSpTG Sul Te (BLSE)											
A12	R	R	S	S	R	R	I	R	S	R	S
Profil 7 : ACro Nal SSpTG Sul Tmp Te C (BLSE)											
M	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
La1	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
C3	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
Z	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
Li	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
Cl2	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
Profil 8 : A SSp Tmp Te C (Pénicillinase bas niveau)											
Ai1	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
Profil 9 : ACroCaz SSpGTN Sul Tmp Te C (Céphalosporinase plasmidique)											
Ai2	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R

Les entérobactéries isolées dans les selles présentaient majoritairement le profil de résistance n°7. Toutes les souches d'*E. cloacae* (Env-Ec1 à 7) isolées de l'environnement présentaient également le profil n°7. Des profils 10 et 11 ont par ailleurs été observés chez 3 entérobactéries isolées de selles, différant uniquement du profil 7 par la sensibilité à la tétracycline ou aux fluoroquinolones respectivement.

Tableau 11 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries multirésistantes

A : ampicilline, Cro : ceftriaxone, Caz : ceftazidime, Nal : acide nalidixique, S : streptomycine, Sp : spectinomycine, Sul : sulfamides, Tmp : triméthoprime, Te : tétracycline, C : chloramphénicol

* souche isolée de l'environnement.

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
Profil 2 : ACro SSpTG Sul (BLSE)											
Ang-Eh	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	S
Lil-Kp	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	S
Profil 5 : ACro SSpTG Sul Tmp C (BLSE)											
Ar-Ec	R	R	S	S	R	R	I	R	R	S	R
Profil 7 : ACro Nal SSpTG Sul Tmp Te C (BLSE)											
D-Ko	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
An-Ko	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
Ar-Ko	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R
P-Ko	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R
Ai-Ko	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R
Cl-Ec	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Lil-Ec	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R
Lil-Eh	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Env- Ecx*	R	R	S/I/R	R	R	R	R	R	R	R	R
Profil 10 : ACro Nal SSpTG Sul Tmp C (BLSE)											
E-Ec	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	R
Cl-Ec	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	R
Profil 11 : ACro SSpTG Sul Tmp Te C (BLSE)											
Ang-Cs	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R

4. Caractérisation des supports génétiques de la résistance

4.1 qPCR intégron

Toutes les souches de salmonelles présentant une résistance acquise étaient positives pour la recherche d'intégron de classe 1 en qPCR. Aucun intégron de classe 2 ou 3 n'a été mis en évidence.

Les souches d'entérobactéries BLSE étaient également toutes positives pour la recherche d'intégrons de classe 1.

4.2 Gènes de résistance

Pour chaque souche, les gènes de résistances retrouvés sont répertoriés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Gènes de résistance mis en évidence pour chaque souche de salmonelles et famille d'antibiotiques

Profil	β-lactamines	Aminosides	Quinolones	Tmp	Sul	Te	C
2/ C1	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	-	-	<i>sul1</i>	-	-
3/ C2	-	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	-	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>	-
4/ E	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadA</i> ₂	-	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>	-	-
5/ Ai1	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	-	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>	-	<i>catA</i> ₁
6/ Ai2	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	-	-	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>	-
7/ C3	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>	<i>catA</i> ₁
8/ Ai1	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>strA</i> , <i>strB</i>	-	<i>dfrA</i> ₁₉		<i>tetD</i>	<i>catA</i> ₂
9/ Ai2	<i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{DHA-1}	<i>strA</i> , <i>strB</i> <i>aacIIb</i> ; <i>aacA</i> ₃	<i>qnrB</i> ₄	<i>dfrA</i> ₁₉	<i>sul1</i>	<i>tetD</i>	<i>catA</i> ₂

Les gènes de résistances retrouvés chez différentes entérobactéries BLSE isolées des coprocultures et de l'environnement sont répertoriés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Gènes de résistances mis en évidence dans les entérobactéries BLSE

* souche isolée de l'environnement.

	β-lactamines	Aminosides	Quinolones	Tmp	Sul
D-Ko	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>
Ar-Ko	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>
Ar-Ec	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	-	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>
An-Ko	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>
P-Ko	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>
Ai-Ko	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>
Env-Ecx*	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>aadB</i> , <i>aadA</i> ₂	<i>qnrA</i> ₁	<i>dfrA</i> ₁₆	<i>sul1</i>

Pour chacun des 9 profils observés chez les salmonelles, nous avons grâce aux PCR en point final et aux données du NGS tenter de caractériser, pour l'une des souches représentatives, les différents intégrons et les environnements génétiques des différents gènes de résistance. Toutes les résistances observées ont pu être reliées à un gène de résistance.

4.2.1 Profil 1 : sensible

Pour les souches totosensibles, aucun gène de résistance n'a été mis en évidence.

4.2.2 Profil 2 : ACro SSpTG Sul (BLSE) - Souche C1 (Fig.25)

La souche C1 héberge un intégron complexe. Le réseau comporte la cassette *aadB* codant une adényltransférase (ANT(2'')) conférant la résistance à la kanamycine, à la tobramycine et à la gentamicine, suivie de la cassette *aadA2* codant une adényltransférase (ANT(3'')) inactivant la streptomycine et spectinomycine. En aval de la région 3'CS, la recombinase ISCR1 est suivie du gène *bla_{CTX-M-9}* codant une BLSE. L'expression des cassettes est sous le contrôle d'un promoteur hybride, PcH1, localisé dans le gène de l'intégrase. Le promoteur P2 est quant à lui inactif car les hexamères -35 et -10 ne sont séparés que par 14 nucléotides. En amont de l'intégron est par ailleurs retrouvé un transposon apparenté au Tn21 : un gène *tnpA* codant une transposase associé une résolvase *tnpR* orienté dans le même sens. Aucun autre gène de résistance n'est observé en dehors de l'intégron.

4.2.3 Profil 3 : Nal SSpTG Sul Te - Souche C2 (Fig.26)

La souche C2 possède un intégron complexe associant le réseau de cassettes *aadB-aadA2* sous la dépendance du promoteur PcH1. Une IS26 est insérée dans la région ISCR1. En aval d'ISCR1 est présent le gène *qnrA1* conférant une résistance à l'acide nalidixique par protection de la cible. Ce gène *qnrA1* est associé en aval au régulateur *ampR* des céphalosporinases AmpC. Une duplication de la région 3'CS est immédiatement suivie d'une IS6100 puis de l'opéron *mer* qui confère une résistance au mercure. La souche exprime également une résistance aux tétracyclines conférée par le gène *tetA*, associé à son répresseur entre deux séquences IS26.

4.2.4 Profil 4 : ACro SSp Sul Tmp (BLSE) - Souche E (Fig.27)

La souche E héberge un intégron complexe. Le gène de l'intégrase est interrompu à son extrémité terminale par une IS26. Le réseau associe la cassette *dfrA16* codant une dihydrofolate réductase conférant la résistance au triméthoprime et la cassette *aadA2*. Il est associé en aval de la 3'CS à une région ISCR1 et au gène *bla_{CTX-M-9}*. Aucun autre gène de résistance n'a été observé en dehors de l'intégron.

Profil 2 : ACro SSpTG Sul (BLSE)

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
C1	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	S
	<i>bla_{CTX-M-9}</i>				<i>aadA₂</i>		<i>aadB</i>	<i>sul1</i>			



Figure 25 : Intégron de la souche C1
hp : protéine hypothétique, *tnpA* : transposase ; *tnpR* : résolvasse

Profil 3 : Nal SSpTG Sul Te

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
C2	S	S	S	I	R	R	I	R	S	R	S
				<i>qnrA₁</i>	<i>aadA₂</i>		<i>aadB</i>	<i>sul1</i>		<i>tetA</i>	

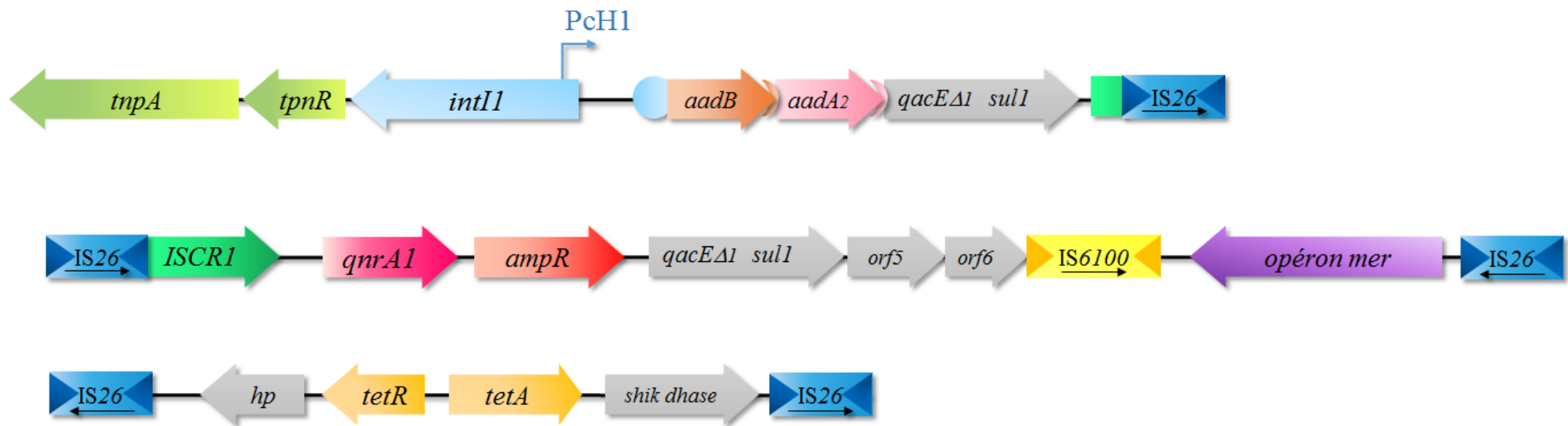


Figure 26 : Intégron et gènes de résistance retrouvés chez la souche C2

hp : protéine hypothétique ; opéron *mer* : opéron conférant la résistance au mercure ; *shik dhase* : shikimate déshydrogénase ; *tnpA* : transposase ; *tnpR* : résolvasse

Profil 4 : ACro SSp Sul Tmp (BLSE)

