

## Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 7 octobre 2022

Par **Victor GENESTE**

Né le 11 mai 1993 à Bordeaux

### **Étude au cours du temps des intégrons de résistances chez un patient atteint de mucoviscidose**

Thèse dirigée par Dr Fabien GARNIER

Examineurs :

Mme Sylvie ROGEZ, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Pharmacie

Mme Marie-Cécile PLOY, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine

M. Sébastien HANTZ, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine

Mme. Jasmine CHAUZEIX, MCU-PH, Hématologie Biologique, Faculté de Pharmacie





## Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 7 octobre 2022

Par **Victor GENESTE**

Né le 11 mai 1993 à Bordeaux

### **Étude au cours du temps des intégrons de résistances chez un patient atteint de mucoviscidose**

Thèse dirigée par Dr Fabien GARNIER

Examineurs :

Mme Sylvie ROGER, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Pharmacie

Mme Marie-Cécile PLOY, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine

M. Sébastien HANTZ, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine

Mme. Jasmine CHAUZEIX, MCU-PH, Hématologie Biologique, Faculté de Pharmacie



# Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

---

Le 1<sup>er</sup> septembre 2022

## Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

## Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

## Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

## Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

## Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

**Mme VIANA Marylène** Pharmacie galénique

**Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires**

**M. BARRAUD Olivier (\*)** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme. CHAUZEIX Jasmine** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**M. JOST Jérémie** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Maitres de Conférences des Universités – Universitaires**

**M. BASLY Jean-Philippe (\*)** Chimie analytique et bromatologie

**Mme BEAUBRUN-GIRY Karine** Pharmacie galénique

**Mme BÉGAUD Gaëlle** Chimie analytique et bromatologie

**M. BILLET Fabrice** Physiologie

**Mme BONAUD Amélie** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**M. CALLISTE Claude** Biophysique et mathématiques

**M. CHEMIN Guillaume** Biochimie et biologie moléculaire

**Mme CLÉDAT Dominique** Chimie analytique et bromatologie

**M. COMBY Francis** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Mme DELEBASSÉE Sylvie** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme DEMIOT Claire-Elise (\*)** Pharmacologie

**M. FABRE Gabin** Biophysique et mathématiques

**M. LABROUSSE Pascal (\*)** Botanique et cryptogamie

**Mme LAVERDET Betty** Pharmacie galénique

**M. LAWSON Roland** Pharmacologie

**M. LÉGER David** Biochimie et biologie moléculaire

**Mme MARRE-FOURNIER Françoise** Biochimie et biologie moléculaire

<b>M. MERCIER Aurélien</b>	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
<b>Mme MILLOT Marion (*)</b>	Pharmacognosie
<b>Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia</b>	Pharmacie galénique
<b>Mme POUGET Christelle (*)</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. TOUBLET François-Xavier</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. VIGNOLES Philippe (*)</b>	Biophysique et mathématiques

**(\*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)**

#### **Assistant Hospitalo-Universitaire**

<b>Mme MARCELLAUD Elodie</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

#### **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche**

<b>M. DELMON Cédric</b>	Pharmacognosie, botanique et mycologie
<b>Mme KENE MALAHA Angéladine</b>	Épidémiologie, statistique, santé publique

#### **Enseignants d'anglais**

<b>M. HEGARTY Andrew</b>	Chargé de cours
<b>Mme VERCELLIN Karen</b>	Professeur certifié

## Remerciements

---

### **A madame la présidente du jury,**

Professeur Sylvie ROGEZ, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ma thèse. Merci également pour votre implication, vos conseils, vos enseignements et votre bienveillance en tant que responsable de DES, mais aussi en tant que biologiste, nos entretiens ont toujours été d'une grande aide pour moi. J'espère par ce travail, vous témoigner ma gratitude.

### **Aux membres du Jury**

Professeur Marie-Cécile Ploy, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Vous avez su m'accueillir dans votre service pour les premiers jours de mon internat. Vous m'avez permis d'accentuer mon goût pour la microbiologie au fil des semestres passés dans votre service. Merci pour votre implication, vos enseignements, vos conseils et votre bienveillance. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Professeur Sébastien Hantz. Merci de faire partie de ce jury. Merci pour ton implication à la formation des internes. Tu as su m'offrir de ton temps pour me former, il était toujours facile et agréable de pousser ta porte pour trouver réponse à mes interrogations. Merci pour ta sympathie.

Dr Jasmine Chauzeix, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour les connaissances que vous m'avez transmises lors de mon passage en hématologie.

Au Dr Fabien Garnier. Merci d'avoir accepté de travailler avec moi. Je te remercie pour tes conseils, ton expertise et ton temps qui m'ont permis de m'aguerrir en paillasse. Enfin merci pour ta gentillesse. Trouve en ce travail l'expression de mon profond respect.

Au Dr Sandra Da Re, merci pour tous ce que tu as fait pour la réalisation de ce travail. Ta gentillesse et ta disponibilité m'ont grandement permis d'avancer dans mes manipulations comme dans l'écriture de ce manuscrit. Par ces mots je remercie également toutes les personnes du « côté fac » qui ont su être présents dès que j'avais besoin d'aide.

### **Aux membres du service de BVH**

Merci à tous les Biologistes, Docteur Christian Martin, Docteur Olivier Barraud, Docteur Nadia Hidri, Docteur Jérôme Darreye, Docteur Nathalie Pestourie, Docteur Elodie Couve-Deacon, Docteur Aurélie Chabot et Docteur Sylvain Meyer. Merci pour votre temps, votre patience en paillasse et vos enseignements d'une très grande qualité. Le temps passé avec vous y est pour beaucoup dans mon envie de spécialisation en Agents Infectieux. Merci à tous les

techniciens avec lesquels j'ai tissé des liens depuis ces trois années, vous m'avez beaucoup appris, vous m'avez aussi fait rire !

A Marie Fleur, merci pour ton implication et ta gentillesse.

Merci à toute l'équipe du CDP pour votre bonne humeur, vos conseils et votre aide à chaque moment.

Merci à toutes les personnes bien vaillantes que j'ai côtoyées lors de mes passages dans les différents services du CBRS.

### **A mes co-internes**

Merci à tous. Merci d'avoir su m'accueillir à Limoges, à l'internat, en stage ou dans les bars de la ville. Merci pour m'avoir montré la voix au labo, à la fac et dans toutes les péripéties de cette vie d'interne. Merci pour m'avoir soutenu et supporté pendant ces années.

### **A mes amis**

Au « PDR » Merci aux « PDR » Pétri, Dalla, César, Pucheu, Xabi, Pitou, Pedre, Imanol et Tony, à Pierrute, Lutxo et tous ceux que vous m'avez fait rencontrer « au Pays ». Ces années sont passées si vite, à attendre le prochain rassemblement.

A Sophie, tu es là depuis le début. A Sysy, bientôt 30 ans que je suis dans tes pats. A Giaco, le meilleur binôme de TP, jusqu'à ce qu'on ait la note.

A Ducuing, Gut, Moga et les autres. Tant d'années passées ensemble. Merci de faire partie de ma vie, depuis l'école de rugby de Bègles à aujourd'hui.

### **A ma famille**

A mes parents, si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous. Merci pour tous les efforts réalisés durant toutes ces années. Merci pour votre amour et vos conseils.

A Esther et Amaury, merci pour votre bonne humeur et pour votre aide lors de ces années.

A mamie Simone et Papi Jean, merci pour votre amour et votre soutien qui n'ont d'égale.

### **A Eugénie**

Merci de m'avoir aidé à traverser ces années. Tout ça n'aurait pu être possible sans toi. Merci pour ta patience, pour l'apaisement que tu me procures et pour l'amour que tu me donnes depuis toutes ces années.

*À mamie Dorcas, ce travail est en ta mémoire.*



## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Liste des abréviations

---

3'CS : région 3' conservée

5'CS : région 5' conservée

AAC : Aminoacétyltransférase

AHL : N-acyl-homosérine lactone

ANT : Aminonucléotidyltransférase

APH : Aminophosphotransférase

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

*attC* : site de recombinaison de cassette d'intégron

*attI* : site de recombinaison de l'intégrase d'intégron

BGN : Bacille Gram négatif

BLSE :  $\beta$ -lactamases à spectre élargi

C1G ; C2G ; C3G : Céphalosporines de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> génération

CF : fibrose kystique (pour Cystic Fibrosis)

CFTR : "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator"

Cl<sup>-</sup> : Ion chlorure

Da : Daltons

EC : milieu extracellulaire

EGM : Eléments Génétiques Mobiles

EPM : échelle de poids moléculaire

GC1 et GC2 : cassette de gène 1 et 2

IC : milieu intracellulaire

*intl1* : gène de l'intégrase

InVS : Institut de veille sanitaire

IR : Intégron de résistance

Kb : Kilo base

LecA ; LecB : Lectine A / B

LPS : Lipopolysaccharide

MLVA : Multiple Locus VNTR Analysis ; Analyse multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem

NBD1 : Nucleotide Binding Domain ; Domaine de liaison du nucléotide

ORL : oto-rhino-laryngologie

Pc : promoteur de cassette

PCR : Polymerase Chain Reaction ; Réaction de Polymérisation en Chaîne

PInt1 : promoteur du gène de l'intégrase d'intégron de classe 1

PKA : Protéine Kinase A

RAISIN : Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales

RD : Domaine régulateur

TIR : Trypsine Immuno Réactive

TMD : Domaine TransMembranaire

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats ; Nombre variable de répétitions en tandem

## Table des matières

Introduction .....	16
I. La mucoviscidose .....	17
I.1. Généralités .....	17
I.2. Épidémiologie .....	17
I.3. Étiologie (physiopathologie) .....	18
I.3.1. Le gène <i>CFTR</i> .....	18
I.3.2. La protéine CFTR .....	18
I.3.3. Mutations du gène <i>CFTR</i> .....	19
I.4. Mode de transmission .....	21
I.5. Phénotype .....	21
I.6. Manifestations cliniques .....	21
I.6.1. Atteinte pulmonaire .....	21
I.6.2. Atteintes extra-pulmonaires .....	22
I.7. Dépistage et diagnostic biologique de la mucoviscidose .....	22
II. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
II.1. Caractères microbiologiques .....	24
II.2. Habitat et pouvoir pathogène .....	25
II.3. Résistances aux antibiotiques .....	27
II.3.1.1. Résistances aux $\beta$ -lactamines .....	27
II.3.1.2. Résistances aux autres antibiotiques .....	28
III. Les intégrons de résistances .....	29
III.1. Structure des intégrons de résistance .....	29
III.1.1. Région 5' conservée .....	30
III.1.1.1. L'intégrase <i>IntI1</i> .....	30
III.1.1.2. Le site de recombinaison <i>attI</i> .....	31
III.1.1.3. Promoteur de cassettes, <i>Pc</i> .....	31
III.1.2. Région variable .....	32
III.1.2.1. Les cassettes de gène .....	32
III.1.2.2. Site de recombinaison <i>attC</i> .....	32
III.1.3. Région conservée 3' (3'-CS) .....	32
III.2. Mouvements des cassettes .....	33
IV. Objectifs .....	35
V. Matériels et méthodes .....	36
V.1. Souches, isolements et conservation .....	36
V.2. Screening des souches pour la recherche de la présence d'intégrons de classes 1 ..	36
V.3. Extraction de l'ADN génomique .....	36
V.4. PCR de cassette .....	37
V.5. Étude de l'environnement génétique des intégrons .....	38
V.6. Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) .....	38
V.7. Séquençage Sanger .....	39
V.7.1. Amplification et purification du fragment à séquencer .....	39
V.7.2. Réaction de séquence .....	39
V.7.3. Purification des réactions de Séquence .....	39
V.7.4. Séquençage .....	39

VI. Résultats .....	40
VI.1. Screening des souches pour la recherche de la présence d'intégrons .....	40
VI.2. PCR de cassette .....	41
VI.3. Géotypage des souches, détermination de la clonalité par MLVA .....	42
VI.4. Exploration de l'environnement génétique de l'IR des souches LL .....	43
VI.5. Détermination du réseau de cassettes de la souche LL 32 .....	45
VII. Discussion .....	47
Conclusion .....	49
Annexes.....	50
Références bibliographiques.....	53
Serment De Galien .....	57

## Table des illustrations

---

Figure 1: Évolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose depuis 1992 ...	17
Figure 2 : Structure secondaire de la protéine CFTR.....	19
Figure 3 : Classification des mutations du gène <i>CFTR</i> .....	20
Figure 4 : Mode de transmission .....	21
Figure 5 : algorithme du dépistage néonatal de la mucoviscidose en France .....	23
Figure 6 : Photo de <i>P. aeruginosa</i> au microscope optique (x500).....	24
Figure 7 : Culture de <i>P. aeruginosa</i> .....	25
Figure 8 : Relation possible entre les Éléments Génétiques Mobiles bactériens .....	29
Figure 9 : Schéma d'un intégron de résistance de classe 1 .....	30
Figure 10 : Mécanisme de régulation de l'expression de l'intégrase via la réponse SOS .....	31
Figure 11 : Modèle de capture et d'excision des cassettes .....	33
Figure 12 : Position des amorces Cal1-L et Cal1-R dans l'intégron de classe 1 .....	37
Figure 13 : Position des amorces LL21-P1-L / IntI1-ARB2 et Sul1-ARB2 / LL21-P1-R... ..	38
Figure 14 : Estimation de la taille de la région variable de l'intégron des souches LL. ..	41
Figure 15 : Principe du MLVA .....	42
Figure 16 : Résultats MLVA.....	43
Figure 17 : Analyse PCR de l'environnement génétique de l'IR1 des souches LL côté 5' .....	44
Figure 18 : Analyse PCR de l'environnement génétique de l'IR1 des souches LL côté 3' .....	44
Figure 19 : Localisation sur l'IR1 des amorces pour le séquençage Sanger.....	46

## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1 : Évolution annuelle des principaux indicateurs .....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau 2 : Principaux variants du promoteur Pc des intégrons de classe 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>Tableau 3: Description des souches isolées du patient LL .....</b>	<b>40</b>
<b>Tableau 4 : Exploration de l'environnement de l'IR des souches LL .....</b>	<b>45</b>

## Introduction

---

La mucoviscidose est la maladie génétique héréditaire la plus fréquente dans la population caucasienne, la France étant le 2<sup>ème</sup> pays européen le plus concerné.