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
E	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S
	<i>bla_{CTX-M-9}</i>				<i>aadA₂</i>			<i>sul1</i>	<i>dfrA16</i>		

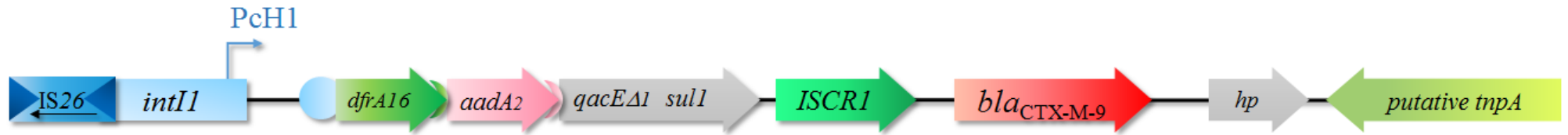


Figure 27 : Intégron de la souche E
hp : protéine hypothétique ; *tnpA* : transposase

4.2.5 Profil 5 : ACro SSpTG Sul Tmp C (BLSE) - Souche A11 (Fig.28)

La souche A11 possède 2 intégrons de classe 1 se différenciant notamment par leur réseau de cassettes. Le premier possède le gène *intI1* interrompu par une IS26. Le réseau associe les cassettes *dfrA16* et *aadA2*. Cet intégron possède en aval du réseau une région 3'CS suivie d'une IS6100 et de l'opéron *mer*. Le 2^e intégron comporte la cassette *aadB* suivie de la cassette *aadA2*. Cet intégron est associé à la présence en aval de la région 3'CS de la recombinase ISCR1 interrompue par une IS26. La région ISCR1 est associée en aval au gène *bla_{CTX-M-9}*. En amont de l'intégron est retrouvé le transposon apparenté au Tn21.

L'expression des gènes de cassettes des 2 intégrons est sous le contrôle d'un promoteur hybride PcH1.

A11 exprime une résistance au chloramphénicol conférée par le gène *catA1* encadré par 2 séquences d'insertion IS26.

4.2.6 Profil 6 : ACro SSpTG Sul Te (BLSE) - Souche A12 (Fig.29)

La souche A12 isolée à 4 mois d'intervalle, héberge le même intégron complexe qu'A11, portant les cassettes *aadB-aadA2*. Le gène *catA1* est absent. Comme chez C2, une séquence hébergeant le gène *tetA* et son répresseur est encadrée par deux IS26.

4.2.7 Profil 7 : ACro SSpTG Sul Tmp Te C (BLSE) - Souche C3 (Fig.30)

Les souches présentant le profil 7 telles que C3 hébergent deux intégrons complexes : l'intégron observé chez E (Profil 5) et l'intégron observé chez C2 (Profil 4). Les gènes *tetA* et *catA1* sont également présents, chacun encadré par une IS26 présentant la même organisation que les autres souches. Les 2 intégrons sont *a priori* portés par le même plasmide.

Profil 5 : ACro SSpTG Sul Tmp C (BLSE)

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
A11	R	R	S	S	R	R	I	R	R	S	R
	<i>bla_{CTX-M-9}</i>				<i>aadA₂</i>		<i>aadB</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrA16</i>		<i>catA1</i>

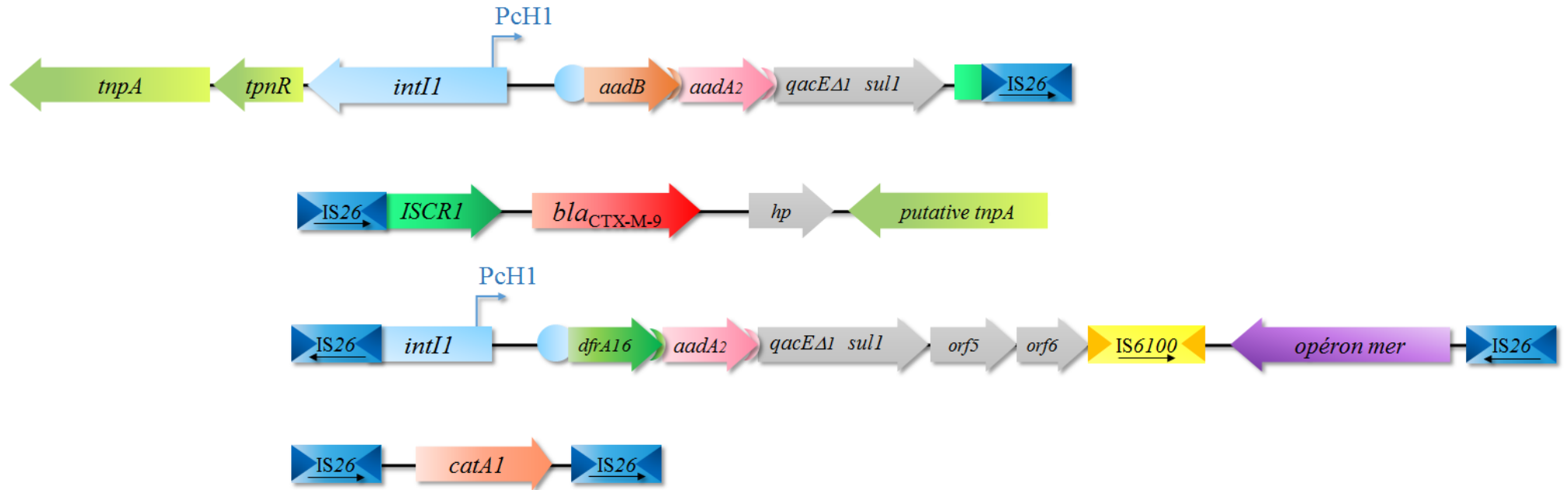


Figure 28 : Intégrons et gènes de résistance retrouvés chez la souche A11

hp : protéine hypothétique ; opéron *mer* : opéron conférant la résistance au mercure ; *tnpA* : transposase ; *tnpR* : résolvase

Profil 6 : ACro SSpTG Sul Te (BLSE)

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
AI2	R	R	S	S	R	R	I	R	S	R	S
	<i>bla_{CTX-M-9}</i>				<i>aadA₂</i>		<i>aadB</i>	<i>sulI</i>		<i>tetA</i>	

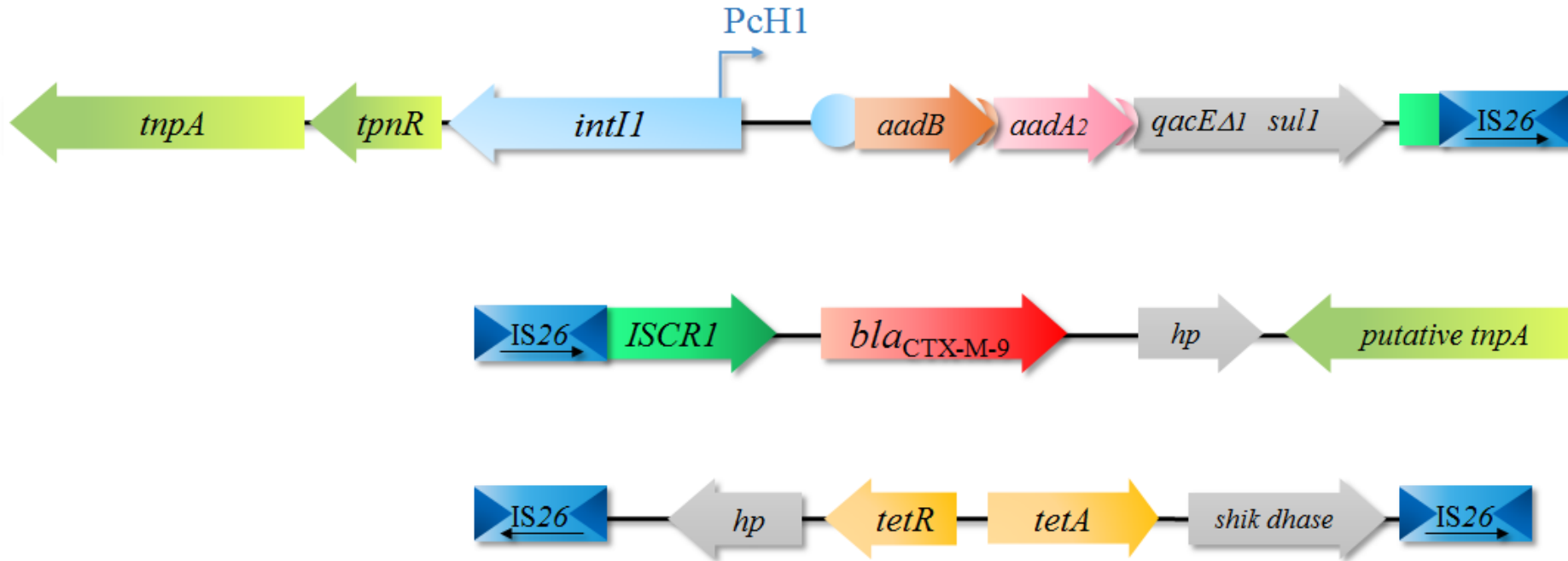


Figure 29 : Intégron et gènes de résistance retrouvés chez la souche AI2
hp : protéine hypothétique ; *shik dhase* : shikimate déshydrogénase ; *tnpA* : transposase ; *tnpR* : résolvasse

Profil 7 : ACro Nal SSpTG Sul Tmp Te C (BLSE)

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
C3	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
	<i>bla_{CTX-M-9}</i>			<i>qnrA₁</i>		<i>aadA₂</i>	<i>aadB</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrA16</i>	<i>tetA</i>	<i>catA1</i>

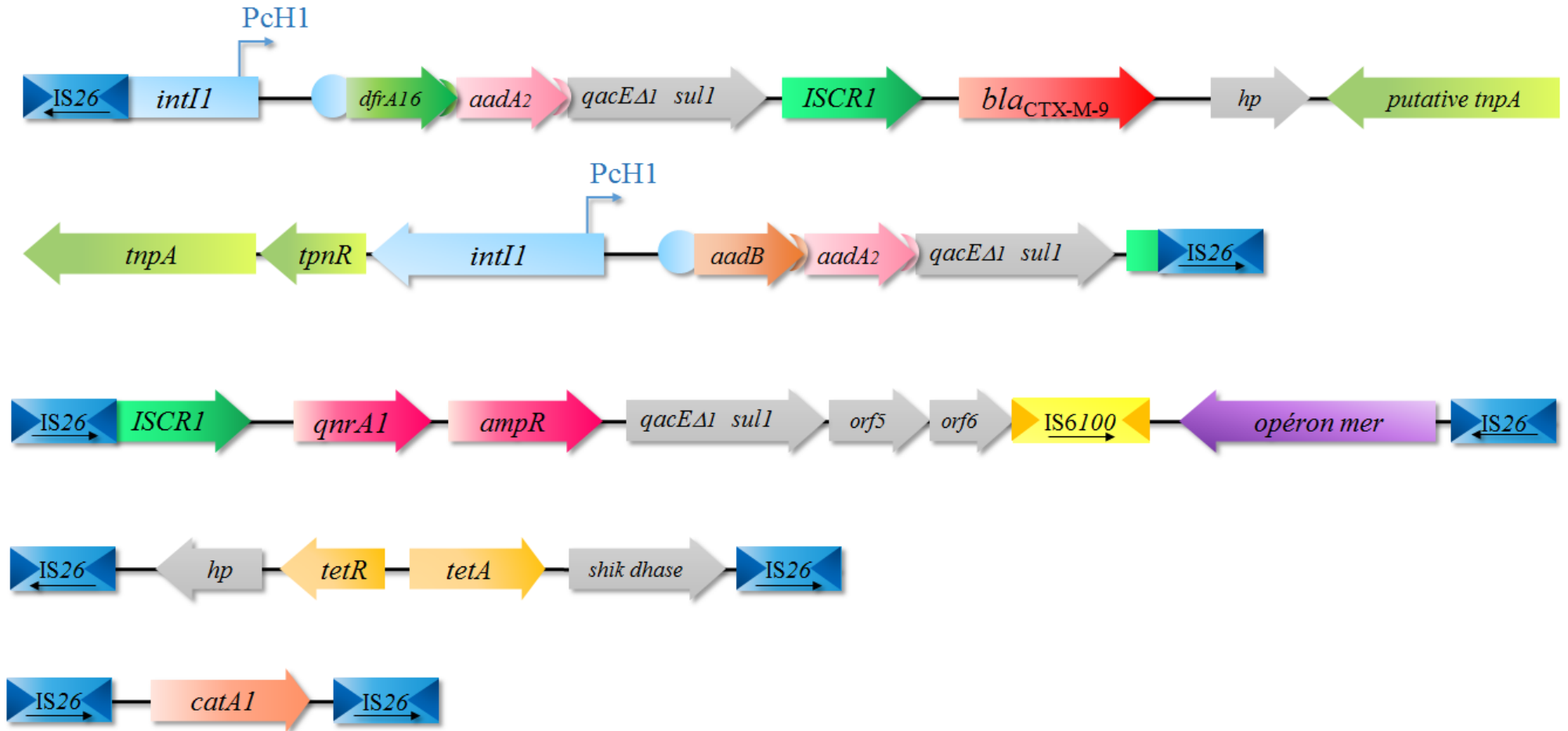


Figure 30 : Intégrons et gènes de résistance retrouvés chez la souche C3

hp : protéine hypothétique ; opéron *mer* : opéron conférant la résistance au mercure ; *shik dhase* : shikimate déshydrogénase ; *tnpA* : transposase ; *tnpR* : résolvasse

4.2.8 Profil 8 : A SSp Tmp Te C (Pénicillinase bas niveau) - Souche Ai1 (Fig.31)

La souche Ai1 a la particularité d'héberger un gène *intI1* intact, cependant la séquence du site *attI1* est tronquée au niveau du *spacer* de *PintI1* et le fragment inséré ne fournit pas de séquence -35 alternative. Le site de régulation LexA-box est toujours présent mais *a priori* il n'y pas de promoteur *PintI1* fonctionnel. Les gènes *strA/strB* codent une phosphotransférase modifiant la streptomycine et ne sont pas insérés dans une cassette, il n'y pas de motif *attC* en aval. Les gènes sont sous la dépendance d'un promoteur faible PcW_{TGN-10} . Cet intégron défectif est suivi d'une *IS6100*. En amont de l'intégrase est retrouvé le gène *dfrA19* (codant une dihydrofolate réductase conférant la résistance au triméthoprim) et une *ISCR1* interrompue par une *IS26*. Le gène *bla_{TEM-1}* est associé à l'opéron *mer* encadré par 2 transposases. Les gènes *tetD* et *catA2* sont retrouvés, *a priori* au niveau du plasmide, chacun encadrés par une *IS26*.

4.2.9 Profil 9 : ACroCaz SSpGTN Sul Tmp Te C (Céphalosporinase plasmidique) - Souche Ai2 (Fig.32)

La souche Ai2 a été isolée dans la même coproculture qu' Ai1. Elle présente le même intégron défectif et le même environnement génétique.

Elle possède par ailleurs un autre intégron complexe hébergeant les gènes *aac(6')-IIc*, codant une acétyltransférase conférant la résistance à la tobramycine, à la gentamicine et à la nétilmicine, suivi du gène *ereA2* codant une résistance à l'érythromycine tronquée par l'introduction d'une transposase. Cette transposase est suivie de gènes non hébergés dans des cassettes : *aac3* (aminosides acétyltransférase) et *arr* codant une résistance à la rifampicine. Les gènes sont sous la dépendance d'un promoteur faible PcW .

En aval de l'*ISCR1* se trouve une séquence de 16000 pb, comprenant notamment le gène *qnrB4* puis *bla_{DHA-1}* et son régulateur, puis une duplication du gène *qacEΔ1*.

Profil 8 : A SSp Tmp Te C (Pénicilline bas niveau)

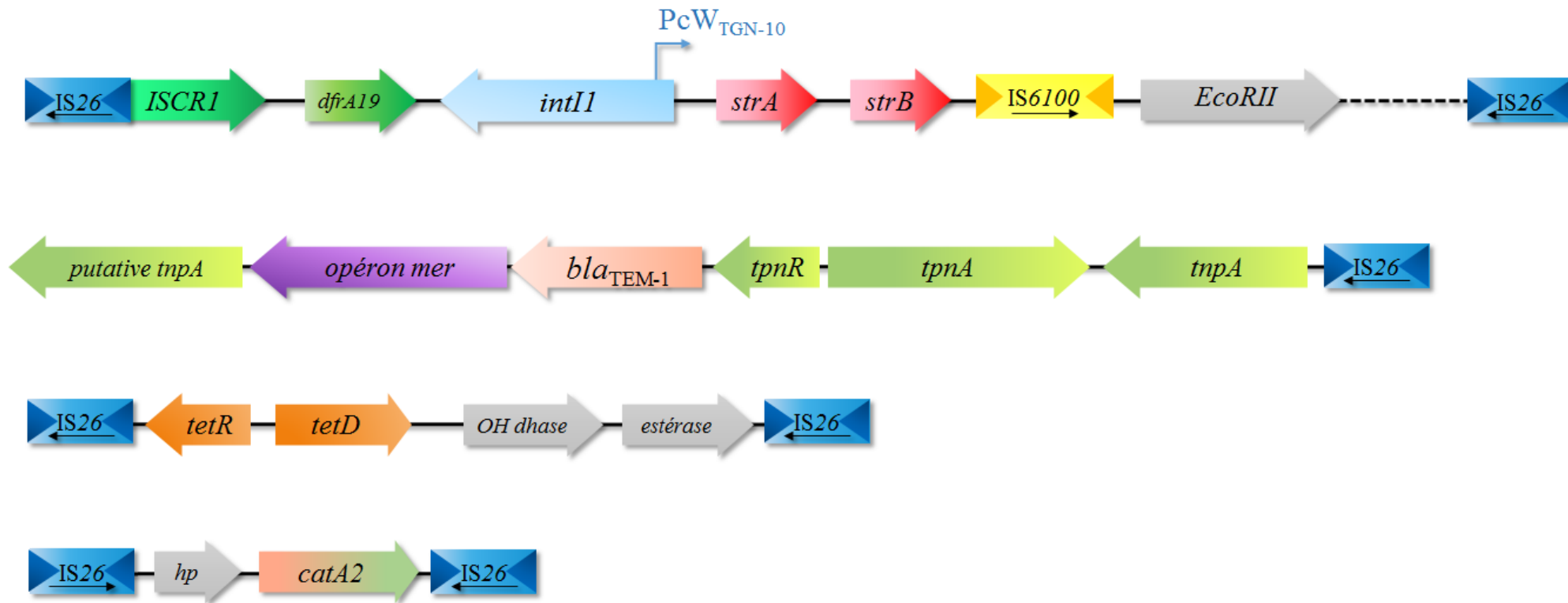
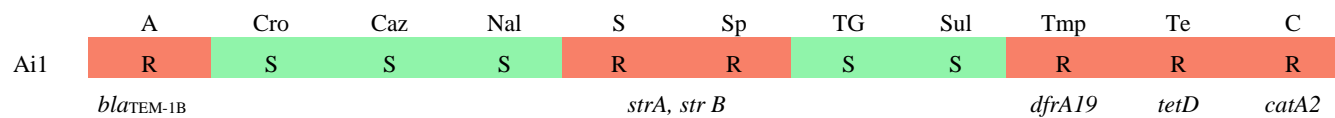


Figure 31 : Intégron et gènes de résistance retrouvés chez la souche Ai1

EcoRII : enzyme de restriction ; *hp* : protéine hypothétique ; *OH dhase* : alcool déshydrogénase ; opéron *mer* : conférant la résistance au mercure ; *tnpA* : transposase ; *tnpR* : résolvasse

Profil 9 : ACroCaz SSpGTN Sul Tmp Te C (Céphalosporinase plasmidique)

	A	Cro	Caz	Nal	S	Sp	TG	Sul	Tmp	Te	C
Ai2	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R
	<i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>bla_{DHA-1}</i>	<i>qnrB₄</i>		<i>strA, strB</i>		<i>aac(6')IIC</i> <i>aac3</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrA19</i>	<i>tetD</i>	<i>catA2</i>