Il s'agit d'une atteinte chronique, pouvant être diagnostiquée dans les 1ers jours de vie. L'espérance de vie des patients a été considérablement augmentée ces dernières années avec l'amélioration des prises en charge multidisciplinaires et l'amélioration des thérapeutiques, marquée par la mise sur le marché des tri-thérapies (kaftrio®).

Cependant, le pronostic vital du patient reste lié à l'atteinte broncho-pulmonaire caractérisée en grande partie par la colonisation chronique à divers germes bactériens, notamment *Pseudomonas aeruginosa*. La prise en charge de ces colonisations bactériennes nécessite en général une antibiothérapie au long court, propice à l'apparition chez les bactéries de résistances acquises aux antibiotiques.

L'étude du microbiote et de ses résistances acquises aux antibiotiques paraît être un enjeu majeur de la prise en charge des patients mucoviscidosiques.



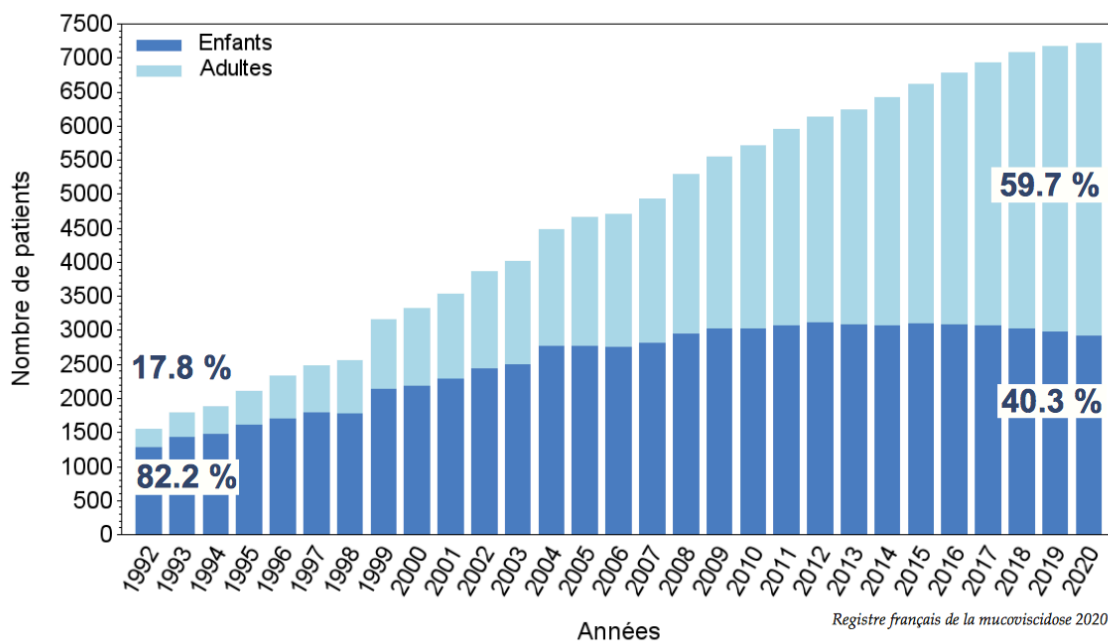
# I. La mucoviscidose

## I.1. Généralités

La mucoviscidose, ou fibrose kystique (CF pour Cystic Fibrosis), fut découverte en 1938 par le docteur Dorothy Hansine Andersen, qui mit en évidence les défauts de fluidité des mucus obstruant les canaux glandulaires, puis cœliaque, sur des autopsies de nourrissons (1). En 1953 furent mis en évidence les défauts électrolytiques de la sueur par le docteur Di Sant’Agnese (2). Enfin, en 1989 le gène *CFTR* à l’origine de la maladie était isolé et séquencé par les équipes de Tsui, Collins et Riordan (3–5) notamment grâce à l’essor de la biologie moléculaire. Il s’agit d’une maladie chronique et généralement progressive, apparaissant souvent à la naissance.

## I.2. Épidémiologie

La mucoviscidose touche plus de 85 000 personnes dans le monde, et en France le nombre de cas est en augmentation depuis 1992 pour atteindre 7376 en 2020 (6) (7) (**Figure 1**). Elle montre une disparité importante entre régions et entre ethnies, cependant, elle atteint autant les hommes que les femmes (**Tableau 1**). L’espérance de vie est passée de 5 ans dans les années 60 à plus de 50 ans de nos jours, grâce à l’amélioration des prises en charge et des traitements (7).



**Figure 1: Évolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose depuis 1992**

**Tableau 1 : Évolution annuelle des principaux indicateurs**  
(D'après le registre français de la mucoviscidose 2020 (7)).

Indicateurs	Années d'enquête										
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Patients recensés*	5715	5969	6138	6252	6428	6630	6788	7078	7183	7290	7376
Patients vus dans l'année**	5706	5957	6126	6241	6414	6620	6781	6935	7075	7164	7216
Enfants	3018	3068	3108	3086	3070	3097	3081	3063	3016	2971	2909 (40.3 %)
Adultes	2688	2889	3018	3155	3344	3523	3700	3872	4059	4193	4307 (59.7 %)
+ de 40 ans	339	399	452	509	586	668	758	825	910	986	1056 (14.6 %)
Hommes	2940	3085	3166	3223	3314	3442	3548	3618	3683	3739	3747 (51.9 %)
Femmes	2766	2872	2960	3018	3100	3178	3233	3317	3392	3425	3469 (48.1 %)
Age moyen (années)	18.5	19.1	19.5	20.1	20.7	21.1	21.8	22.3	22.9	23.4	23.9
Age médian (années)	16.9	17.4	17.8	18.2	18.9	19.3	19.9	20.3	20.9	21.3	21.9
Age minimum (années)	0.1	0	0.1	0.1	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0
Age maximum (années)	80	88	86.8	82.5	82.8	83.2	84.1	85.1	86.1	84.6	85.6

Registre français de la mucoviscidose 2020

\*Patients pour lesquels le statut vital est connu, qu'ils aient été vus ou non par un centre.

\*\*Patients de référence pour les statistiques figurant dans ce rapport, hormis les données sur les décès.

### I.3. Étiologie (physiopathologie)

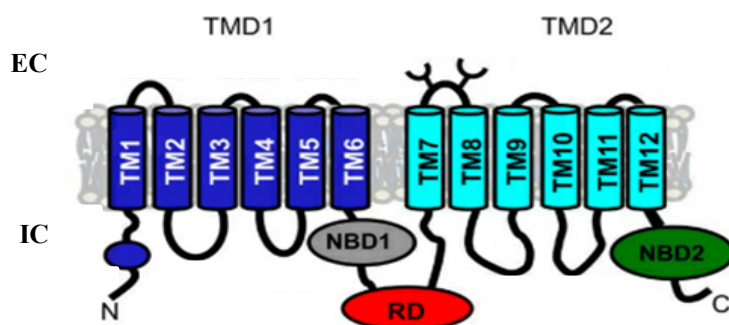
#### I.3.1. Le gène *CFTR*

Le gène *CFTR*, pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*, est situé sur le bras long du chromosome 7. Il s'agit d'un gène de 189 kb (kilobase), réparti en 27 exons, à l'origine d'un ARMm de 6.5 kb (3). Ce sont des mutations sur ce gène qui engendrent la mucoviscidose.

#### I.3.2. La protéine *CFTR*

La protéine *CFTR* est un peptide transmembranaire de 170 kDa (kiloDaltons), ayant le rôle de canal anionique dépendant de l'ATP, activé par une Protéine Kinase A (PKA). Elle fait partie de la superfamille des « ATP Binding Cassette » (ou transporteurs à cassettes liant l'ATP). Son rôle principal est de réguler la balance électrolytique et hydrique des membranes plasmiques afin de garantir un maintien des constantes des milieux intra et extra cellulaires (8).

Schématiquement, la protéine *CFTR* possède deux domaines transmembranaires (TDM1 et TDM2), chacun suivi d'un domaine de liaison aux nucléotides cytosoliques (NBD1 et NBD2) (**Figure 2**). Enfin elle possède un domaine régulateur unique (RD), situé entre TMD et NBD, contenant de multiples résidus sérine/thréonine permettant la phosphorylation via la PKA, condition préalable au fonctionnement du canal ionique dépendant de l'ATP (9)(10).



**Figure 2 : Structure secondaire de la protéine CFTR**

TMD = Domaine TransMembranaire avec TM = passage TransMembranaire ; NBD1 = Domaine de Liaison des nucléotides (ATP) ; RD = Domaine régulateur ; EC = milieu extracellulaire ; IC = milieu intracellulaire (d'après (10))

La protéine CFTR est ubiquitaire. Elle est retrouvée au niveau des membranes apicales des cellules épithéliales du pancréas, des glandes salivaires et sudoripares, des poumons, du foie, des intestins et des appareils génitaux, avec des degrés d'expression variés (11).

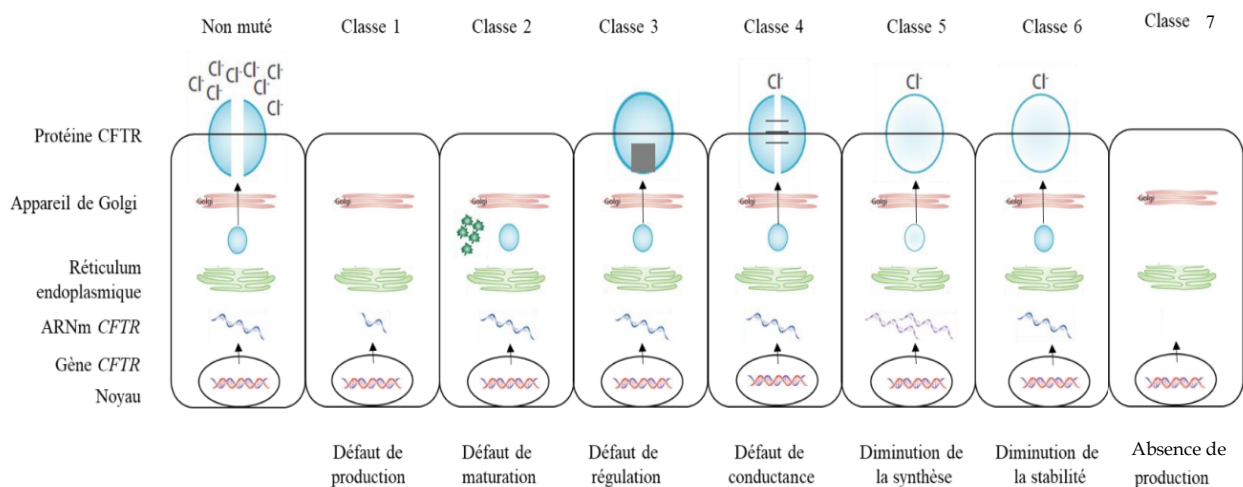
La protéine CFTR est un canal chlore permettant le passage des ions  $\text{Cl}^-$  de l'espace intracellulaire de la cellule vers l'espace extracellulaire (10).

### I.3.3. Mutations du gène *CFTR*

Près de 2000 mutations du gène *CFTR* ont été rapportées dans la littérature scientifique à ce jour. Parmi elles, près de 400 sont responsables d'altération de la protéine CFTR. Ces mutations sont catégorisées selon leur nature et leurs conséquences fonctionnelles. Ainsi on distingue 7 classes de mutation (**Figure 3**) (12) :

- Classe I : mutation « non-sens » (codon stop) entraînant la synthèse d'un ARNm plus court et sa traduction en une protéine instable qui sera dégradée plus rapidement. Cela aboutit à une faible production de la protéine CFTR.
- Classe II : défaut de maturation cellulaire de la protéine CFTR (anomalie de repliement ou anomalie de circulation intracellulaire) conduisant à sa dégradation par le protéasome. Il s'agit de la classe de mutations la plus représentée, avec notamment la mutation Delta F508 qui est la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose. Elle représente 66% des mutations du gène *cfr* dans le monde (13).
- Classe III : mutations « faux-sens » affectant la liaison de l'ATP aux domaines intracellulaires NBD1 et 2. Il en résulte une anomalie de l'ouverture et du fonctionnement du canal CFTR.
- Classe IV : mutations « faux-sens » qui perturbent la conductance du canal CFTR, altérant l'efflux des ions  $\text{Cl}^-$ .

- Classe V : ces mutations entraînent la synthèse d'un ARNm instable qui sera dégradé plus rapidement, entraînant une moindre production de la protéine CFTR.
- Classe VI : mutations engendrant une instabilité de la protéine CFTR. Bien qu'elle soit présente en quantité normale au niveau apical de la cellule, la protéine sera rapidement internalisée et dégradée dans les lysosomes.
- Classe VII : délétions ou mutations engendrant un décalage du cadre de lecture aboutissant à l'absence d'ARNm. Ce septième groupe a été défini avec l'essor des thérapies ciblées. En effet ces mutations ne permettent pas l'utilisation de ces thérapies-là.

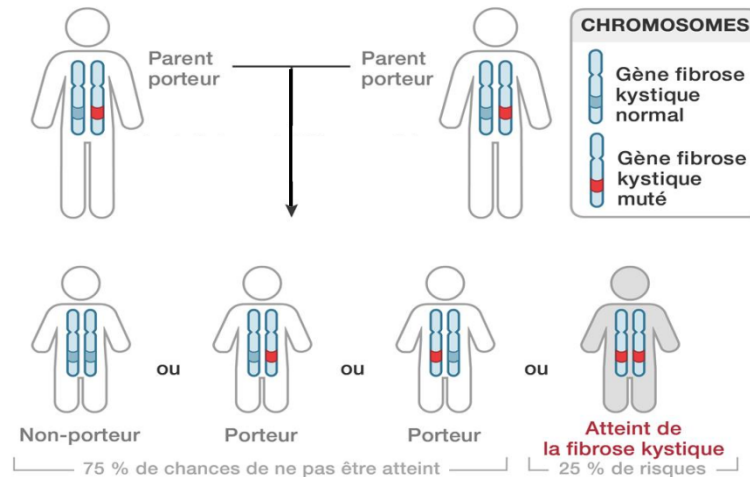


**Figure 3 : Classification des mutations du gène *CFTR***  
(d'après Boyle and De Boeck, 2013 (14))

Cette classification présente cependant des limites car la plupart des mutations ne peuvent appartenir à une seule classe. Par exemple la mutation de classe II F508del possède des caractéristiques des classes III et VI.