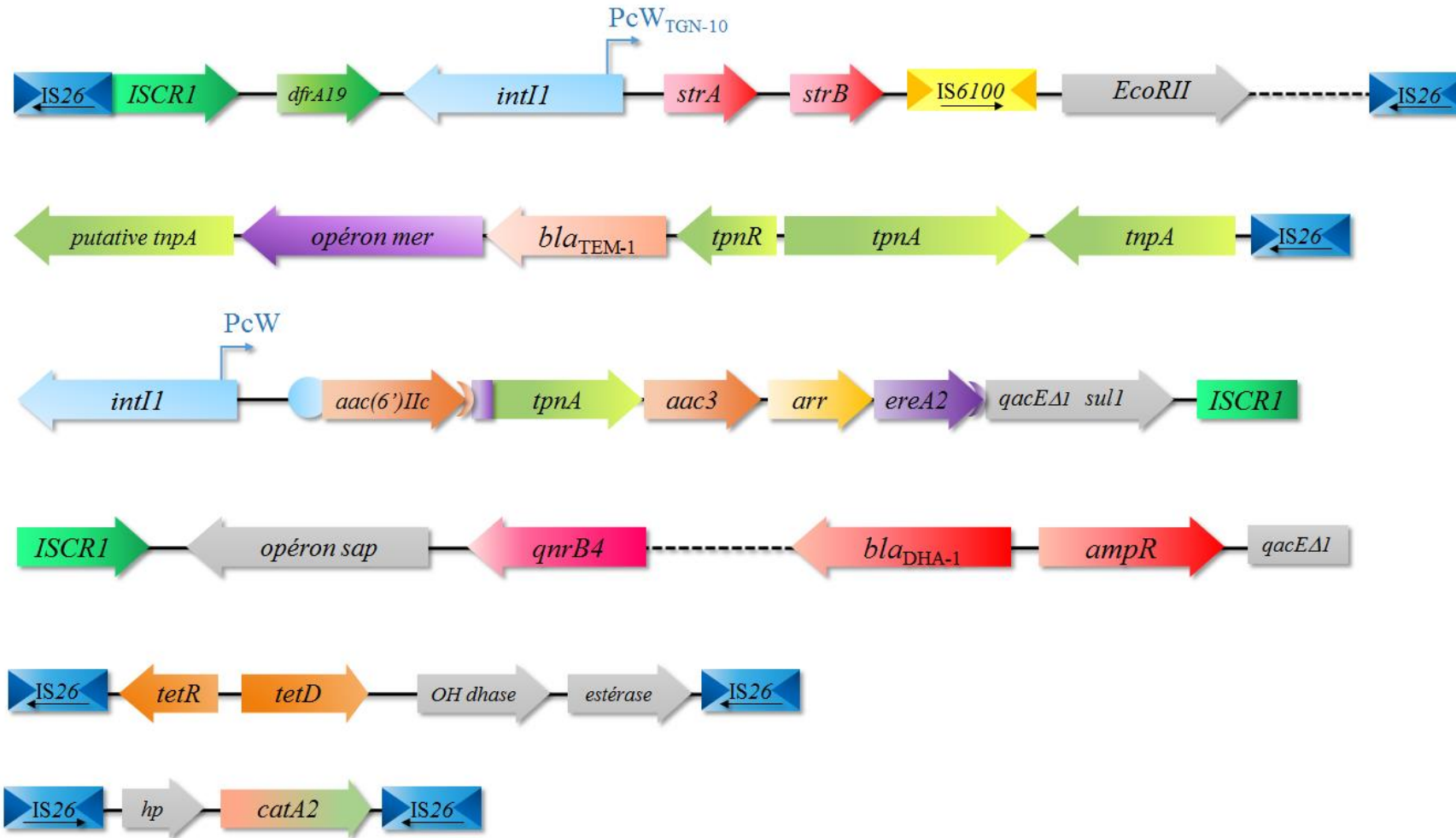


Figure 32 : Intégrons et gènes de résistance hébergés par Ai2

EcoRII : enzyme de restriction ; *OH dhase* : alcool déshydrogénase ; *hp* : protéine hypothétique ; opéron *mer* : conférant la résistance au mercure, opéron *sap* : ABC transporteur (*sensitivity to antimicrobial peptides*)

5. Détermination du plasmide

5.1 Résultats CNR

A partir de la souche C3 (profil : ACroNalSSpTGSulTmpCTe), 4 transconjugants ont été isolés à partir du milieu CRO 2 mg/l. A partir de la souche A11 (ACroSSpTGSulTmpC), un seul transconjugant a été obtenu sur le milieu kanamycine 16 mg/L. Au total, 5 transconjugants ont été analysés. Pour chacun, les profils ATB et les recherches de gènes par PCR étaient identiques aux souches de départ, suggérant un transfert en bloc de la résistance. Pour les 5 transconjugants, les intégrons de classe 1 ont été retrouvés.

Tableau 14 : Phénotypes de résistance et gènes de résistance mis en évidence pour les souches C3, A11 et leurs transconjugants

Souche	Profil de résistance	BLSE	<i>qnr</i>	Taille	Type
C3	ACroSSpKTGSulTmpCTeNal	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>qnrA</i> ₁	300kb	-
T1 _{C3}	ACroSSpSulTmpCTeNal	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>qnrA</i> ₁	300kb	HI2
T2 _{C3}	ACroSSpSulTmpCTeNal	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>qnrA</i> ₁	300kb	HI2
T3 _{C3}	ACroSSpSulTmpCTeNal	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>qnrA</i> ₁	300kb	HI2
T4 _{C3}	ACroSSpSulTmpCTeNal	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>qnrA</i> ₁	300kb	HI2
A11	ACroSSpTGSulTmpC	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	-	250kb	-
T1 _{A11}	ACroSSpTGSulTmpC	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	-	250kb	HI2

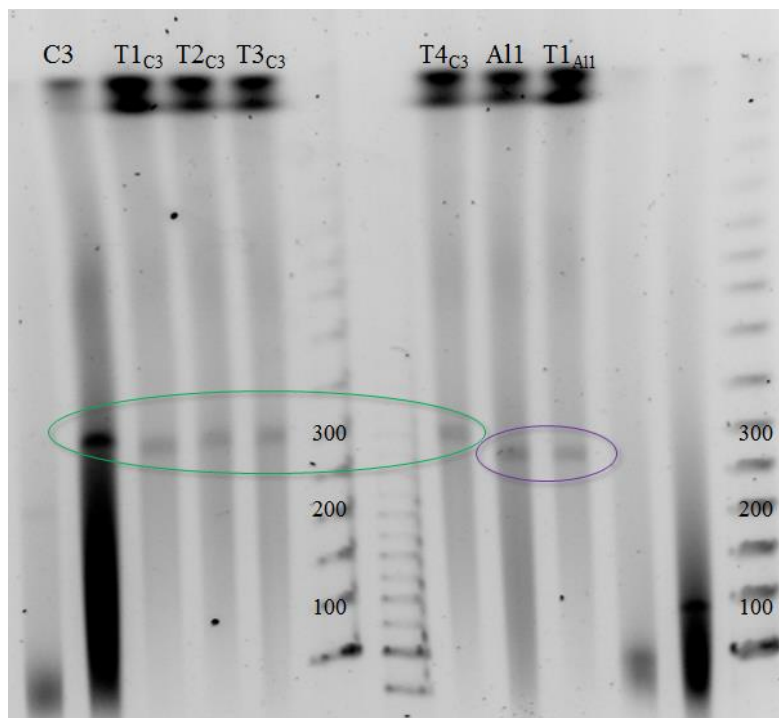


Figure 33 : Analyse des plamides extraits des souches C3, A11 et de leurs transconjugants respectifs

Le premier plasmide typé mis en évidence dans la souche C3 et ses transconjugants, est un plasmide conjugatif appartenant au groupe d'incompatibilité IncHI2, d'environ 300kb. Le plasmide mis en évidence chez A11 est également un plasmide IncHI2 de taille inférieure, environ 250kb.

5.2 Résultats du séquençage haut débit (NGS)

La détermination *in silico* du plasmide pour les souches C1, C2, C3, A11, A12, Ai1, Ai2, E et M rapporte également pour chacune des souches un plasmide de type IncHI2. Ces plasmides présentent le même sous type pMLST (pST-1 like).

La détermination de la séquence complète du plasmide IncHI2 n'a pu être réalisée que pour la souche C1 avec une taille d'environ 258kb. La taille des plasmides a pu être estimée pour les souches C2 et C3 ; elles sont respectivement de 270 kb et 300kb. Les plasmides retrouvés partagent des séquences hautement homologues entre eux. Comme le montre l'alignement présenté à la figure 34, le plasmide C1 présente par ailleurs une structure homologue à 3 plasmides IncHI2 décrits chez des *E. cloacae* multirésistants mais ne présentant pas les mêmes résistances (Genbank CP008825, EU855788, EU855787).