#### I.4. Mode de transmission

La mucoviscidose est une maladie génétique héréditaire se transmettant via un mode autosomique récessif. Cela signifie que le patient est porteur de deux allèles mutés transmis en un exemplaire par chaque parent. **(Figure 4)**.



**Figure 4 : Mode de transmission**

Les deux parents représentés en haut du schéma sont porteurs sains, c'est-à-dire porteur d'une mutation sur un seul allèle. Un descendant reçoit un allèle de la mère et un allèle du père. Les quatre possibilités de combinaison allélique sont représentées en bas du schéma. *(D'après AboutKidsHealth.ca)*

#### I.5. Phénotype

La corrélation entre le génotype et le phénotype est faible (15). De plus il existe une grande hétérogénéité phénotypique, tant sur la clinique, que sur l'âge d'apparition de la maladie. Il a été mis en évidence que ces différences d'expression sont dû à l'environnement du patient, mais également à des « gènes modificateurs » capables de moduler l'expression phénotypique de la mucoviscidose (16).

#### I.6. Manifestations cliniques

Les mutations décrites ci-dessus engendrent des perturbations de tous les organes exocrines comme le pancréas, les poumons, les glandes salivaires et sudoripares, l'intestin, le foie, les appareils génitaux, etc (17).

##### I.6.1. Atteinte pulmonaire

L'atteinte du canal chlore engendre une diminution des efflux d'ion  $\text{Cl}^-$ , qui va conduire à une déshydratation du mucus recouvrant la surface bronchique. Ce mucus épais et muqueux va entraver la clairance muco-ciliaire et entraîner une obstruction pulmonaire à l'origine des symptômes bronchiques (quintes de toux persistantes, sifflements respiratoires).

Cela favorise également l'installation d'agents infectieux, notamment *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* responsables de l'aggravation de l'affection, de par leurs nombreux facteurs de virulence, leur chronicité et par la réaction inflammatoire qu'ils entraînent. D'autres germes sont également fréquemment retrouvés, à savoir *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* à différents âges de la vie du patient (18).

La primo infection à *P. aeruginosa* survient vers l'âge de 10 ans et 95% des patients en phase terminale sont contaminés (18). *P. aeruginosa* aura notamment comme caractéristique de former un biofilm d'alginate (slime) créant un milieu de croissance privilégié, où les agents phagocytaires et les antibiotiques auront du mal à pénétrer. Chez les patients mucoviscidosiques, la production d'alginate est telle que les colonies sont dites « mucoïdes », contribuant à la viscosité des sécrétions bronchiques. L'incidence de ces souches mucoïdes augmente avec l'âge et avec l'évolutivité de la maladie (19).

La sévérité de l'atteinte respiratoire conditionne le pronostic vital dans la majorité des cas. Ces atteintes peuvent aboutir à la greffe pulmonaire. Des traitements d'aérosolisation, de kinésithérapie et d'antibiothérapie sont nécessaires tout au long de la vie du patient afin de préserver son état pulmonaire.

### **I.6.2. Atteintes extra-pulmonaires**

Les troubles extra-pulmonaires sont caractérisés par des atteintes gastro-intestinales, dues à des troubles de la motilité gastrique, avec dès les premiers jours de vie l'absence d'émission du méconium, puis une obstruction partielle ou complète de l'intestin grêle, mais aussi des troubles de l'absorption.

On retrouve également des atteintes pancréatiques. Les fonctions exocrines sont détériorées par l'accumulation du mucus au niveau des canaux biliaires pancréatiques, aboutissant à une fibrose pancréatique et une destruction des îlots de Langerhans engendrant des troubles endocrines de type diabète. Les atteintes pancréatiques signent un phénotype sévère de mucoviscidose.

De la même manière, des atteintes hépatiques sont récurrentes par l'accumulation du mucus au niveau des canaux biliaires intra-hépatique aboutissant à une cholestase, voir à une cirrhose.

Enfin, les patients mucoviscidosiques peuvent présenter une hypofertilité, des atteintes rénales, une sensibilité plus importante à la déshydratation, des atteintes ORL plus récurrentes, et des troubles staturo-pondéraux importants (20).

### **I.7. Dépistage et diagnostic biologique de la mucoviscidose**

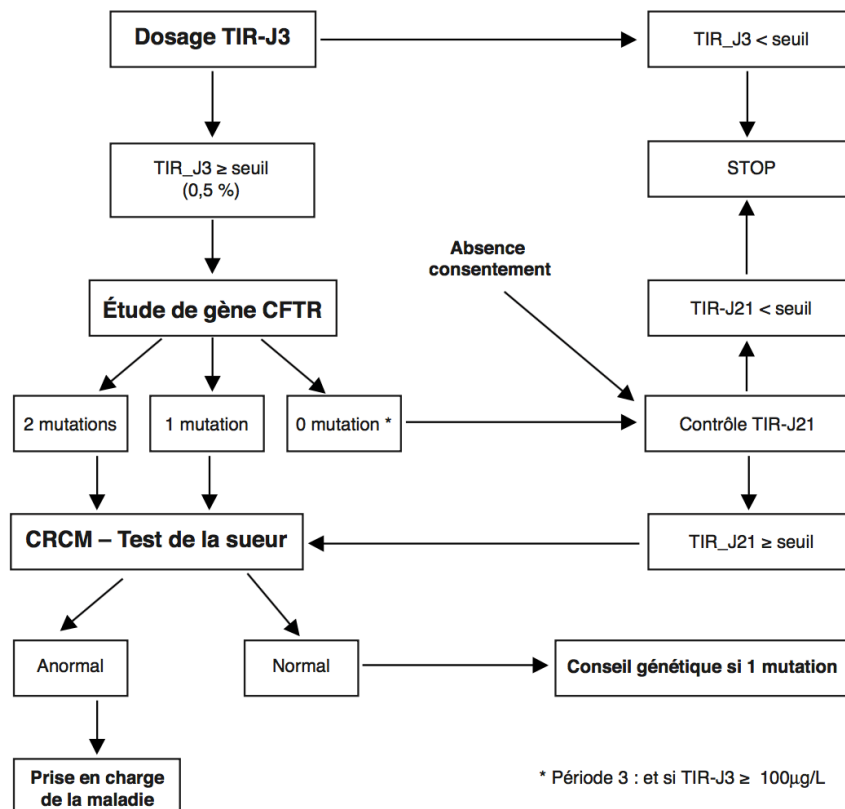
Il existe depuis 2002 un dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose via le test de Guthrie (20). Il est organisé en plusieurs étapes (**Figure 5**) ; le test de dépistage est le dosage sanguin de la Trypsine ImmunoRéactive (TIR). L'étude du gène *CFTR*, associé ou non au test à la sueur permet de confirmer le diagnostic (22).

Le dosage sanguin de la TIR (recueilli sur papier buvard) est réalisé au 3<sup>ème</sup> jour de vie. La concentration sanguine en TIR sera augmentée en cas d'anomalie pancréatiques pendant la

vie fœtale. La TIR est considérée augmentée lorsqu'elle est supérieure à 65 µg/L de sang. Ce test permet de repérer plus de 95% des nouveau-nés atteints, mais possède une faible spécificité, d'où son couplage avec les tests moléculaires afin d'éliminer les faux positifs. Un second dosage au 21<sup>e</sup> jour de vie peut également être réalisé.

L'étude génétique est réalisée en cas de TIR supérieure au seuil, avec accord des parents, et permet de confirmer le diagnostic. Il s'agit d'un screening des 29 mutations du gène *CFTR* les plus fréquentes. Le diagnostic de mucoviscidose est posé par l'identification de 2 mutations pathogènes du gène *CFTR* recensées dans l'une des 3 bases de données suivantes : CFTR1, CFTR2 ou CFTR-France.

Enfin, le test à la sueur peut également être pratiqué dans le cadre du diagnostic néonatal, ou en cas de suspicion clinique chez un patient. Le recueil de la sueur s'effectue par iontophorèse après stimulation par la pilocarpine. Un taux élevé d'ion chlorure Cl<sup>-</sup> dans la sueur permet de confirmer le diagnostic. En effet, les mutations du gène *CFTR* entraîne au niveau des glandes sudoripares un déficit d'absorption des ions Cl<sup>-</sup>. L'interprétation des résultats de la chlorurométrie dépend de la technique de dosage et de l'âge du patient (23).



**Figure 5 : algorithme du dépistage néonatal de la mucoviscidose en France**

(d'après le rapport HAS – 2009 (24))

Il existe également un dépistage pré-natal en cas de grossesse à risque, à savoir si les deux parents sont hétérozygotes pour le gène *CFTR*. Ce test est réalisé sur des échantillons de villosités chorales, après la huitième semaine de gestation (25).



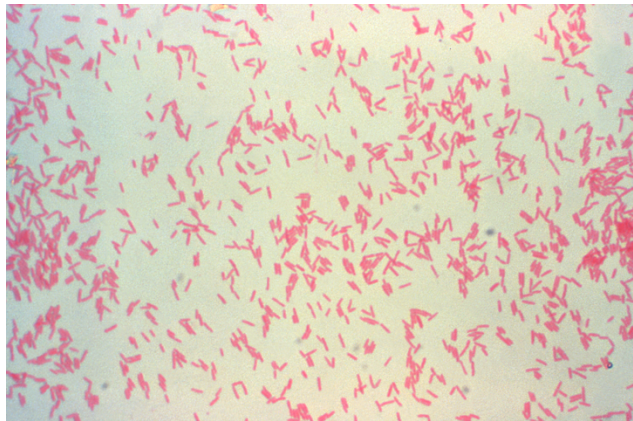
## II. *Pseudomonas aeruginosa*

---

*P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une espèce bactérienne appartenant à la classe des Gamma-proteobacteria, et à la famille des Pseudomonadaceae. Son génome estimé à environ 6 millions de pb lui confère une grande complexité génétique lui permettant de croître dans des environnements divers (26)(27).

### II.1. Caractères microbiologiques

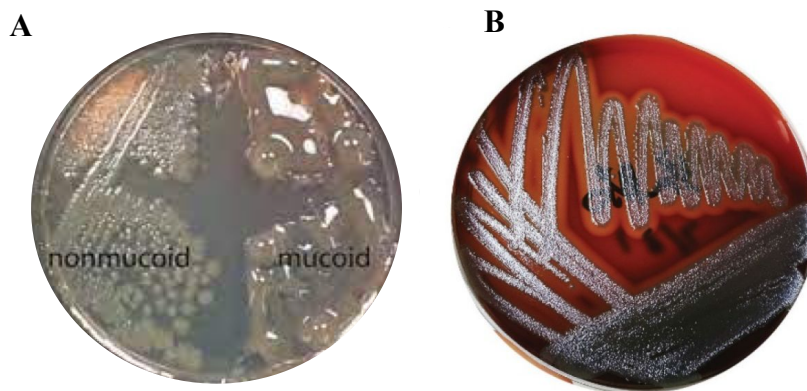
Il s'agit d'un bacille à Gram négatif fin et droit **Figure 6**, aérobic strict, non fermentaire, oxydase +, possédant à l'état frais une mobilité caractéristique par ciliature polaire monotriche. On compte aujourd'hui 20 sérotypes différents, caractérisés par l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe.



**Figure 6 : Photo de *P. aeruginosa* au microscope optique (x500)**  
(d'après *Public Health Image Library*)

Le bacille pyocyanique est un organisme non fastidieux cultivable sur gélose ordinaire à une température optimale de 37°C. Certains milieux comme les géloses cétrimide, contenant des ammoniums quaternaires, permettent son isolement à partir de prélèvements polymicrobiens. Il peut présenter des aspects différents sur gélose allant de la colonie dite « large », plate, à bord irréguliers, avec des reflets métalliques, à la colonie « muqueuse » bombée, produisant un *slime*, rencontrée dans les colonisations chroniques, sur matériel ou chez le patient mucoviscidosique par exemple (**Figure 7**). De plus il présente une  $\beta$ -hémolyse sur gélose au sang.





**Figure 7 : Culture de *P. aeruginosa***

**A** : colonies de type non mucoïde à gauche, et mucoïde à droite, sur gélose cétrimide ; **B** : colonies présentant des reflets métalliques et une hémolyse sur gélose au sang.

*P. aeruginosa* a la particularité d'exprimer deux pigments en culture sur milieux de King A et B, la pyoverdine (jaune-vert et fluorescent) et la pyocyanine (bleu-vert). Enfin les colonies dégagent une odeur caractéristique proche du seringa, due à l'O-amino-acétophénone (27).

## II.2. Habitat et pouvoir pathogène.

*P. aeruginosa* est un germe ubiquitaire, retrouvé majoritairement aux seins des milieux aquatiques, principalement d'eau douce (eaux usées, piscines, canalisations) mais également dans les sols, sur des plantes ou chez certains animaux. Il s'agit d'un pathogène opportuniste, profitant d'une baisse de l'immunité systémique (neutropénie, VIH, ...) ou locale (bronchiectasie), d'une rupture des barrières physiques (brulures, cicatrices, blessures, ...) ou de la présence de matériel (intubation-ventilation, cathéter, sonde vésicale, lentilles oculaires, ...)(26).

Il est en grande partie responsable d'infections nosocomiales, posant un problème de santé publique. Il est à l'origine de 10% des infections nosocomiales derrière *S. aureus* et *Escherichia coli* (Institut de veille sanitaire, RAISIN), et représente la première cause de mortalité et de morbidité des patients mucoviscidosiques. La contamination se fait de manière directe, via l'inhalation de gouttelettes contaminées, ou indirecte par manu portage ou via du matériel médical souillé (cathéter, sonde, etc). Les atteintes qu'il engendre sont multiples : infections superficielles (abcès de cornée, infections de plaie) ; infections urinaires sur sonde ; bactériémies ; infections bronchopulmonaires (acquises sous ventilation mécanique ou non, patient mucoviscidosique, surinfections) (28).

Les différentes formes cliniques et leurs sévérités sont dues à la diversité des facteurs de virulence qu'il produit (29).

Certains facteurs de virulence sont présents à la surface de la bactérie :

- le flagelle : unique et polaire, il est impliqué dans la mobilité de la bactérie en milieu liquide (« swimming »). Il est également impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales. Il s'agit d'un des composants majeurs de l'immunogénicité de la bactérie (30)(31) ;

- les pili de type IV : principale adhésine du germe, permettant une forte liaison aux épithéliums, notamment respiratoire, et des déplacements de type « twitching » sur milieu solide et « swarming » sur support semi-solide (32);
- les pili de type fimbriae (Cup A, B et C) : participent à l'adhésion aux épithéliums et sur les matériaux ;
- le lipopolysaccharide (LPS) : fait partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il permet d'une part au germe de se protéger de la lyse, et d'autre part il joue un rôle d'endotoxine, via l'endotoxine A, puissant stimulant du système immunitaire, pouvant conduire au choc septique. En outre le LPS contient l'antigène O, dont la variabilité polysaccharidique définit les différents sérotypes de *P. aeruginosa* (33) ;
- les exopolysaccharides, comme l'alginate : principal constituant du biofilm. Ce système immuno-évasif permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte, et diminue l'action des antibiothérapies (34). Il est caractéristique des infections chroniques, notamment chez les patients mucoviscidosiques ;
- les lectines LecA et LecB : protéines cytoplasmiques et membranaires impliquées dans l'adhésion de la bactérie aux cellules hôtes. Elles ont également un rôle cytotoxique dans l'induction des lésions pulmonaires (35) ;
- les chromophores (pyocyanine et pyoverdine) : La pyocyanine réprime la réponse immunitaire de l'hôte en dégradant les polynucléaires neutrophiles. De plus elle possède une activité oxydo-réductrice participant à la nécrose tissulaire. La pyoverdine est un chélateur du fer, nécessaire au métabolisme de *P. aeruginosa* qui joue également un rôle dans la régulation de certains facteurs de virulence (36).

D'autres facteurs de virulence sont eux secrétés dans le milieu extracellulaire, voire dans les cellules cibles, par la bactérie (29) :

- l'exotoxine A : composé le plus toxique produit par *P. aeruginosa*. Il entraîne la mort cellulaire par inhibition de la synthèse protéique (37) ;
- l'élastase : permet la dégradation de l'élastine, de la fibrine et du collagène tissulaire par l'action de deux protéases complémentaires LasA et LasB. Elle est également capable d'inactiver certaines cytokines et immunoglobulines du système immunitaire de l'hôte ;
- les phospholipases C : enzymes extracellulaires à un effet cytolytique local ;
- les rhamnolipides : lipides extracellulaires contribuant à l'invasion tissulaire, notamment au niveau pulmonaire. Il perturbe le transport mucociliaire pulmonaire et dégrade le surfactant pulmonaire. De plus il inhibe la phagocytose ;
- la protéase alcaline et la protéase IV : permettent la dégradation de la fibrine. Elles sont fortement impliquées dans les atteintes oculaires. Elles permettent aussi la dégradation du surfactant pulmonaire ;
- les exo-enzymes S, T, U et Y : toxines induisant l'apoptose des cellules cibles. Elles ont la particularité d'être secrétées par le système de sécrétion de type III qui permet au germe d'injecter directement l'enzyme dans la cellule de l'hôte.

Une partie des facteurs de virulence sont régulés par le « *quorum sensing* ». Il s'agit du principal mécanisme de régulation de la pathogénicité de *P. aeruginosa*, fondé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles via la production de N-acyl-homosérine lactones (AHL). Cela permet aux bactéries d'agir comme un organisme multicellulaire et de coordonner la synthèse des facteurs de virulence (36).

### II.3. Résistances aux antibiotiques

*P. aeruginosa* est caractérisé par un grand nombre de résistances naturelles aux antibiotiques du fait de son bagage enzymatique et de certaines particularités anatomiques. Ainsi comme tous les BGN, il est naturellement résistant aux glycopeptides, au linézolide et à la daptomycine. De plus, il exprime plusieurs gènes lui conférant d'autres résistances naturelles. Enfin certaines mutations ponctuelles ou des gains de gènes peuvent lui permettre d'exprimer des résistances acquises (38).

#### II.3.1.1. Résistances aux $\beta$ -lactamines

- *ampC* est un gène chromosomique codant la production d'une céphalosporinase large spectre inductible. A l'état naturel celle-ci est partiellement inhibée par AmpR et AmpD entraînant tout de même des résistances à l'amoxicilline, aux C1G, aux C2G, au Céfotaxime, à la Céftriaxone et à l'Ertapénème.

*P. aeruginosa* peut acquérir des mutations modifiant l'inhibition du gène *ampC* et accentuant les résistances qu'il confère (hyperproduction de la céphalosporinase), la souche devient alors résistante à toutes les pénicillines, les céphalosporines ainsi qu'à l'Aztreonam, ne laissant actives que les carbapénèmes. Il s'agit du mécanisme de résistances acquis aux  $\beta$ -lactamines le plus fréquent.

- OXA-50 code pour une oxacillinase à spectre étroit qui diminue la sensibilité à l'ampicilline et à la ticarcilline.

-  $\beta$  lactamases acquises, souvent codées par des plasmides. Il s'agit le plus souvent de simples pénicillinases à spectre étroit, rarement de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE). De rares carbapénémases ont été décrites chez *P. aeruginosa*.

- L'imperméabilité aux carbapénèmes est le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa*. Elle est due à des mutations du gène *oprD<sub>2</sub>*, entraînant la perte d'activité de la porine D<sub>2</sub>, et conférant une résistance de haut niveau à l'imipénème et une diminution de la sensibilité du méropénème.

- MexAB-OprM est un système d'efflux actif. MexA est une lipoprotéine de liaison à la membrane, MexB une pompe, et OprM est la porine par laquelle l'antibiotique est expulsé de la cellule. De même, MexAB-OprM peut être surexprimé, conférant une résistance à la ticarcilline associée ou non à l'acide clavulanique, un phénotype intermédiaire à l'aztreonam voire même une augmentation des CMI du méropénème.

- MexXY/OprM est également un système d'efflux actif pouvant être surexprimé et conférer des résistances au céfépime (ainsi que des phénotypes intermédiaires à la gentamicine et à l'amikacine).

### II.3.1.2. Résistances aux autres antibiotiques

Concernant les fluoroquinolones, l'acide nalidixique et l'ofloxacine sont inactifs sur *P. aeruginosa*. La ciprofloxacine est la fluoroquinolone la plus active. La résistance à cette molécule vient principalement de mutations sur les gènes cibles de la topoisomérase II (*gyrA*) et IV (*parC*).

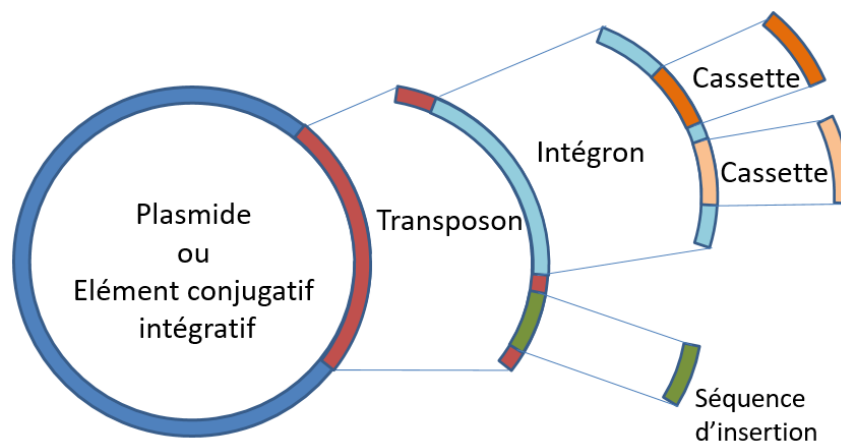
*P. aeruginosa* présente une résistance naturelle à la kanamycine. Les résistances aux aminosides sont dues en grande majorité à l'acquisition d'enzymes inactivatrices, l'aminocétyltransférases AAC(6')-I, l'aminophosphotransférases APH(3')-II et l'aminonucléotidyltransférase ANT. Elles peuvent également être dues à une imperméabilité via la pompe d'efflux MexXY-OprM. Les phénotypes sont généralement complexes, associant plusieurs degrés d'activités et plusieurs mécanismes.

Devant l'apparition de souches multirésistantes aux antibiotiques communément utilisés, la colistine, voire la fosfomycine et la rifampicine peuvent être utilisés.

### III. Les intégrons de résistances

Les intégrons de résistances (IRs) ont été découverts par *Stokes et Hall en 1989*, et définis comme des systèmes génétiques capables de capturer et d'exprimer des gènes sous forme de cassettes (39). Ils contiennent en moyenne 2 à 3 cassettes qui hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques, de rares IRs ont été décrits avec 10 cassettes (40). Plus de 130 cassettes ont été décrites, concernant quasiment toutes les familles d'antibiotiques (beta-lactamines, aminosides, macrolides, quinolones, triméthoprine, chloramphénicol, fosfomycine, rifampicine) (41)(42).

Bien que les IR soient des entités immobiles, ils sont majoritairement portés par des éléments génétiques mobiles (EGM) tels que les plasmides ou les transposons (**Figure 8**), pouvant ainsi engendrer un transfert de gène de résistances entre bactéries. Les IRs sont ainsi fortement impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques, surtout chez les bactéries à Gram négatif. Les IRs sont considérés comme responsables de 80% de la multi-résistance aux antibiotiques en milieu clinique (43). De plus, des études récentes ont montré de très bonnes valeurs prédictives négatives des IRs concernant la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, au thriméthoprine-sulfaméthazole ainsi qu'aux aminosides, faisant des IRs de bons marqueurs de résistance, élément important dans la prise en charge du patient (44) (45).

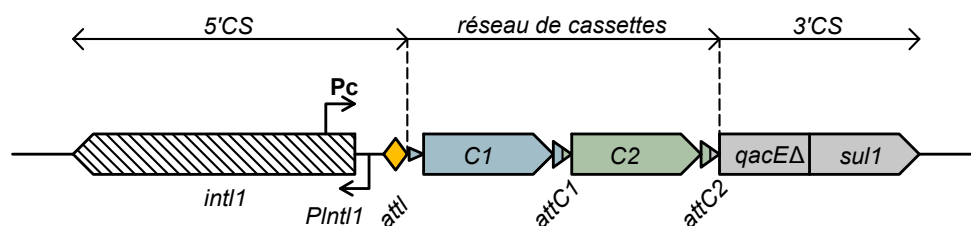


**Figure 8 : Relation possible entre les Éléments Génétiques Mobiles bactériens**

Plasmide : élément mobile répliatif ; Transposon : élément mobile non répliatif ; Intégron : élément non mobile non répliatif ; Cassette : élément mobile non répliatif (D'après *E. Couvé-Deacon, 2017*(45))

#### III.1. Structure des intégrons de résistance

Un IR est composé en général de 3 régions distinctes, la région 5' conservée (5'CS), la région 3' conservée (3'CS) et la région variable (réseau de cassettes) (**Figure 9**).



**Figure 9 : Schéma d'un intégron de résistance de classe 1**

*int1* = gène de l'intégrase ; *Pint11* = promoteur du gène de l'intégrase ; *Pc* = promoteur de cassette ; *attI*, *attC* = sites de recombinaison spécifique ; C1 et C2 = cassette de gène 1 et 2 ; *qacEΔ* = gène *qacEΔ* ; *sul1* = gène *sul1*.

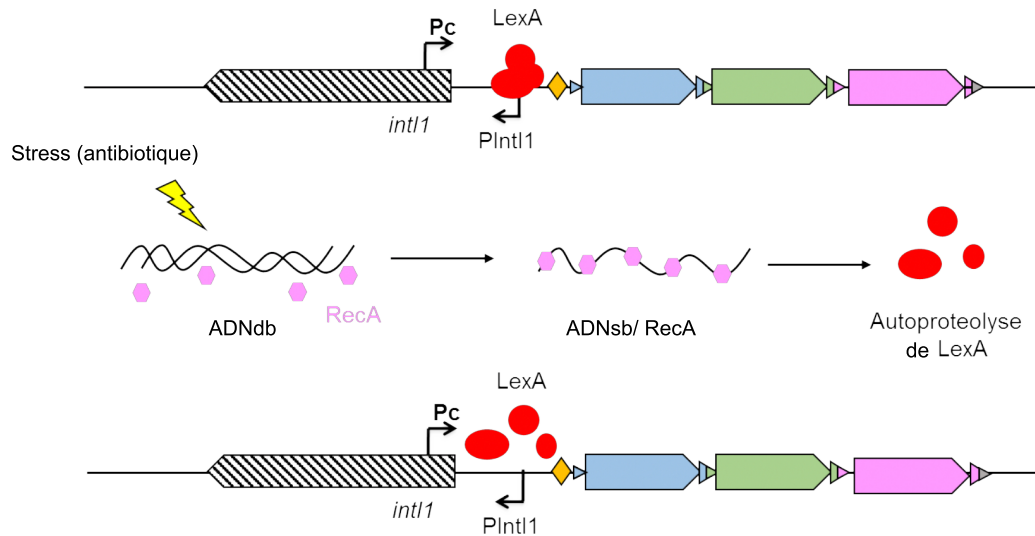
### III.1.1. Région 5' conservée

La région conservée en 5', ou 5'-CS pour « 5' conserved segment », est aussi appelée plateforme fonctionnelle. Elle comprend les 3 éléments définissant l'intégron et permettant son action, à savoir le gène *int1* et son promoteur *Pint11*, le site de recombinaison (d'intégration) spécifique *attI*, et le promoteur *Pc* (**Figure 9**).

#### III.1.1.1. L'intégrase *Int11*

Le gène *int1* code pour l'intégrase *Int11*. Il est orienté en sens inverse des autres gènes de l'intégron. L'expression de ce gène est sous le contrôle de son promoteur *Pint11*. L'intégrase *Int11* est une recombinase qui permet l'excision et/ou l'intégration de cassettes de gène grâce à la reconnaissance des sites de recombinaison spécifiques *attI* et *attC*. La séquence en acide aminé de la protéine *Int11* permet de définir 5 classes d'IR avec 40 à 60% d'homologie entre les intégrases des différentes classes d'IR (47). La classe 1 est la première découverte, la plus retrouvée en clinique humaine et par conséquent la plus étudiée. C'est celle-ci qui va nous intéresser tout au long de ce travail. Elle présente la variabilité la plus importante en réseau de cassette (48).