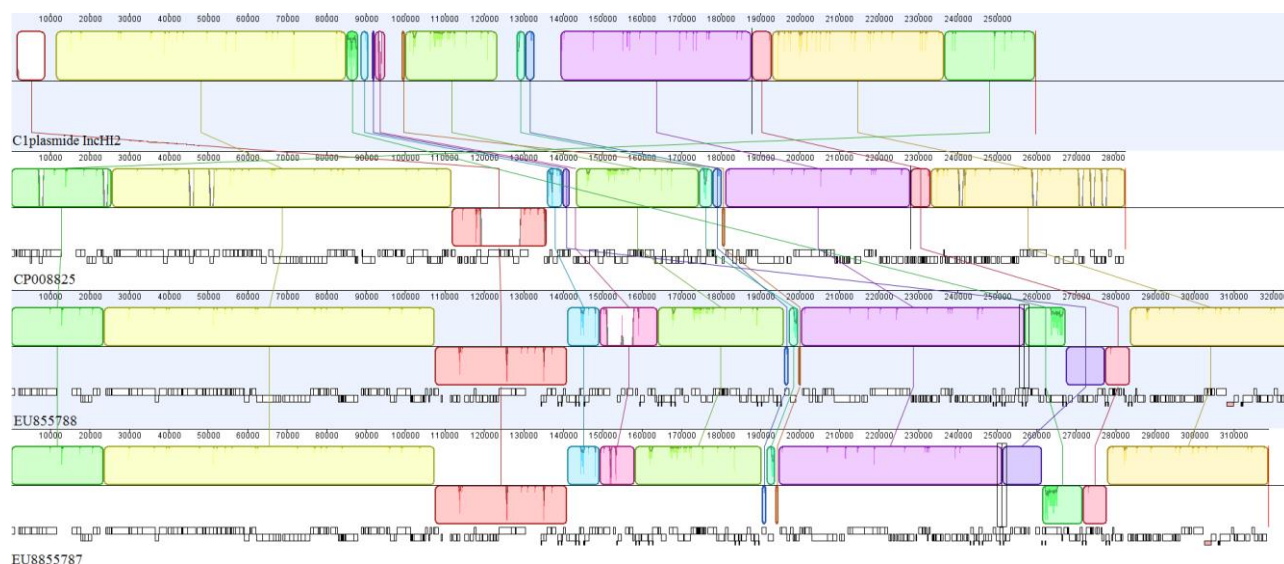


Figure 34 : Alignement du plasmide de C1 à 3 plasmides d'*E. cloacae* (*Mauve algorithm*)

Les blocs colorés représentent les régions homologues entre les génomes, les régions colorées en blanc représentent les régions de faibles homologies

Discussion

Entre 2011 et 2013, 14 cas de salmonelloses à *S. Montevideo* sont survenus chez des enfants de moins de 1 an hospitalisés dans une unité Mère-enfant d'un Centre hospitalier. L'originalité de cette épidémie était liée d'une part à son caractère hospitalier et d'autre part à la très grande dissemblance des profils de résistance aux antibiotiques des souches isolées. Trois autres cas ont par ailleurs été inclus dans notre étude : un cas adulte survenu dans le même CH un an auparavant, un portage sain d'un personnel soignant et un cas adulte chez la mère d'un des enfants.

L'objectif de cette étude était en premier lieu de comparer les souches de *S. Montevideo* afin d'affirmer leur caractère clonal, et ce malgré des phénotypes de résistance aux antibiotiques différents. Différentes approches moléculaires ont été appliquées pour affirmer la clonalité des souches isolées, notamment pour relier la souche Lo du patient adulte supposé index aux souches isolées chez les enfants. Les souches analysées par PFGE présentaient un pulsotype identique, celles séquencées en NGS présentaient le même profil MLST (ST4) et enfin un même profil CRISPR A1-B1 a été retrouvé pour 8 souches testées ; ces trois éléments indiquent que ces souches sont phylogénétiquement très proches. Dans la littérature, plusieurs études rapportent le faible pouvoir discriminant du MLST ou de la PFGE pour les sérotypes hautement clonaux tels que Typhimurium ou Enteritidis (99). Cependant, aucune autre souche de *S. Montevideo* reçue par le CNR-ESS entre 2011 et 2013 ne présentait le profil génétique des souches isolées à Limoges. Les différents travaux conduits par le CNR-ESS ont clairement démontré la clonalité de toutes les souches isolées à Limoges. Le NGS a montré que les génomes des souches totosensibles Lo et D ne divergent que très faiblement. Il est à noter en outre qu'il s'agit de résultats obtenus avec des séquences brutes. La technologie Ion Proton™ génère en effet beaucoup d'erreurs sur les homopolymères, surestimant probablement la distance entre les 2 génomes. Une étude plus précise des génomes obtenus par NGS et notamment des SNP permettrait de mieux caractériser l'évolution des souches lors de cette épidémie comme cela a pu être réalisé à plus grande échelle sur les souches de *S. Montevideo* lors de l'épidémie américaine liée au poivre importé (6).

Ces résultats confirment l'hypothèse épidémiologique déjà très forte d'une source commune hospitalière. Ces cas de salmonelloses chez des nourrissons constituent une véritable épidémie nosocomiale à *S. Montevideo*.

Généralement, la transmission des salmonelles se fait majoritairement par voie alimentaire, mais dans les services de soins, la transmission interhumaine est fréquemment incriminée ; de patient à patient ou par le personnel soignant (12) avec des durées d'épidémies généralement réduites à quelques mois ou semaines avec pour la majorité entre 10 et 50 cas (12). Dans notre étude, l'épidémie s'est déroulée en 2 phases successives, une première vague de cas en 2012 puis une seconde en 2013 espacée par un période de 6 mois sans cas recensé. Cette épidémie en 2 vagues peut s'expliquer par le renforcement des mesures d'hygiène au sein de l'unité à la suite de la première vague de cas. Certains nourrissons ont été présents dans l'unité aux mêmes périodes, mais aucun des enfants diagnostiqués en 2013 (sauf E) n'a *a priori* été en contact avec les autres enfants diagnostiqués en 2012. Concernant le patient Lo, probable cas index, aucun lien épidémiologique avec les autres cas de l'épidémie n'a été retrouvé, hormis l'unité de lieu.

La durée prolongée de l'épidémie sur 2 ans et ces 2 vagues épidémiques suggèrent la présence d'un réservoir persistant à l'origine de la contamination, pouvant être d'origine environnementale, alimentaire ou humaine, associée à une transmission croisée *via* le personnel ou entre les nourrissons ou encore par le biais de matériels ou d'objets contaminés. Une souche de *S. Montevideo* totosensible a été mise en évidence en portage sain chez un membre du personnel soignant. Aucun argument ne nous permet cependant d'affirmer sa responsabilité dans la diffusion des souches, ce membre du personnel pouvant très bien être lui aussi « contaminé » après contact auprès des enfants porteurs dont il s'est occupé. Afin d'identifier un éventuel réservoir environnemental, un dépistage sur plus de 100 sites a été conduit par le LNR *Salmonella* au sein de l'unité Mère-enfant en novembre 2013. Une seule souche de *S. Montevideo* de phénotype sensible a été retrouvée au niveau du sol d'une des chambres d'un enfant encore excréteur, excluant la présence d'un réservoir environnemental. A noter que des investigations microbiologiques et épidémiologiques ont également été menées à partir de produits de l'alimentation spécifiques des nourrissons (laits notamment) ; les résultats se sont tous révélés négatifs, excluant une origine alimentaire de la contamination. A ce jour, sans doute grâce à l'évaluation des pratiques, au renforcement des précautions standards associés à la désinfection des locaux, aucun nouveau cas de salmonellose n'a été recensé et ce malgré un dépistage systématique des nouveaux enfants entrants dans l'unité Mère-enfant.

Les salmonelles ne sont pas des bactéries habituelles de la flore hospitalière, les épidémies de souches multirésistantes sont plus volontiers associées à d'autres espèces d'entérobactéries telles que *E. coli* ou *K. pneumoniae* (100). Les prélèvements environnementaux ont mis en

évidence plusieurs souches d'*E. cloacae* BLSE dans sept sites différents de l'unité Mère-enfant (chambres des enfants, salle de jeux, salle de soins). Ils présentaient les mêmes phénotypes et gènes de résistances que les salmonelles multirésistantes : *bla_{CTX-M-9}*, *qnrA1*, *dfrA16*, *aadB*, *aadA2*, *sul1*. La présence de ces différents gènes et *a priori* du même support génétique, constitue un argument fort en faveur d'un transfert horizontal entre des souches environnementales et des souches de salmonelles à l'origine totosensibles. De même, plusieurs entérobactéries BLSE avec des phénotypes et des gènes de résistance comparables ont été mises en évidence dans les selles des enfants. Ces entérobactéries BLSE ont vraisemblablement constitué un autre réservoir au sein du microbiote digestif. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'isolement de souches de *S. Montevideo* totosensibles a toujours été associé à l'isolement d'une autre entérobactérie BLSE. L'émergence et la diffusion intra-hospitalière de ces germes est habituellement la conséquence d'une transmission croisée et d'une pression de sélection antibiotique. Des études ont par ailleurs clairement identifié l'utilisation antérieure d'antibiotiques comme facteur de risque de l'acquisition de salmonelles résistantes aux antibiotiques ou non (101,102). L'échange de gènes de résistances entre entérobactéries sous pression de sélection a été notamment démontré *in vitro*, dans un modèle d'iléon porcin (103). Une étude *in vivo* a de plus démontré le transfert du gène *bla_{CTX-M-9}* entre *S. Virchow* et *E. coli* dans le tube digestif de souris à flore humaine sous pression de sélection antibiotique (104). Cependant dans notre cas, la plupart des nourrissons en début de vie n'ont pas été exposés aux antibiotiques avant l'isolement de ces souches multirésistantes. La diversité des phénotypes de résistances des souches de salmonelles, parfois observée chez un même patient, pourrait être expliquée par un transfert horizontal de gènes de résistance provenant d'autres entérobactéries multirésistantes d'origine colique et/ou environnementale.

Le second objectif de notre étude était de caractériser les supports génétiques de la résistance des souches multirésistantes. Les transconjugants obtenus par le CNR-ESS présentaient les mêmes plasmides et les mêmes phénotypes de résistances que les salmonelles, suggérant un transfert en bloc à partir d'un même plasmide. Par ailleurs, ces transconjugants hébergeaient également des intégrons de classe 1, confirmant leur origine plasmidique. Le PCR-*typing* et la détection *in silico* ont indiqué que cette résistance transférable était liée à la présence d'un plasmide appartenant au groupe d'incompatibilité IncHI2. Le plasmide IncHI2 est un plasmide à succès chez les entérobactéries et particulièrement chez les salmonelles. Il a déjà été

abondamment décrit dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques, notamment associé à la même BLSE décrite dans notre épidémie chez d'autres SNT (105). Une grande variabilité de la taille des plasmides IncHI2 a été observée entre les différentes souches de salmonelles. Néanmoins, tous les plasmides séquencés appartiennent au même sous-type ST1-like et présentent des contigs de plusieurs dizaines de kilobases qui sont identiques. Ce fond génétique similaire suggère l'existence d'un plasmide ancestral commun ayant par la suite subi de multiples réarrangements génétiques tels que des recombinaisons, des insertions ou des cassures.