Chez les intégrons de classe 1, l'expression de l'intégrase est sous la dépendance de la réponse SOS bactérienne. A l'état basal, l'expression de l'intégrase est réprimée par la protéine LexA fixée sur le promoteur de l'intégrase *Pint11*, bloquant ainsi son activité. La réponse SOS est induite par la présence d'ADN simple brin pouvant être due à différents stress environnementaux physiques (UV, radicaux libres, ...) ou à certains antibiotiques ( $\beta$  lactamines, quinolones, métronidazole, triméthoprime) (49) (50) (51). La protéine RecA se fixe sur l'ADN simple brin, formant un nucléofilament protéique qui va entraîner l'autoprotéolyse de LexA permettant ainsi l'expression de l'intégrase (**Figure 10**).



**Figure 10 : Mécanisme de régulation de l'expression de l'intégrase via la réponse SOS**

*intI1* = gène de l'intégrase ; PIntI1 = promoteur du gène de l'intégrase ; Pc = promoteur de cassette ; ADNdb = ADN double brin ; ADNsb = ADN simple brin ; RecA = protéine RecA ; LexA = protéine LexA

### III.1.1.2. Le site de recombinaison *attI*

*attI* est le site de recombinaison servant de point d'insertion pour les cassettes. Il est spécifique de la classe d'IR, c'est-à-dire qu'à chaque classe d'intégron correspond un site *attI*. Il est situé en aval de la plateforme fonctionnelle.

### III.1.1.3. Promoteur de cassettes, Pc

Le promoteur de cassette Pc des intégrons de classe 1 est localisé dans la séquence codante du gène *intI1* et est responsable de l'expression des cassettes qui sont généralement dépourvues de promoteur. Plusieurs variants du promoteur Pc chez les IRs de classe 1 ont été décrits en fonction de la séquence nucléotidique de leurs boîtes -10 et -35. Les 5 variants de Pc les plus fréquents sont présentés dans le **Tableau 2**. Il est à noter que la force du promoteur varie d'un variant à l'autre (52).

Variants de Pc	Force relative	Séquence nucléotidique	
		Boîte -35	Boîte -10
PcW	1	TGGACA	TCNTAAGCT
PcH1	6	TGGACA	TCNTAAACT
PcW <sub>TGN-10</sub>	18	TGGACA	TGNTAAGCT
PcH2	20	TTGACA	TCNTAAGCT
PcS	25	TTGACA	TCNTAAACT

**Tableau 2 : Principaux variants du promoteur Pc des intégrons de classe 1**

Ce tableau indique les séquences des boîtes -10 et -35 du promoteur ainsi que la force relative des variants de Pc en se référant au variant le plus faible PcW dont la force relative est arbitrairement donnée à 1. PcW : Pc faible; PcH1 : Pc Hybride 1 ; PcW<sub>TGN-10</sub> : PcW avec motif TNG en amont de la boîte -10 ; PcH2 : Pc hybride 2 ; PcS : Pc fort.

### III.1.2. Région variable

La région variable des intégrons de résistance se situe en aval de la région 5'-CS. Elle est constituée par une ou plusieurs cassettes contenant chacune un gène. Elle est aussi appelée réseau de cassettes **Figure 9**.

#### III.1.2.1. Les cassettes de gène

Une cassette de gène est constituée d'un cadre de lecture ouvert (orf) (= séquence codant la protéine) en général sans promoteur, et d'un site de recombinaison *attC* lequel est spécifique de la cassette chez les IR de classe 1.

Les cassettes étant transcrites à partir du promoteur de cassette Pc (**Figure 9**) leur niveau d'expression dépend de la force du Pc (III.1.1.3) mais aussi de leur position par rapport à Pc avec un gradient d'expression : plus la cassette est proche du Pc, plus elle est exprimée (39).

#### III.1.2.2. Site de recombinaison *attC*

Le site *attC* est le site de recombinaison spécifique de la cassette, qui sera reconnu par l'intégrase et servira de substrat à la réaction de recombinaison. La reconnaissance de *attC* par *attI* permet à toutes les cassettes d'un réseau d'être orientées dans le même sens, permettant leur expression à partir de Pc.

### III.1.3. Région conservée 3' (3'-CS)

La région 3'-CS se situe en aval de la région variable. Pour les intégrons de classe 1, elle contient deux gènes (41) :

- *qacEΔ1*, code une pompe à efflux qui confère à la bactérie une résistance de bas niveau aux antiseptiques et aux désinfectants type ammonium quaternaire et agents intercalants ;



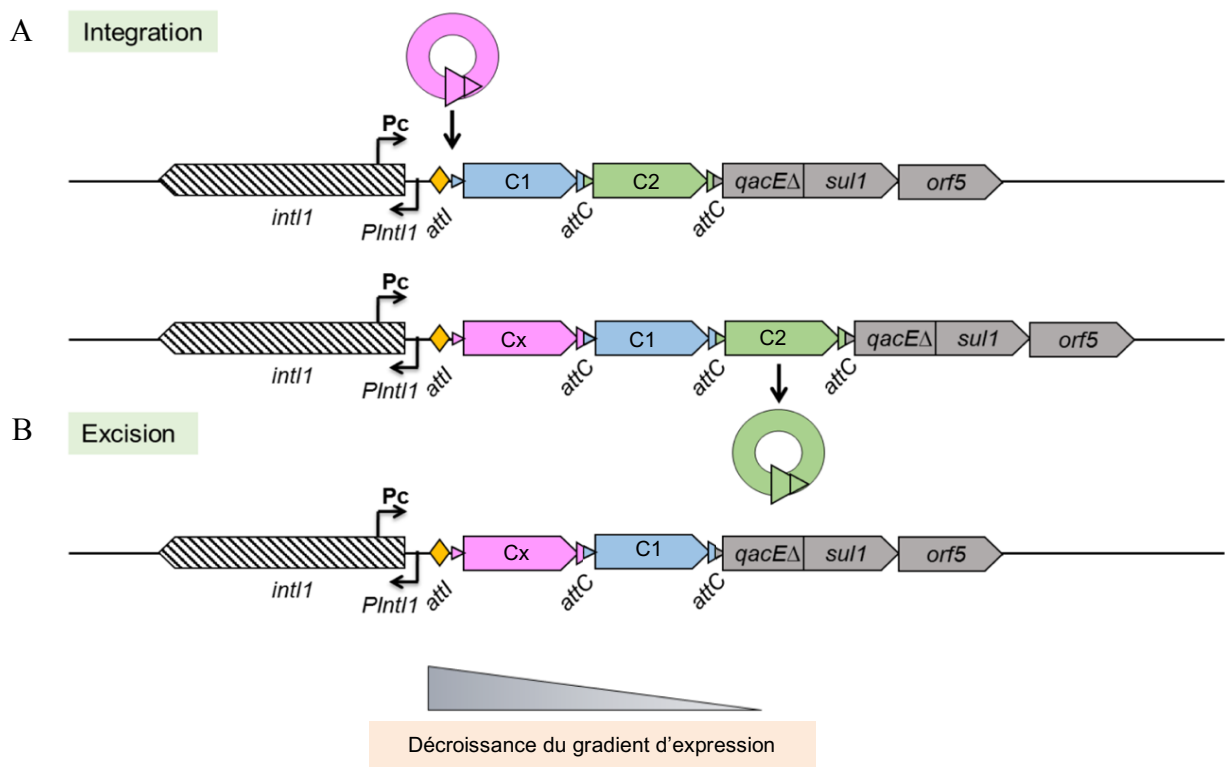
- *sul1* code une dihydroptéroate synthétase intervenant dans la synthèse de l'acide folique chez les bactéries, leur conférant une résistance aux sulfamides ;

Bien que cette région ait été nommée région 3' conservée, il est maintenant admis qu'elle peut présenter des modifications de séquence par rapport à la structure canonique ou même être totalement absente pouvant rendre des PCR de screening d'intégron faussement négatives.

### III.2. Mouvements des cassettes

Le mouvement des cassettes au sein de l'intégron est possible grâce à l'activité de recombinaison de l'intégrase IntI1. Il existe deux types principaux de recombinaison (39)(53) :

- L'intégration qui résulte d'une recombinaison spécifique entre le site *attI* et un site *attC* ; elle permet l'intégration d'une nouvelle cassette au sein de l'intégron, juste en aval du Pc (54) (**Figure 11 A**) ;
- L'excision qui résulte d'une recombinaison spécifique entre deux sites *attC*. La cassette excisée se retrouvera alors sous forme libre circulaire (**Figure 11 B**). Ne possédant pas d'origine de répllication, ces cassettes circulaires seront perdues en cas de division cellulaire si elles ne sont pas intégrées à nouveau au site *attI*.



**Figure 11 : Modèle de capture et d'excision des cassettes**

**A** : Intégration d'une cassette schématisée en rose, au niveau du site *attI* par recombinaisons entre le site *attI* et le site *attC* de la cassette ; **B** : excision de cassette en vert par recombinaison entre les 2 sites *attC*; *intI1* = gène de intégrase ; *PlntI1* = promoteur du gène de l'intégrase ; *Pc* = promoteur de cassette ; *attI* = site spécifique de recombinaison; C1, C2 et Cx = cassette de gène 1,2 et x ; *attC* = sites de recombinaison des cassettes ; *qacEΔ* = gène *qacEΔ* ; *sul1* = gène *sul1*

Ces évènements de recombinaison peuvent permettre un réarrangement de l'ordre des cassettes de gène au sein de l'intégron en réponse à un stress (antibiotique par exemple). Ainsi l'excision d'une cassette va permettre le rapprochement de la cassette en aval au promoteur P<sub>c</sub> ce qui permettra d'augmenter son niveau d'expression (**Figure 11**). Cet évènement peut conduire à l'expression d'une résistance auparavant silencieuse (sensible ou intermédiaire), comme décrit et *in vivo* par Hocquet et *al.* En 2012 (49) et par Barraud et Ploy en 2015 (55).

## IV. Objectifs

---

Une étude collaborative entre l'UMR1092 et le Centre de Ressource et de Compétence de la Mucoviscidose (CRCM) de Limoges, sur l'incidence des intégrons chez des souches de BGNs isolées d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose (CF) entre Octobre 2008 et Décembre 2015 a été réalisée.

Huit cent soixante-treize souches provenant de 42 patients ont été screenées ; 80 (9,2%) souches hébergeaient un IR1 (isolées de 14 patients). Dix-huit réseaux de cassettes ont été identifiés. Certains étaient retrouvés chez un même patient dans des espèces ou des clones différents, tandis que d'autres étaient retrouvés chez des patients différents dans des souches de même espèce ou d'espèces différentes. Les différents résultats obtenus ont permis de montrer que (i) des BGNs de patients CF peuvent acquérir un intégron au cours du temps, (ii) des échanges d'intégrons pourraient exister entre souches chez un même patient et (iii) des échanges de souches int1+ pourraient exister entre patients différents.

Le but de mon étude était d'analyser plus finement les souches isolées d'un patient, le patient LL, en y associant en plus les souches isolées depuis janvier 2016 jusqu'en 2020, soit un total de 56 souches (**Tableau 3**). L'étude précédente réalisée sur les 27 premières souches a montré que 10 souches hébergeaient un IR1 (9 souches de *P. aeruginosa* et 1 souche de *Pseudomonas putida*) et que le réseau de cassette pour chacune des souches était le même. De plus toutes les souches de *P. aeruginosa*, Int1+ et Int1-, étaient clonales. La souche LL21 avait été complètement séquencée et a servi de témoin lors de mon étude (56).

## V. Matériels et méthodes

---

### V.1. Souches, isolements et conservation

L'étude a été réalisée sur 56 souches de *Pseudomonas*, 54 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Pseudomonas putida* et 1 *Pseudomonas spp.*, isolées d'expectoration du patient LL entre 2008 et 2020 (27 entre 2008 et 2015 ; 29 entre 2016 et 2020) (**Tableau 3**).

Un antibiogramme a été réalisé selon les techniques de routine du laboratoire, à savoir sur gélose Mueller-Hington (MH), par technique de diffusion, avec une incubation en étuve à 35°C de 16 à 24h. Cet antibiogramme est lu par technique semi-automatisée SIR-Scan® et interprété selon les recommandations du CASFM-EUCAST 2019 en fonction du diamètre d'inhibition de pousse de la bactérie autour du disque d'antibiotique.

Une souche est différenciée d'une autre si elle présente dans un premier temps un aspect différent sur gélose, puis un antibiogramme différent dans un second temps. Deux colonies ayant un aspect différent sur gélose mais un antibiogramme identique sont considérées comme une seule et même souche. Seules les souches différentes de chacun des prélèvements ont été conservées en tube cryobille à -80°C.

### V.2. Screening des souches pour la recherche de la présence d'intégrons de classes 1

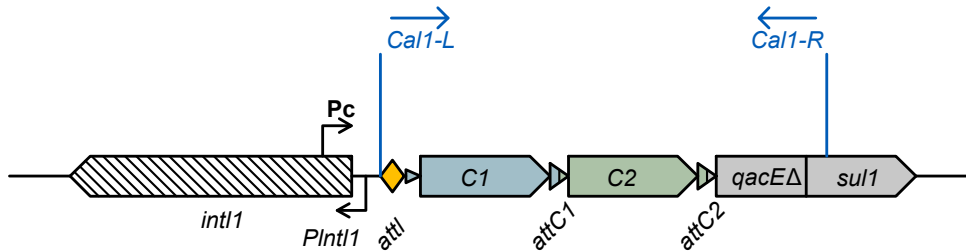
Le screening est réalisé à partir des souches conservées à -80°C, remises en culture sur gélose au sang, à 35°C pendant 24h. La technique de qPCR multiplex en temps réel décrite par Barraud *et al.* a été utilisée directement sur les colonies isolées sur la gélose (57).

### V.3. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN des souches a été extrait à partir d'un bouillon de culture over-night en milieu LB (milieu de culture nutritif, non sélectif) grâce à l'appareil SaMag12® de chez Sacacce Biotechnologies selon le protocole du fournisseur. L'ADN extrait a été dosé à l'aide du spectrophotomètre SKANIT® de chez Thermo Scientific puis tous les échantillons ont été calibrés à 20 ng/µl et conservés à -20°C.

#### V.4. PCR de cassette

La PCR de cassette consiste à amplifier la région variable à l'aide d'oligonucléotides situés dans les régions conservées 5'-CS et 3'-CS comme décrit dans la **Figure 12** ci-dessous.