Les plasmides IncHI2 se démarquent par ailleurs d'autres plasmides par leur température de conjugaison optimale inférieure à 30°C qui facilite ainsi leur transfert dans des conditions environnementales (106). Les plasmides analysés dans notre étude hébergeaient en outre des gènes de résistance au tellurium, à l'arsenic, au nickel voire au mercure, permettant aux souches qui les hébergent de persister dans l'environnement. Enfin, les plasmides IncHI2 de notre épidémie présentent de grandes homologies avec d'autres plasmides IncHI2 déjà décrits chez des souches d'*E. cloacae* multirésistants hébergeant des intégrons différents (107). L'identification de plasmides conservés dans une grande variété de pathogènes isolés dans différents pays illustre une nouvelle fois le rôle clé de ces plasmides dans la dissémination de la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries à Gram négatif.

Dans cette épidémie, un nombre important de souches multirésistantes a été isolé chez un sérotype de salmonelle habituellement sensible. Pas moins de 9 profils de résistance différents ont été retrouvés parmi l'ensemble des souches. Cette grande diversité de phénotypes de résistance s'explique par une grande diversité de gènes de résistance portés par les plasmides IncHI2. Toutes les résistances observées ont pu être reliées à un gène de résistance. Ainsi, la résistance aux β -lactamines était observée pour 13 des souches isolées associée à une pénicillinase de bas niveau de type TEM, une céphalosporinase acquise DHA-1 et une BLSE de type CTX-M-9. Diverses BLSE ont largement été décrites chez divers sérotypes de salmonelles associées à différents supports génétiques. L'enzyme CTX-M-9 a particulièrement été décrite chez le sérotype Virchow (88), mais également chez Bovismorbificans (108). La céphalosporinase DHA-1 issue de *Morganella morganii* a été décrite chez d'autres sérotypes tels que Enteritidis (86) ou Senftenberg (109). Une souche de *S. Montevideo* hébergeant le gène *bla*_{DHA-1} a déjà été décrite en Corée (110). Au total, 8 souches présentaient une sensibilité diminuée aux quinolones. Les gènes de résistances aux quinolones retrouvés étaient *qnrA1* et

qnrB4 largement décrits chez d'autres entérobactéries et SNT. La résistance transférable aux quinolones est majoritairement liée au déterminant QnrS et QnrB chez les salmonelles (111) ; l'isolement de souches hébergeant le gène *qnrA1* reste assez rare. Comme observé dans les souches isolées, plusieurs études ont démontré l'association fréquente entre les déterminants Qnr et BLSE, généralement portés par un même plasmide (89).

Toutes les salmonelles résistantes de notre étude étaient associées à la présence d'un intégron de classe 1 le plus souvent complexe. Trois réseaux de cassettes différents ont pu être mis en évidence : *dfrA16-aadA2* conférant une résistance au triméthoprim et à la streptomycine/spectinomycine respectivement; *aadB-aadA2* conférant une résistance aux aminosides et un réseau *aac(6')-IIC- Δ ereA2* conférant une résistance aux aminosides. D'autres gènes de résistance aux C3G et aux quinolones ont été retrouvés en aval de l'ISCR1. Des intégrons analogues à ceux retrouvés chez les salmonelles ont été déjà décrits chez différentes souches d'entérobactéries, voire de salmonelles (108,112,113). Les souches Ai1 et Ai2 se distinguent par leur profil de résistance et leurs gènes de résistance totalement différents. Ces 2 souches hébergeaient un intégron défectif associé à la présence des gènes *strA* et *strB* non contenus dans des cassettes. L'absence de région 3'CS au sein de cette structure explique la sensibilité de la souche Ai1 aux sulfamides. L'intégron supplémentaire mis en évidence chez Ai2 possède un réseau particulier : la cassette conférant la résistance à l'érythromycine *ereA2* est interrompue par une transposase associée à 2 gènes de résistance supplémentaires: *aac3* et *arr*. Cet intégron a notamment été décrit chez des souches d'*E. cloacae* (107) et une souche de *S. Heidelberg* aux Philippines (114). Un ancêtre potentiel de cet intégron pourrait être l'intégron *aac(6')IIC/ereA2* hébergé dans un plasmide chez *S. Keurmassar* isolée au Sénégal en 2000 (90). La caractérisation d'intégrons présentant des réseaux de cassettes différents suggèrent une évolution génétique marquée par différents évènements de recombinaison. Plusieurs souches hébergeaient par ailleurs deux intégrons différents, *a priori* sur le même plasmide. A noter que l'organisation génétique des intégrons n'a été investiguée que pour un seul isolat de chaque profil.

Plusieurs types de transposons ont pu être caractérisés dans les plasmides IncHI2, suggérant une très grande plasticité génétique. Certains des intégrons sont en effet localisés dans des transposons du groupe Tn21. Ces transposons appartiennent à la famille des transposons Tn3 et sont largement décrits chez les bactéries à Gram négatif. Ils sont par ailleurs fréquemment associés à l'opéron *mer* (115). Les intégrons de classe 1 n'expliquaient cependant pas

l'ensemble des résistances observées. Deux variants des gènes *cat* et *tet* ont été mis en évidence chez différentes souches. Ces gènes étaient toujours encadrés de 2 copies d'IS26. L'IS26 était présente en de nombreux exemplaires sur un même plasmide générant des transposons composites. Cet élément génétique très répandu de 820 pb est encadré par des séquences inversées répétées de 14 pb et contient un seul gène qui code une transposase. L'IS26 génère souvent des fusions de réplicons (ou co-intégrats), qui sont le résultat de transpositions réplicatives. L'IS26 et les transposons composites qu'elle délimite, jouent un rôle dans le transfert horizontal de gènes de résistance, notamment chez *Salmonella* sp (116). Elle a particulièrement été décrite dans la mobilisation de gènes de résistance tels que *bla_{SHV}*, *bla_{CMY}*, *tetA* et *catA2*. Les transpositions liées à IS26 sont vraisemblablement à l'origine de la différence de taille des plasmides IncHI2. Ces événements de transpositions pourraient avoir eu lieu entre différents plasmides hébergés chez des souches d'entérobactéries présentes dans l'environnement avant leur transfert aux salmonelles. *In fine*, malgré une clonalité des souches de salmonelles, les divers phénotypes de résistance observés s'expliquent par la très grande plasticité des plasmides IncHI2.

Dans cette étude complexe impliquant des souches de salmonelles aux multiples phénotypes de résistance aux antibiotiques, le séquençage haut-débit a constitué un outil très précieux ; il a fait preuve de sa grande puissance et nous a permis de caractériser des supports génétiques que nous n'aurions pu identifier aussi facilement sans réaliser des centaines de PCR et de clonages aux issues incertaines. Il nous a permis d'expliquer la totalité des phénotypes de résistance aux antibiotiques et nous a grandement éclairés dans la compréhension des supports et des réarrangements génétiques survenus entre des souches de salmonelles parfois isolées d'une même coproculture. En outre, il a confirmé le caractère clonal de cette épidémie et a conforté notre hypothèse initiale du cas index suspecté. Des investigations futures menées au CNR-ESS avec une technologie NGS comparable devraient nous permettre de pouvoir aller plus loin dans l'analyse, et notamment de comparer les souches de notre épidémie à d'autres souches de *S. Montevideo a priori* différentes isolées en France ou à l'étranger dans d'autres contextes épidémiologiques.

Bien que particulièrement performant, pour ne pas dire indispensable dans notre étude, le NGS n'a pas pu répondre à l'ensemble des questions que nous nous étions posées et a montré ses limites. Son principal écueil réside dans une analyse bioinformatique très complexe, très chronophage, avec des difficultés (impossibilités parfois) d'alignement liées aux séquences

d'ADN répétées ; ces séquences étaient particulièrement nombreuses dans notre cas, avec non seulement des transposases et des séquences d'insertions répétées plusieurs fois (IS26 notamment), mais aussi des structures associées aux intégrons (intégrase, cassettes, 3'CS, ISCR1...) qui étaient, elles aussi souvent dupliquées. Nous n'avons pas pu réaliser l'assemblage complet de tous les contigs plasmidiques afin de reconstituer totalement chacun des plasmides IncHI2 hébergés par les souches de salmonelles aux profils différents. La réalisation de PCR complémentaires puis de réactions de séquençage par la technique Sanger devrait nous permettre, *in fine*, de contourner cette problématique.

Conclusion

Les investigations épidémiologiques et microbiologiques ont apporté la preuve d'une origine commune des souches de *S. Montevideo* isolées dans le cadre d'une épidémie nosocomiale chez des enfants de moins de un an. Malgré des différences de sensibilité aux antibiotiques, les différentes méthodes de sous-typage moléculaire ont clairement démontré la clonalité des souches isolées. Après de multiples enquêtes et dépistages, aucune étiologie de cette épidémie n'a néanmoins pu être confirmée.

La détermination des supports de résistance a permis de mettre en évidence des plasmides conjugatifs de type IncHI2 largement décrits chez les entérobactéries et fréquemment associés à la multirésistance. L'hypothèse du transfert de ce plasmide à partir de souches environnementales et digestives a vraisemblablement joué un rôle majeur dans l'évolution de ces souches de salmonelles. Les plasmides isolés présentent un fond génétique commun mais une très grande plasticité et une excellente capacité d'acquisition de gènes de résistance. Au total, nous avons pu relier chaque phénotype de résistance à la présence de gènes de résistance et d'intégrons de classe 1, complexes pour la plupart.

La complexité de l'analyse des séquences obtenues par NGS repose sur la présence de nombreux transposons, au sein du génome et du plasmide. Les séquences obtenues par la technologie IonProton™, ne nous ont pas à ce jour permis de répondre à l'ensemble des questions posées mais les données générées ont néanmoins apporté un éclairage immense dans la compréhension des phénotypes de résistance aux antibiotiques observés.

Références

1. Tindall BJ, Grimont P a. D, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:521-4.
2. Grimont P a. D, Weill F. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur. 9th éd. Paris; 2007;
3. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:7877-85.
4. Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, et al. CRISPR Typing and Subtyping for Improved Laboratory Surveillance of *Salmonella* Infections. *PLoS ONE*. 2012;7:e36995.
5. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315:1709-12.
6. Bakker HC den, Switt AIM, Cummings CA, Hoelzer K, Degoricija L, Rodriguez-Rivera LD, et al. A whole-genome single nucleotide polymorphism-based approach to trace and identify outbreaks linked to a common *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo pulsed-field gel electrophoresis type. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:8648-55.
7. Schwan WR, Huang XZ, Hu L, Kopecko DJ. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun*. 2000;68:1005-13.
8. Minette HP. Epidemiologic aspects of salmonellosis in reptiles, amphibians, mollusks and crustaceans--a review. *Int J Zoonoses*. 1984;11:95-104.
9. Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, et al. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004;38:S253-61.
10. Buchwald DS, Blaser MJ. A review of human salmonellosis: II. Duration of excretion following infection with nontyphi *Salmonella*. *Rev Infect Dis*. 1984;6:345-56.
11. Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol*. 2014.
12. Lee MB, Greig JD. A review of nosocomial *Salmonella* outbreaks: infection control interventions found effective. *Public Health*. 2013;127:199-206.
13. Santos RL, Bäumlér AJ. Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*. 2004;294:225-33.

14. Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, et al. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis.* 2008;198:109-14.
15. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2001;32:263-9.
16. Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2004;38 Suppl 3:S127-34.
17. Hoffmann S, Batz MB, Morris J, J. Glenn. Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. *J Food Prot.* 2012;75:1292-302.
18. Vaillant V, De Valk H, Baron E. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France - Rapport InVS. 2004.
19. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2010;50:882-9.
20. Vieira A, Jensen AR, Pires SM, Karlsmose S, Wegener HC, Wong DLF, et al. WHO Global Foodborne Infections Network Country Databank – a resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. *Proceeding 12th Symp Int Soc Vet Epidemiol Econ Durb South Afr.* 2009.
21. Weill F-X, Le Hello S. Rapport d'activité annuel 2013. Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris; 2013.
22. Onwuezobe IA, Oshun PO, Odigwe CC. Antimicrobials for treating symptomatic nontyphoidal *Salmonella* infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;11.
23. Sirinavin S, Thavornnunth J, Sakchainanont B, Bangtrakulnonth A, Chongthawonsatid S, Junumporn S. Norfloxacin and azithromycin for treatment of nontyphoidal salmonella carriers. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2003;37:685-91.
24. McWhorter AC, Murrell MC, Edwards PR. Resistance of *Salmonellae* Isolated in 1962 to Chlorotetracycline. *Appl Microbiol.* 1963;11:368-70.
25. Threlfall EJ. Epidemic salmonella typhimurium DT 104-a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:7-10.
26. Helms M, Ethelberg S, Molbak K. International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:859-67.
27. Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23:547-55.
28. Parry CM, Threlfall EJ. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:531-8.

29. Crump JA, Barrett TJ, Nelson JT, Angulo FJ. Reevaluating Fluoroquinolone Breakpoints for *Salmonella enterica* Serotype Typhi and for Non-Typhi *Salmonellae*. *Clin Infect Dis*. 2003;37:75-81.
30. Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschäpe H, Cormican M, et al. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2003;8:41-5.
31. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. 2014.
32. Guerra B, Fischer J, Helmuth R. An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol*. 2014;171:290-7.
33. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1297-300.
34. Rodríguez E, Bautista A, Barrero L. First Report of a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolate with Carbapenemase (KPC-2) in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:1263-4.
35. Le Hello S, Harrois D, Bouchrif B, Sontag L, Elhani D, Guibert V, et al. Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:672-9.
36. Weill F-X, Bertrand S, Guesnier F, Baucheron S, Grimont PAD, Cloeckaert A. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in Travelers. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1611-2.
37. World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. 1998; Genève, Suisse.
38. Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:951-68.
39. Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Molbak K. Excess Mortality Associated with Antimicrobial Drug-Resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:490-5.
40. Varma JK, Molbak K, Barrett TJ, Beebe JL, Jones TF, Rabatsky-Ehr T, et al. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *J Infect Dis*. 2005;191:554-61.
41. Hedberg CW, MacDonald KL, Osterholm MT. Changing Epidemiology of Food-Borne Disease: A Minnesota Perspective. *Clin Infect Dis*. 1994;18:671-82.
42. Dominguez M, Jourdan-Da Silva N, Vaillant V, Pihier N, Kermin C, Weill F-X, et al. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Montevideo infections in France linked to consumption of cheese made from raw milk. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6:121-8.

43. Gieraltowski L, Julian E, Pringle J, Macdonald K, Quilliam D, Marsden-Haug N, et al. Nationwide outbreak of Salmonella Montevideo infections associated with contaminated imported black and red pepper: warehouse membership cards provide critical clues to identify the source. *Epidemiol Infect.* 2013;141:1244-52.
44. ANSES. Inventaire des Salmonella d'origine non humaine- Réseau Salmonella 2010. 2012.
45. CDC - Salmonella Montevideo Infections Linked to Live Poultry - Salmonella [Internet]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-06-12/index.html>
46. CDC. An Atlas of Salmonella in the United States, 1968-2011. [Internet]. 2013 [cité 20 août 2014]. Disponible sur: http://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/index.html?s_cid=cs_002
47. Seepersadsingh N, Adesiyun AA. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella spp. in pet mammals, reptiles, fish aquarium water, and birds in Trinidad. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50:488-93.
48. Fonseca RJ, Dubey LM. Salmonella montevideo sepsis from a pet snake. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;13:550.
49. Gericke B, Rische H, Schmidt E, Tschäpe H. [Salmonella montevideo from a hospital outbreak with different antibiograms determined by a plasmid]. *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Ser B Umwelt Hygiene Krankenhaus Hygiene Arbeitshygiene Präventive Medizin.* 1988;186:180-8.
50. Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, et al. Antimicrobial Resistance among Invasive Nontyphoidal Salmonella enterica Isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1148-54.
51. Herrera-León S, González-Sanz R, Herrera-León L, Echeita MA. Characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:287-90.
52. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* 1989;3:1669-83.
53. Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol.* 1992;174:1574-85.
54. Collis CM, Kim M-J, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines. *J Bacteriol.* 2002;184:3017-26.
55. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33:757-84.
56. Collis CM, Kim M-J, Stokes HW, Hall RM. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. *Mol Microbiol.* 2002;46:1415-27.

57. Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiol Read Engl.* 2000;146:2855-64.
58. Collis CM, Hall RM. Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites attI3 and attI1 reveals common features. *Microbiol Read Engl.* 2004;150:1591-601.
59. Jové T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy M-C. Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000793.
60. Collis CM, Hall RM. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol.* 1992;6:2875-85.
61. Hall RM, Brookes DE, Stokes HW. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol.* 1991;5:1941-59.
62. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:608-20.
63. Bouvier M, Ducos-Galand M, Loot C, Bikard D, Mazel D. Structural features of single-stranded integron cassette attC sites and their role in strand selection. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000632.
64. Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:761-8.
65. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:1-6.
66. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2006;70:296-316.
67. Rodriguez-Martinez J-M, Poirel L, Canton R, Nordmann P. Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2544-6.
68. Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:2071-8.
69. Collis CM, Recchia GD, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. *J Bacteriol.* 2001;183:2535-42.
70. Bouvier M, Demarre G, Mazel D. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J.* 2005;24:4356-67.
71. Hanau-Berçot B, Podglajen I, Casin I, Collatz E. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol Microbiol.* 2002;44:119-30.
72. Jacquier H, Zaoui C, Sanson-le Pors M-J, Mazel D, Berçot B. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites. *Mol Microbiol.* 2009;72:1475-86.

73. Guerin É, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Re SD, et al. The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science*. 2009;324:1034-1034.
74. Guérin E, Cambray G, Da Re S, Mazel D, Ploy M-C. [The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons]. *Médecine Sci MS*. 2010;26:28-30.
75. Barraud O, Ploy M-C. Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise au point. *J Anti-Infect*. 2011;13:133-44.
76. Barraud O, Badell E, Denis F, Guiso N, Ploy M-C. Antimicrobial Drug Resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:2078-80.
77. Xu Z, Li L, Shi L, Shirliff ME. Class 1 integron in staphylococci. *Mol Biol Rep*. 2011;38:5261-79.
78. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1612-5.
79. Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;19:E306-8.
80. Ribeiro VB, Lincopan N, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. *Braz J Microbiol*. 2011;42:685-92.
81. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol*. 2006;112:1-10.
82. Ahmed AM, Nakano H, Shimamoto T. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:371-4.
83. Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:297-304.
84. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:388-96.
85. Hall RM. *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol*. 1 oct 2010;5(10):1525-38.
86. Verdet C, Arlet G, Barnaud G, Lagrange PH, Philippon A. A Novel Integron in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, Carrying the bla DHA-1 Gene and Its Regulator Gene ampR, Originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:222-5.

87. Conza JD, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. Novel Class 1 Integron (InS21) Carrying blaCTX-M-2 in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2257-61.
88. Weill F-X, Lailler R, Praud K, K  rouanton A, Fabre L, Brisabois A, et al. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5767-73.
89. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:463-9.
90. Garnier F, Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy M-C. Genetic environment of quinolone resistance gene qnrB2 in a complex *sulI*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3200-2.
91. Barraud O, Baclet MC, Denis F, Ploy MC. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother.* 8 janv 2010;65(8):1642-5.
92. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:3895-903.
93. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2640-4.
94. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1355-61.
95. Darling AE, Mau B, Perna NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS One.* 2010;5:e11147.
96. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3(1):59-67.
97. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* d  c 2005;63(3):219-28.
98. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 10 avr 1995;226(2):235-40.
99. Liu F, Barrangou R, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Knabel SJ, Dudley EG. Novel Virulence Gene and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Multilocus Sequence Typing Scheme for Subtyping of the Major Serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:1946-56.
100. Romero L, López L, Rodríguez-Ba  o J, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella*

pneumoniae isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2005;11:625-31.