**Figure 12 : Position des amorces Cal1-L et Cal1-R dans l'intégron de classe 1**

*intI1* = gène codant l'intégrase de classe 1 ; *P<sub>intI1</sub>* = promoteur d'*intI1* ; *P<sub>c</sub>* = promoteur de cassette ; *attI*, *attC* = sites de recombinaison spécifique ; *C1* et *C2* = cassette 1 et 2 ; *qacEΔ* = gène *qacEΔ* ; *sul1* = gène *sul1*.

La réaction de PCR contenait : 20 ng d'ADN, 7,5 µl de One taq® Quick-Load 2X Master Mix, 0,5 µl de primers Cal1-L et Cal1-R à 10 µM (Annexe 1.1) dans un volume final de 15 µl.

Le programme d'amplification utilisé était le suivant :

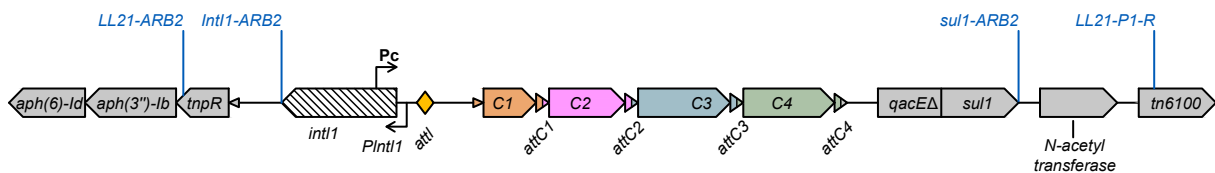
- 30 secondes à 94°C (dénaturation initiale de la matrice)
  - o 30 secondes à 94°C (dénaturation)
  - o 30 secondes à 55°C (hybridation)
  - o 5 minutes à 68°C (élongation)
- 7 minutes à 68°C (élongation finale)
- ∞ à 10-12°C

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega®) selon le protocole du fournisseur. L'ADN purifié a été dosé (cf V.3) et conservé à -20°C.

L'analyse des produits d'amplification a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% contenant l'agent intercalant Midori-Green® visible sous UV (dépôt de 5µl de produit de PCR). Après migration sous champ constant, les bandes d'ADN amplifiées ont été visualisées sur le gel éclairé aux UV à l'aide de l'appareil gel-doc EZ® de chez bioRad.

## V.5. Étude de l'environnement génétique des intégrons

Afin de comparer l'environnement de l'intégron des différentes souches, des PCR ont été réalisées du côté 5' et 3' de l'intégron avec respectivement les couples d'amorces LL21-P1-L / Int11-ARB2, et Sul1-ARB2 / LL21-P1-R (Figure 13). Les séquences des amorces sont disponibles en annexe (Annexe 1.2).



**Figure 13 : Position des amorces LL21-P1-L / Int11-ARB2 et Sul1-ARB2 / LL21-P1-R**

*int11* = gène de l'intégrase ; *PInt11* = promoteur du gène de l'intégrase ; *Pc* = promoteur de cassette ; *attI*, *attC* = sites de recombinaison spécifique ; C1, C2, C3 et C4 = cassette de gène 1, 2, 3 et 4 ; *qacEΔ* = gène *qacEΔ* ; *sul1* = gène *sul1* ; *aph(6)-Id* et *aph(3'')-Ib* : Aminoglycosides phosphotransferases ; *tnpR* et *tn6100* : gène de transposase respectivement d'un transposon de la famille Tn3 et d'une IS6100.

Le protocole de PCR est identique à celui détaillé dans la partie V.4, à la différence du temps d'élongation qui est de 1 minute. L'analyse post PCR est similaire à celle décrite dans la partie V.4.

## V.6. Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA)

Une réaction de PCR contenait : 20 ng d'ADN, 10 µl de One taq Quick-Load 2X Master Mix, de 0.4 µl de l'un des 15 couples de primers à 10 µM (Annexe 1.3) dans un volume final de 20 µl.

Le programme d'amplification était le suivant :

- 3 minutes à 94°C (dénaturation initiale de la matrice)
    - o 30 secondes à 94°C (dénaturation)
    - o 30 secondes à 60°C (hybridation)
    - o 1 minute à 68°C (élongation)
  - 5 minutes à 68°C (élongation finale)
  - ∞ à 10-12°C
- } x 30

La réaction avec le même couple de primers était réalisée en même temps pour toutes les souches à comparer. Les produits de PCR de MLVA ont été analysés sur un gel d'agarose à 2% comme décrit précédemment (V.4).

## V.7. Séquençage Sanger

### V.7.1. Amplification et purification du fragment à séquencer

Réaction de PCR : 20 ng d'ADN, 25 µl de Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2X), 2,5 µl de primers Cal1-L et Cal1-R (Annexe 1.1) à 10 µM dans un volume final de 50 µl permettant l'amplification d'un fragment d'ADN de 4030 pb.

Programme d'amplification :

- 30 secondes à 98°C (dénaturation initiale de la matrice)
    - o 10 secondes à 98°C (dénaturation)
    - o 30 secondes à 66°C (hybridation)
    - o 1 minute 30 sec à 72°C (élongation)
  - 2 minutes à 72°C (élongation finale)
  - ∞ à 4°C
- } x 30

Le produit de PCR est ensuite purifié à l'aide du kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega®) selon le protocole du fournisseur.

### V.7.2. Réaction de séquence

Dans un volume final de 20 µl, les PCR de séquence ont été réalisées en utilisant 4 µl de BIG DYE®, 2 µl de tampon BIG DYE®, 0,32 µl de chaque amorce à une concentration de 1µM (Annexe 1.4), 8,44 µl d'eau et 3 µl de produit de PCR dosé à 46,5 ng/µl. Les réactions de séquences sont réalisées sur le thermocycler 2720 Thermal cycler® selon les conditions d'amplification suivante : 1 minute de dénaturation à 96°C suivi de 25 cycles de 10 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C.

### V.7.3. Purification des réactions de Séquence

La réaction de séquence a ensuite été purifiée sur une microplaque filtrante 96 puits avec une résine Sephadex G® Superfine de chez Millipore.

### V.7.4. Séquençage

Le séquençage est réalisé à l'unité de séquençage, Génolim, à l'aide d'un appareil d'électrophorèse capillaire 3130XL® de chez Thermo Fischer. Les logiciels Geneious® et Snapgene® ont ensuite été utilisés pour analyser les séquences obtenues.

## VI. Résultats

### VI.1. Screening des souches pour la recherche de la présence d'intégrons de classe 1

Au total 56 souches de *Pseudomonas* (54 *P. aeruginosa*, 1 *P. putida* et 1 *P. spp*) ont été screenées pour rechercher la présence d'IR. Les résultats du screening sont présentés dans le **Tableau 3** ci-dessous, sachant qu'au cours de mon étude j'ai moi-même screené les souches LL30 à LL58. Parmi celles-ci, 6 étaient positives pour un intégron de classe 1. Au total nous avons donc 16 souches de *Pseudomonas* intI1+ soit 29%, 15 *P. aeruginosa* et 1 *P. putida* (**Tableau 3**). (Les souches LL 1 et 2 n'étant pas des *Pseudomonas*, elles ne faisaient pas partie de l'étude).

**Tableau 3: Description des souches isolées du patient LL**

Date du prélèvement	N° de souche	Screening IntI1	Germe
16/07/2008	LL 1		Bacille Gram négatif non identifié
16/07/2008	LL 2		<i>Klebsiella oxytoca</i>
29/10/2008	LL 3		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 4		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 5		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 6		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 7		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 8		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 9		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 10		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 11	IntI 1+	<i>Pseudomonas putida</i>
	LL 12		<i>Pseudomonas spp</i>
06/04/2011	LL 13		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 14		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
27/06/2011	LL 15		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
12/12/2012	LL 16		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 17		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25/09/2013	LL 18		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 19		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 20	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 21	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17/12/2014	LL 22	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25/03/2015	LL 23		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16/06/2015	LL 24	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
23/09/2015	LL 25	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 26	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 27	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16/12/2015	LL 28	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL 29	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
22/02/2016	LL30	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL31	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL32	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL33	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17/01/2018	LL34		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL35		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL36		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25/04/2018	LL37		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

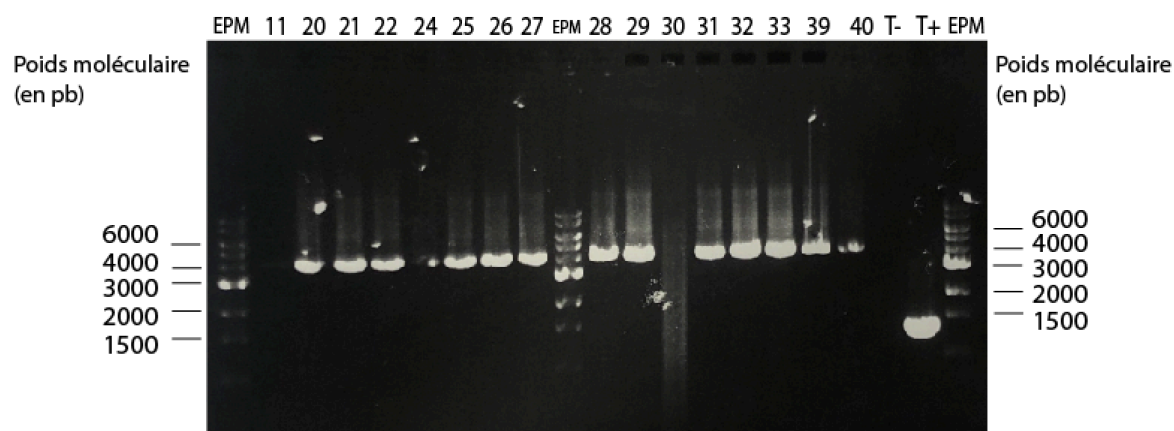


24/07/2018	LL38		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL39	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL40	IntI 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL41		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
24/10/2018	LL42		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
23/01/2019	LL43		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL44		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10/04/2019	LL45		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL46		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
18/07/2019	LL47		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL48		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
11/10/2019	LL49		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL50		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17/01/2020	LL51		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL52		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20/07/2020	LL53		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL54		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL55		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
09/10/2020	LL56		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL57		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	LL58		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

## VI.2. PCR de cassette

La souche LL21 dont le génome a été séquencé au cours de l'étude précédente nous a servi de souche de référence tout au long de ce travail. Cette souche possède un réseau de 4 cassettes de gène dont la taille est de 4029 pb.

Sur chacune des souches intI1+, une PCR pour estimer la taille du réseau de cassette a été réalisée. Les résultats de la PCR sont montrés sur la **Figure 14**. Les fragments obtenus étaient tous de taille identique, d'environ 4000pb. Toutes les souches hébergeaient donc un réseau de cassettes de même taille. A noter que les souches LL11, 24 et 30 ne montraient pas d'amplification sur la **Figure 14**, mais la répétition de l'expérience a permis de mettre en évidence la même bande d'environ 4000 pb pour ces trois échantillons.

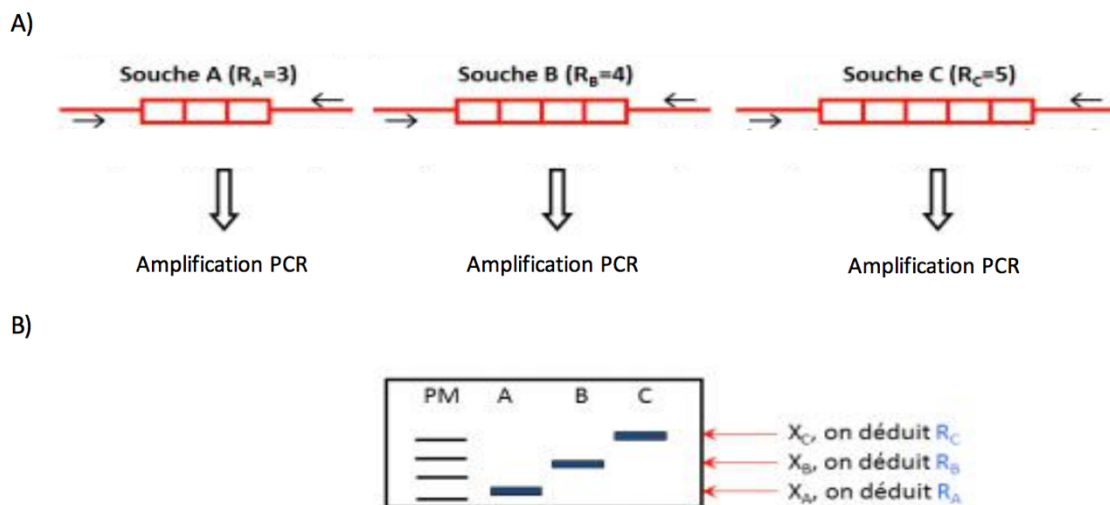


**Figure 14 : Estimation de la taille de la région variable de l'intégron des souches LL**

EPM : échelle de poids moléculaire (NEB, 1kb) ; T- : Témoin négatif (H<sub>2</sub>O) ; pb : paire de base

### VI.3. Génotypage des souches, détermination de la clonalité par MLVA

L'analyse MLVA (MultiLocus VNTR Analysis ou analyse multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem) est une technique de typage moléculaire centrée sur l'étude du polymorphisme du génome dans sa totalité. Son objectif est de comparer le génome de différentes souches de *P. aeruginosa* isolées afin de déterminer leur clonalité. Il s'agit pour chacune des souches d'amplifier par PCR avec des amorces spécifiques, des locus répétés en tandem (VNTR pour Variable Number of Tandem Repeats), de mesurer la taille des amplicons sur gel, et de les comparer. La taille de l'amplicon est proportionnelle au nombre de répétitions du locus (58). Si un seul des VNTR testé diffère entre deux souches, elles sont non clonales (**Figure 15**). En revanche, elles sont clonales si tous les VNTR sont identiques.