101. Glynn MK, Reddy V, Hutwagner L, Rabatsky-Ehr T, Shiferaw B, Vugia DJ, et al. Prior Antimicrobial Agent Use Increases the Risk of Sporadic Infections with Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium: A FoodNet Case-Control Study, 1996–1997. Clin Infect Dis. 2004;38(s3):S227-36.
102. Pavia AT, Shipman LD, Wells JG, Puhr ND, Smith JD, McKinley TW, et al. Epidemiologic evidence that prior antimicrobial exposure decreases resistance to infection by antimicrobial-sensitive *Salmonella*. J Infect Dis. 1990;161:255-60.
103. Blake D p., Hillman K, Fenlon D r., Low J c. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. J Appl Microbiol. 2003;95:428-36.
104. Faure S, Perrin-Guyomard A, Delmas JM, Chatre P, Laurentie M. Transfer of plasmid-mediated CTX-M-9 from *Salmonella enterica* serotype Virchow to Enterobacteriaceae in human flora-associated rats treated with cefixime. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:164-9.
105. Fernandez AG, Cloeckert A, Bertini A, Praud K, Doublet B, Weill F-X, et al. Comparative Analysis of IncHI2 Plasmids Carrying blaCTX-M-2 or blaCTX-M-9 from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry and Humans. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:4177-80.
106. Page DT, Whelan KF, Colleran E. Mapping studies and genetic analysis of transfer genes of the multi-resistant IncHI2 plasmid, R478. FEMS Microbiol Lett. 1999;179:21-9.
107. Chen Y-T, Liao T-L, Liu Y-M, Lauderdale T-L, Yan J-J, Tsai S-F. Mobilization of qnrB2 and ISCR1 in plasmids. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:1235-7.
108. Antunes P, Mourão J, Alves T, Campos J, Novais C, Novais A, et al. *Salmonella enterica* serotype Bovismorbificans, a new host for CTX-M-9. Int J Antimicrob Agents. 2013;41:91-3.
109. Liebana E, Batchelor M, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Hopkins KL, Threlfall EJ. First Report of *Salmonella* Isolates with the DHA-1 AmpC β -Lactamase in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:4492-4492.
110. Kim J-Y, Park Y-J, Lee S-O, Song W, Jeong SH, Yoo YA, et al. Bacteremia Due to *Salmonella enterica* Serotype Montevideo Producing Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase (DHA-1). Ann Clin Lab Sci. 2004;34:214-7.
111. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. J Antimicrob Chemother. 2011
112. Herrera-León S, González-Sanz R, Rodríguez I, Rodicio MR, Echeita MA. Spread of a multiresistant CTX-M-9-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow phage type 19 in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2010;29:901-5.

113. Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, et al. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:453-8.
114. Krauland M, Harrison L, Paterson D, Marsh J. Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella enterica*. *Curr Microbiol*. 2010;60:217-23.
115. Gilbert MP, Summers AO. The distribution and divergence of DNA sequences related to the Tn21 and Tn501 mer operons. *Plasmid*. 1988;20:127-36.
116. Yau S, Liu X, Djordjevic SP, Hall RM. RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their sul2-strA-strB antibiotic resistance gene cluster. *Microb Drug Resist Larchmt N*. 2010;16:249-52.

Annexes

Annexe I : Séquences des amorces et sondes utilisées pour la PCR triplex intégron

Cible	Amorce	Séquence (5'-3')
<i>intI1</i>	<i>intI1</i> -LC1	GCC TTG ATG TTA CCC GAG AG
	<i>intI1</i> -LC5	GAT CGG TCG AAT GCG TGT
	<i>intI1</i> -probe	(6-FAM) ATT CCT GGC CGT GGT TCT GGG TTT T (BHQ1)
<i>intI2</i>	<i>intI2</i> -LC2	TGC TTT TCC CAC CCT TAC C
	<i>intI2</i> -LC3	GAC GGC TAC CCT CTG TTA TCT C
	<i>intI2</i> -probe	(Texas Red) TGG ATA CTC GCA ACC AAG TTA TTT TTA CGC TG (BHQ2)
<i>intI3</i>	<i>intI3</i> -LC1	GCC ACC ACT TGT TTG AGG A
	<i>intI3</i> -LC2	GGA TGT CTG TGC CTG CTT G
	<i>intI3</i> -probe	(Cy3) CGC CAC TCA TTC GCC ACC CA (BHQ3)

Annexe II : Séquences des amorces utilisées pour les PCR en point final

Cible	Amorce	Séquence (5'-3')	Taille attendue (pb)
<i>Réseau de cassettes</i>	36854	GGC ATC CAA GCA GCA AGC GCG T	variable
	36855	AAG CAG ACT TGA CCT GAT AGT TTG	
<i>aadB</i>	<i>aadBl</i>	CAT GCA CCT CAC TCG GGG CG	
<i>dfrA16</i>	<i>dfrA16l</i>	CGA CAT CGA GCG AGA TGG AGA CA	
<i>aadA2</i>	<i>aadA6</i>	CAA GGC AAC GCT ATG TTC TC	
ISCR1	<i>341A</i>	CGC CCA CTC AAA CAA ACG	469
	<i>341B</i>	GAG GCT TTG GTG TAA CCG	
	<i>341stop</i>	ACA TTA GTC GGC CAG CGG	
3'CS	<i>sull</i>	TGA AGG TTC GAC AGC AC	
	<i>sulr</i>	GAT TGC GCT TCG CAG ATC TCC AGG	
	<i>qacED1l</i>	GTT AGA TGC ACT AAG CAC ATA	
	<i>qacED1r</i>	TAT GTG CTT AGT GCA TCT AAC	
<i>qnrA1</i>	<i>qnrAf</i>	ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG	513
	<i>qnrAr</i>	GAT CGG CAA AGG TTA GGT CA	
	<i>qnrAup</i>	CTC AAA TCC TGG CGT GAG AA	
	<i>qnrAdw</i>	GTC AAG ATC TGT GCC TGG CA	
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	<i>CTXM9f</i>	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA	856
	<i>CTXM9r</i>	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC	
	<i>CTXM9up</i>	GAT TGC GCT TCG CAG ATC TCC AGG	
	<i>CTXM9dw</i>	GGC TTC AGC GGC GAG AAT CAT	

Annexe III : Glossaire des gènes cités dans les figures 26 à 32

- aac* : Aminoside acétyltransférase
- aadA2* : Aminoside adényltransférase
- aadB* : Aminoside adényltransférase
- ampR* : Régulateur de céphalosporinase
- arr* : ADP-ribosyl transférase (Rifampicine)
- bla_{CTX-M-9}* : BLSE CTX-M-9
- bla_{DHA-1}* : Céphalosporinase DHA-1
- catA* : Chloramphénicol acétyltransférase
- dfrA* : Dihydrofolate réductase (Triméthoprime)
- EcoRII* : Enzyme de restriction
- ereA2* : Erythromycine estérase
- hp* : Protéine hypothétique
- intI1* : Intégrase IntI1
- ISCR : *Insertion Sequence Common Region*
- IS : *Insertion sequence*
- OH dhase : Alcool déshydrogénase
- opéron *mer* : Résistance au mercure
- opéron *sap* : *Sensitivity to antimicrobial peptides*
- orf* : *Open reading frame*
- qacEΔ1* : Protéine d'efflux (Ammonium IV)
- qnr* : Déterminant Qnr (Quinolones)
- sul1* : Dihydroptéroate synthase (Sulfamides)
- strA/B* : Streptomycine phosphotransférase
- tetA* : Protéine d'efflux (Tétracyclines)
- tetR* : Régulateur du gène *tet*
- shik dhase* : Shikimate déshydrogénase
- tpnA* : Transposase
- tnpR* : Résolvase

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.

Cas groupés de salmonelloses à *Salmonella* Montevideo : épidémiologie et caractérisation des supports génétiques de résistance aux antibiotiques.

Résumé :

Salmonella sp est une bactérie naturellement sensible aux antibiotiques. L'isolement de souches multirésistantes est rapporté de manière croissante, notamment vis-à-vis des quinolones et des β -lactamines, molécules de choix dans le traitement des salmonelloses.

Entre 2011 et 2013, 14 cas de salmonelloses à *Salmonella* Montevideo ont été observés chez des enfants de moins de un an. Ces nourrissons avaient tous en commun une hospitalisation dans une même unité Mère-enfant d'un Centre Hospitalier. Outre le caractère exceptionnel d'une épidémie nosocomiale à *Salmonella* sp, ces souches étaient résistantes à différentes classes d'antibiotiques et présentaient une grande variété de profils de résistance.

Les objectifs de cette étude étaient de réaliser un bilan épidémiologique, d'établir une comparaison moléculaire des différents isolats afin de confirmer le caractère clonal des souches de l'épidémie et enfin d'identifier les supports moléculaires de la résistance aux antibiotiques. La clonalité des souches de salmonelles a été démontrée par plusieurs outils moléculaires. La technologie du séquençage haut débit nous a permis d'expliquer, sur le plan génétique, l'ensemble des phénotypes de résistance observés ; les gènes de résistance étaient pour la plupart associés à un ou plusieurs intégrons de classe 1 portés par un plasmide IncHI2. Les divers phénotypes de résistance observés s'expliquent par la très grande plasticité du plasmide IncHI2, capable d'intégrer, *via* des transposons composites, d'autres gènes de résistance aux antibiotiques.

Mots-clefs : *Salmonella*, nosocomial, intégron, séquençage-haut-débit

Salmonellosis outbreak due to *Salmonella* Montevideo: Epidemiology and molecular characterization of antimicrobial resistance

Abstract:

While *Salmonella* is usually susceptible to many antibiotics, multidrug resistant strains are increasingly reported. The alarming rise of resistance against quinolones or β -lactams compromises their effectiveness in salmonellosis therapy.

Between 2011 and 2013, 14 cases of salmonellosis due to *Salmonella* Montevideo have been observed on infants under one. The common factor was that all children were hospitalized in the same Mother-child unit. Besides the rareness of a salmonellosis nosocomial outbreak, strains involved were resistant to several antibiotics and showed a wide variety of resistance patterns.

The main goals of our study was to set an epidemiologic statement and to establish a molecular comparison between different isolates in order to confirm the clonal character of the strains. Next generation sequencing technology allowed us to explain, on a genetic level, all the phenotypes of resistance observed. The resistance genes were mostly associated to one or more class 1 integrons on an IncHI2 plasmid. The various antibiotic resistance patterns were justified by the high plasticity of the IncHI2 plasmid able to acquire other antibiotic resistance genes supported by composite transposon.

Key words: *Salmonella*, nosocomial, integron, next generation sequencing

Walewski Violaine - Discipline Pharmacie - D.E.S de Biologie Médicale

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène. Centre Hospitalier Universitaire de Limoges.
2, avenue Martin Luther King 87042 Limoges