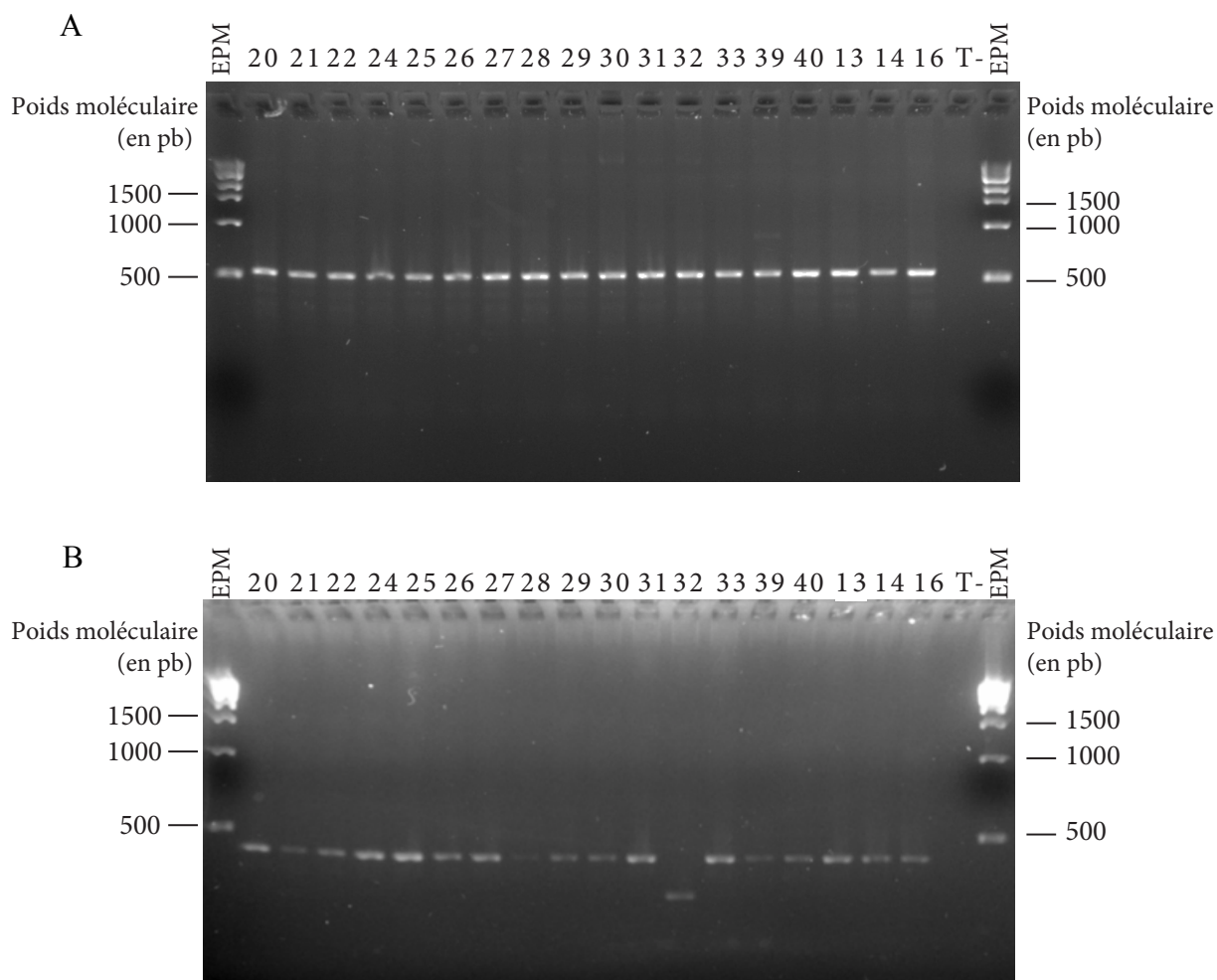


**Figure 15 : Principe du MLVA**

**A** : Amplification spécifique par PCR d'un VNTR pour trois souches bactériennes ; Avec A, B et C = nom des trois souches bactériennes ;  $R_A$ ,  $R_B$  et  $R_C$  = nombre de répétition du locus ; les flèches horizontales représentent les amorces d'amplification. **B** : Migration électrophorétique des produits PCR des échantillons A, B et C ; Avec PM = échelle de poids moléculaire ;  $X_A$ ,  $X_B$ , et  $X_C$  = produits de PCR ; Le poids moléculaire X sera proportionnel au nombre de répétition du locus R, ainsi plus la souche aura de répétition du locus, plus X aura un poids moléculaire important, moins il migrera (ex :  $X_C$ ). Des souches de *P. aeruginosa* sont clonales si elles présentent pour le 15 VNTRs testés des longueurs d'amplifications similaires.

Pour comparer des souches de *P. aeruginosa* il faut tester 15 VNTRs (59). Toutes les souches LL Intl1+ ainsi que 3 souches LL Intl-, ont été comparées. Les souches Intl- choisies sont les plus proches en date de l'apparition de l'IR dans notre étude. Elles permettent de représenter un échantillon des souches Intl-.

Pour les couples d'amorces ms77, 127, 142, 172, 211, 212, 213, 214, 215, 217, 222, 223, 207 et 209, une seule bande d'amplification de même taille a été obtenue pour toutes les souches (**Figure 16 A**). Le couple d'amorce ms216 a lui amplifié une bande de même taille pour toutes les souches sauf pour la souche LL32 qui était de taille inférieure (**Figure 16 B**).



**Figure 16 : Résultats MLVA**

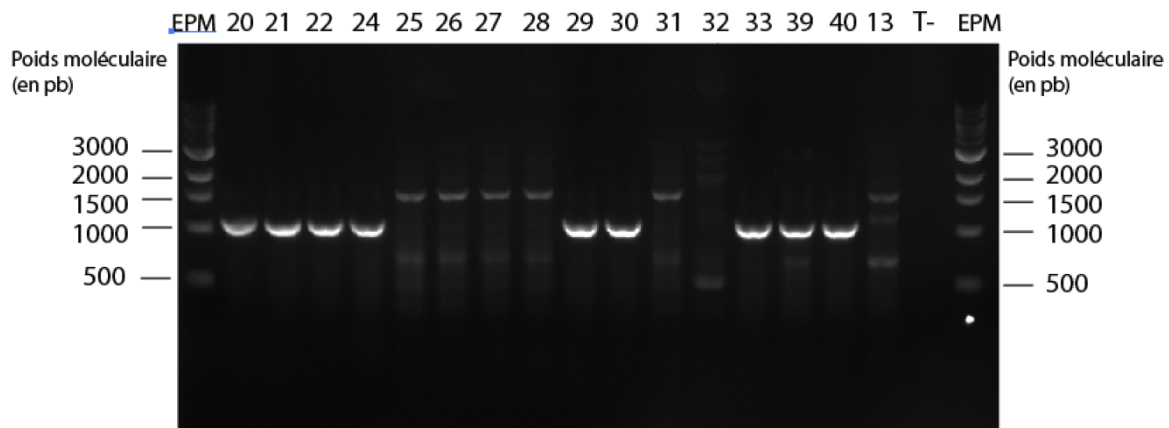
**A** : Exemple d'un MLVA identique pour toutes les souches (ici avec le couple d'amorce msv77) ; **B** : MLVA MS 216 ; avec EPM : échelle de poids moléculaire ; T- : Témoin négatif (H<sub>2</sub>O) ; pb : paire de base ; Toutes les souches LL de *P. aeruginosa* int1+ (20 à 40) et 3 souches LL int1- (13, 14 et 16) ont été analysées.

Toutes les souches de *P. aeruginosa* isolées du patient LL au long de son suivi au CRCM du CHU de Limoges, qu'elles possèdent un intégron de résistance ou non, étaient clonales, à l'exception de la souche LL32.

#### VI.4. Exploration de l'environnement génétique de l'IR des souches LL

Afin d'évaluer si l'IR de classe 1 des souches LL Int1+ était situé au même endroit sur le génome que chez la souche de référence LL21, des PCR spécifiques permettant d'amplifier des régions comprenant une partie de l'IR et son environnement en amont et en aval ont été réalisées (**Figure 13**).

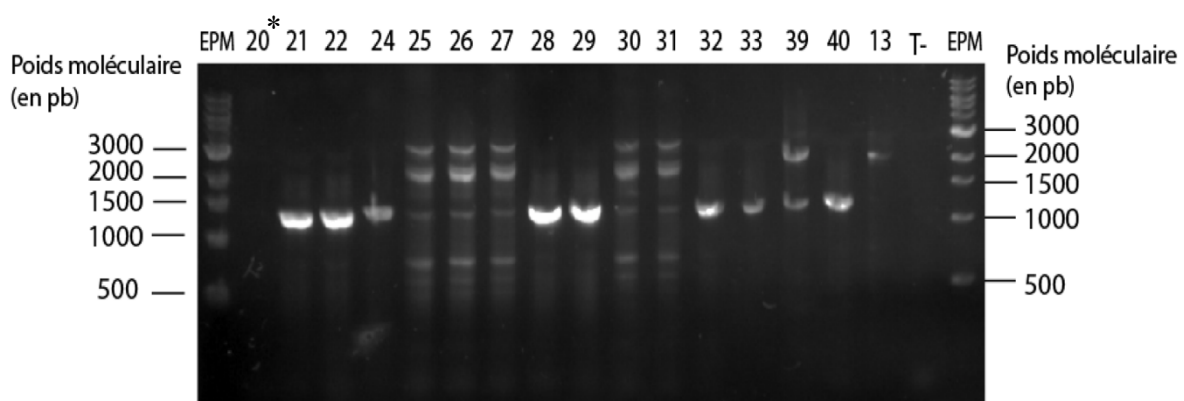
Pour le « côté 5' » de l'intégron, une bande unique de taille identique ( $\approx 1000$  pb) à la souche LL21 a été obtenue pour les souches *intl1+* LL20, 22, 24, 29, 30, 33, 39, et 40 (**Figure 17**). En revanche, deux bandes aspécifiques de taille différente à la précédente ont été amplifiées pour la souche *intl1-* contrôle LL13, et les souches *intl1+* LL25, LL26, LL27, LL28, LL31 et LL32 (**Figure 17**).



**Figure 17 : Analyse PCR de l'environnement génétique de l'IR1 des souches LL côté 5'**

Résultat de la PCR permettant d'amplifier la région amont à l'IR1 (amorces LL21-P1-L et *Intl1*-ARB2). La souche LL21 est la souche de référence ; LL13 : témoin souche *intl1-* ; T- : témoin négatif ( $H_2O$ ) ; bp : paire de base

Pour le « côté 3' » de l'intégron, seuls les échantillons LL20, 22, 24, 28, 29, 32, 33 et 40 présentaient une bande unique de taille correspondant à l'environnement de référence de LL21 ( $\approx 1000$  pb ; **Figure 18**). Deux fragments d'amplification ont été obtenus avec l'échantillon LL39, une à la taille du fragment référence LL21 et une autre de 2000 pb, spécifique à cette souche. Les échantillons LL25, 26, 27, 30 et 31 montraient le même profil que la souche LL13 *Intl-*, soit des bandes non spécifiques.



**Figure 18 : Analyse PCR de l'environnement génétique de l'IR1 des souches LL côté 3'**

Résultat de la PCR permettant d'amplifier la région avale à l'IR1 (amorces *Sul1*-ARB2 et LL21-P1-R). La souche LL21 est la souche de référence ; LL13 : témoin souche *intl1-* ; T- : témoin négatif ( $H_2O$ ) ; bp : paire de base. (\* pour LL 20, la répétition de l'expérience a permis de mettre en évidence la même bande que l'échantillon LL 21)

L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau ci-dessous :

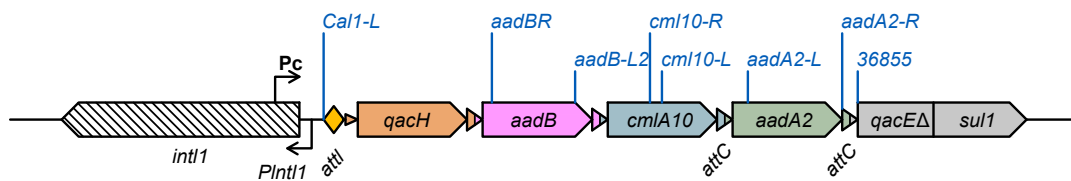
**Tableau 4 : Exploration de l'environnement de l'IR des souches LL**

# Souches	Amorce côté 5' : LL21-P1-L / int11-ARB2	Amorce côté 3' : PCR sul1-ARB2 / LL21-P1-R
LL21 (référence)	✓	✓
LL20	✓	✓
LL22	✓	✓
LL24	✓	✓
LL25	x	x
LL26	x	x
LL27	x	x
LL28	x	✓
LL29	✓	✓
LL30	✓	x
LL31	x	x
LL32	x	✓
LL33	✓	✓
LL39	✓	✓ + x
LL40	✓	✓

✓ = bande d'amplification identique à celle de l'IR1 de la référence LL21 ; x = amplification de taille différente de l'IR de référence ou absence d'amplification spécifique.

### VI.5. Détermination du réseau de cassettes de la souche LL 32

Les travaux précédents ont permis de définir le réseau de cassettes de la souche LL21 qui contient 4 cassettes comme suit : *qacH* (code pour une pompe d'efflux conférant une résistance aux ammoniums quaternaires, composants présents dans les désinfectants), *aadB* (code une aminoside-nucléotidyltransférase conférant une résistance à la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine), *cmIA* (code une pompe d'efflux conférant une résistance au chloramphénicol) et *aadA2* (code une aminoside-nucléotidyltransférase conférant une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine). La souche LL32 étant non clonale aux autres souches, mais semblant avoir un IR de même taille que celui de LL21, nous avons séquencé la région variable de LL32 afin de comparer plus précisément l'IR de LL32 à celui de LL21. Pour cela 8 amorces permettant de recouvrir les 4000 pb du réseau de cassette de l'IR1 ont été utilisées (**Figure 19**).



**Figure 19 : Localisation sur l'IR1 des amorces pour le séquençage Sanger**

*int1* = gène de l'intégrase ; PInt1 = promoteur du gène de l'intégrase ; Pc = promoteur de cassette ; *attI*, *attC* = sites de recombinaison spécifique ; *qacH*, *aadB*, *cmlA10*, *aadA2* = nom des cassettes de gène 1 et 2 ; *qacEΔ* = gène *qacEΔ* ; *sul1* = gène *sul1*.

Le séquençage Sanger de la région variable de LL 32 n'a montré que quelques mutations ponctuelles par rapport à la séquence de référence de LL21. Le réseau de cassette de LL32 était donc le même que celui de LL21, bien que ces souches ne soient pas clonales.

## VII. Discussion

---

Ce travail a permis de poursuivre la recherche et la caractérisation du ou des IRs des souches isolées chez le patient LL atteint de mucoviscidose, durant ses 12 années (2008-2020) de suivi au CRCM du CHU de Limoges.

La quasi-totalité (56 sur 58) des souches isolées étaient des bactéries du genre *Pseudomonas* (54 *P. aeruginosa*, 1 *Pseudomonas ssp* et 1 *P. putida*) dont presque un tiers (29%) contenaient un IR de classe 1 (15 *P. aeruginosa* et 1 *P. putida*) (**Tableau 3**).

La région variable de tous les IRs semblait avoir la même taille que celle de la souche LL21 de référence, estimée à 4000 pb.

L'analyse MLVA des souches de *P. aeruginosa* intl- et intl1+ isolées du patient LL nous a permis de dire que toutes ces souches étaient clonales, sauf la souche LL32. L'ensemble de ces résultats indiquaient que sur cette période de 12 ans, un clone majoritaire colonisait les poumons de notre patient de manière chronique et un autre clone (LL 32), isolé plus tardivement et non retrouvé sur d'autres prélèvements, était certainement transitoire. En tout cas, l'IR1 présent chez les souches isolées était le même. Il semblerait donc qu'une ou des souches clonales aient acquis un IR1 au sein des poumons du patient LL, et que cet IR se soit transmis de manière verticale lors de la division cellulaire pour les souches clonales.

Le séquençage Sanger de la région variable de l'IR1 de la souche LL32, bien que non clonale avec les autres souches, nous confirmait qu'elle était identique au réseau de cassette de la souche LL21. Il en était de même pour la souche de *P. putida* (LL11), séquencée par méthode Sanger dans un travail précédent (56). Le génome de la souche LL 21 avait été séquencé dans un travail précédent, et montrait que l'IR contenait les 4 cassettes suivantes : *qacH*, *aadB*, *cmIA*, *aadA2*, et qu'il se trouvait sur le chromosome entre 2 EGM, un transposon de la famille Tn3 et une séquence d'insertion IS6100 (**Figure 13**), et mesurait 4029 pb (56). L'hypothèse d'un transfert horizontal d'IR dans le microbiote de notre patient entre une souche intl1+ et LL32 d'une part puis LL11 d'autre part, semblait donc envisageable.

Même si les souches étaient clonales, il était intéressant de caractériser l'environnement de l'intégron au sein du génome afin de vérifier s'il était inséré au même endroit du génome dans chacune des souches. Cette exploration a été réalisée par simple PCR, par comparaison à l'environnement génétique de l'IR de notre souche de référence LL21, en utilisant 2 couples d'amorces spécifiques des régions 5' et 3' encadrant l'IR. Si les amplicons étaient de taille identique à ceux de LL21 alors l'environnement génétique était le même. C'était le cas pour les souches LL20, 22, 24, 29, 33 et 40, isolées entre septembre 2013 et juillet 2018.

Au contraire, si l'une ou/et l'autre des PCR n'avait pas fonctionné ou avait donné des tailles d'amplicon différentes, l'interprétation était plus difficile. Certaines souches ne présentaient qu'une seule PCR positive sur les deux : LL30 et 39 pour la région 5' et LL28 et 32 pour la région 3'. Cela pouvait signifier qu'un EGM (par exemple une séquence d'insertion ou un transposon) s'était inséré dans la région entre l'extrémité de l'IR et l'amorce (60). Une autre hypothèse était que le transposon et/ou l'IS6100 qui se trouvaient de part et d'autre de l'IR dans la souche LL21 (**Figure 13**) avaient transposé et n'étaient donc plus présents dans l'environnement de l'IR. De plus, on avait observé de façon intéressante que les souches LL28 et 32, non clonales entre elles, avait le même profil pour l'environnement génétique de l'IR.

D'autres souches présentaient les deux PCR négatives, LL25, 26, 27 et 31, ce qui pouvait indiquer que l'IR se soit intégré ailleurs dans le génome bactérien, ou qu'il ait changé de place au cours du temps.

Enfin la souche LL39 avait la particularité de présenter deux bandes du côté 3' de l'intégron, une correspondant à la taille attendue pour une position de l'IR identique à celle trouvée dans LL21, et l'autre au double de la taille attendue (~2000 pb) (**Figure 18**). La présence de cette dernière pouvait nous faire penser à une duplication de l'IR ou de la région complémentaire de l'amorce.

Cependant, pour interpréter ces résultats, il faut avoir à l'esprit que la mutation d'une seule base dans la région 3' de notre amorce peut rendre une PCR négative. La seule façon d'être certain que l'environnement génomique est différent, serait de procéder à un séquençage Sanger des différentes jonctions afin d'affiner les résultats ou alors de séquencer le génome entier.



## Conclusion

---

Ce travail avait pour but de déterminer si les IRs présents dans les souches de *P. aeruginosa* isolées chez le patient LL au cours d'une période de 12 ans pouvaient évoluer au sein d'une même souche, ou être transférés entre bactéries au sein du microbiote pulmonaire du patient.

Cette étude a montré que (i) les souches de *P. aeruginosa* isolées étaient essentiellement clonales (toutes sauf une), (ii) l'IR retrouvé chez les souches de *Pseudomonas* isolées chez le patient LL ne semblait pas avoir évolué au cours du temps en termes de composition de cassettes de gène et (iii) que l'environnement génétique de l'IR chez les différentes souches intl1+, qu'elles soient clonales ou non, avait évolué. Ces résultats suggéraient que plusieurs souches pouvaient avoir acquis le même IR à des moments différents, ou que celui-ci ait changé de place au sein du génome. Enfin, nos résultats pouvaient aussi faire penser à un transfert potentiel d'IR d'une souche vers une autre mais cela reste encore à confirmer.

Il pourrait être intéressant de séquencer le génome entier de certaines souches, notamment celles semblant avoir un environnement génétique de l'IR différent, alors qu'elles sont clonales (LL 25, 28, 30, 39), ainsi que celle qui n'est pas clonale (LL32). Cela permettrait d'une part de caractériser les environnements génétiques des IRs dans les différentes souches et d'identifier les événements de réarrangement génétique bactérien qui auraient pu se produire dans les poumons du patient. D'autre part, cela permettrait de conforter ou non l'hypothèse d'un transfert de l'intégron à LL 32 et LL 11. Il faudrait aussi séquencer une souche intl- clonale afin d'avoir un état du génome de la souche « mère », et ce à différents temps pour analyser l'évolution du génome indépendamment de l'acquisition d'un IR.

## Annexes

---

Annexe 1. Séquences d'amorces .....	51
Annexe 1.1. PCR de cassette .....	51
Annexe 1.2. Étude de l'environnement génétique des intégrons.....	51
Annexe 1.3. MLVA.....	51
Annexe 1.4. Séquençage Sanger .....	52

## Annexe 1. Séquences d'amorces

### Annexe 1.1. PCR de cassette

Amorces	Séquences d'amorces
Cal 1-L	CGTGGGTCGATGTTTGATGTTA
Cal 1-R	GAAGGAGTCCTCGGTGAGA

### Annexe 1.2. Étude de l'environnement génétique des intégrons

Amorces	Séquences d'amorces
P1-L	CAGTTTTCTGATGAAGCGCGG
P1-R	GGTCGCGATAGCTGATCGG
IntI1-ARB2	CCATTCCGACGTCTCTACGACG
Sul1-ARB2	AGTCGCGACGCCAGAGACCG

### Annexe 1.3. MLVA

Amorces	Séquences d'amorces
ms77L	GCGTCATGGTCTGCATGTC
ms77R	TATACCTCTTCGCCAGTC
ms127L	CTCGGAGTCTCTGCCAACTC
ms127R	GGCAGGACAGGATCTCGAC
ms142L	AGCAGTGCCAGTTGATGTTG
ms142R	GTGGGGCGAAGGAGTGAG
ms172L	GGATTCTCTCGCACGAGGT
ms172R	TACGTGACCTGACGTTGGTG
ms211L	ACAAGCGCCAGCCGAACCTGT
ms211R	CTTCGAACAGGTGCTGACCGC
ms212L	TGCTGGTCGACTACTTCGGCAA
ms212R	ACTACGAGAACGACCCGGTGT
ms213L	CTGGCAAGTGTGGTGGATC
ms213R	TGGCGTACTCCGAGCTGATG
ms214L	AAACGCTGTTCCGAACCTCTA
ms214R	CCATCATCCTCCTACTGGGTT
ms215L	GACGAAACCCGTCGCGAACA
ms215R	CTGTACAACGCCGAGCCGTA
ms216L	ACTACTACGTGGAACACGCCA
ms216R	GATCGAAGACAAGAACCTCG
ms217L	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT
ms217R	GAACAGCGTCTTTTCCTCGC
ms222L	AGAGGTGCTTAACGACGGAT
ms222R	TGCAGTTCTGCGAGGAAGGCG
ms223L	TTGGCAATATGCCGGTTCGC
ms223R	TGAGCTGATCGCCTACTGG

ms207L	ACGGCGAACAGCACCAGCA
ms207R	CTCTTGAGCCTCGGTCACT
ms209L	CAGCCAGGAACTGCGGAGT
ms209R	CTTCTCGCAACTGAGCTGGT

#### Annexe 1.4. Séquençage Sanger

Amorces	Séquences d'amorces
Cal1L	CGTGGGTCGATGTTTGATGTTA
aadBL2	CTGGGAGGCGATCATCTGG
Cml10R	TTGCGTTTCTAGGTTTGGGC
Cml10L	GCGTAACACAACGTACAACC
aadA2L	GGAGCCGTACAAATGCACG
36855	AAGCAGACTTGACCTGATAGTTTG
aadA2R	TATTCGCTTTGTGAAAGGCG
aadBR	TGGCTGCGGCAGATGAGC

## Références bibliographiques

---

1. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am J Dis Child*. 1 août 1938;56(2):344.
2. Di Sant'agnese P, Darling RC, Perara GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *AMA Am J Dis Child*. nov 1953;86(5):618-9; discussion, 619.
3. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1073-80.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1066-73.
5. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1059-65.
6. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: Shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. *Front Pharmacol*. 2016;7:275.
7. Centre de référence Mucoviscidose. Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2020. 2020.
8. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*. janv 1999;79(1):S23-45.
9. Sohma Y, Hwang TC. Cystic fibrosis and the CFTR anion channel. In: *Handbook of Ion Channels*. CRC Press; 2015.
10. Hwang TC, Yeh JT, Zhang J, Yu YC, Yeh HI, Destefano S. Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction. *J Gen Physiol*. 2 avr 2018;150(4):539-70.
11. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, et al. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 oct 1991;88(20):9262-6.
12. Dechecchi MC, Tamanini A, Cabrini G. Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside. *Ann Transl Med*. sept 2018;6(17):6-6.
13. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. 1 mars 2013;22(127):58-65.
14. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med*. avr 2013;1(2):158-63.
15. Cutting GR. Causes des variations phénotypiques de la mucoviscidose. *Ann Nestlé Ed Fr*. 2006;64(3):111-8.
16. Corvol H, Flamant C, Vallet C, Clement A, Brouard J. Les gènes modificateurs dans la mucoviscidose. *Arch Pédiatrie*. 1 janv 2006;13(1):57-63.

17. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J.* 1 janv 2004;23(1):146-58.
18. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. Pathogenic bacteria in cystic fibrosis. :5.
19. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* . *Microbiol Rev.* sept 1996;60(3):539-74.
20. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *The Lancet.* juin 2021;397(10290):2195-211.
21. Farriaux JP, Vidailhet M, Briard ML, Belot V, Dhondt JL. Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge. *J Inherit Metab Dis.* déc 2003;26(8):729-44.
22. Centre de référence Mucoviscidose. Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) de la mucoviscidose. 2017.
23. Rota M, Nguyen-Khoa T, Marchand M, Feldmann D, Dumont J, Khalfon D, et al. Recommandations pour l'exécution et l'interprétation du test de la sueur. *Ann Biol Clin (Paris).* 14 mars 2008;66(2):221-7.
24. Haute Autorité de santé. Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : état des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement. 2009.
25. Liou T. Mucoviscidose [Internet]. Orphanet. 2020 [cité 31 août 2022]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=FR&Expert=586](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=586)
26. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular Medical Microbiology.* Elsevier; 2015. p. 753-67.
27. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's not easy being green: a narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Basel Switz.* 4 janv 2021;10(1):42.
28. Denis F, Cattoir V, Martin C, Ploy MC, Poyart C. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles.* Elsevier Health Sciences; 2016. 599 p.
29. Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris).* juill 2011;69(4):393-403.
30. Bricha S, Ounine K, Oulkheir S, Haloui NEE, Attarassi B. Virulence factors and epidemiology related to *Pseudomonas aeruginosa*. :8.
31. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun.* janv 1998;66(1):43-51.
32. Sato H, Okinaga K, Saito H. Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. *Microbiol Immunol.* 1988;32(2):131-9.
33. Cryz SJ, Pitt TL, Fürer E, Germanier R. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* mai 1984;44(2):508-13.
34. Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- $\gamma$ -mediated macrophage killing. *J Immunol.* 1 déc 2005;175(11):7512-8.

35. Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*. 151(5):1313-23.
36. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine Mal Infect*. 1 févr 2006;36(2):78-91.
37. Voulhoux R, Taupiac MP, Czjzek M, Beaumelle B, Filloux A. Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 15 juill 2000;182(14):4051-8.
38. Barbier F, Wolff M. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end ? *Med Sci*. 1 nov 2010;26(11):960-8.
39. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*. déc 1989;3(12):1669-83.
40. Cho SM, Hong SG, Lee Y, Song W, Yong D, Jeong SH, et al. First identification of IMP-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase in *Delftia tsuruhatensis* strain CRS1243 isolated from a clinical specimen. *Ann Lab Med*. 1 juill 2021;41(4):436-8.
41. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. juill 2009;33(4):757-84.
42. Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. Integrall: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinforma Oxf Engl*. 15 avr 2009;25(8):1096-8.
43. Leverstein-van Hall MA, M. Blok HE, T. Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis*. 2003;187(2):251-9.
44. Meyer S, Barraud O. Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques en clinique et dans l'environnement [Internet]. Société Française de Microbiologie. 2020 [cité 20 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.sfm-microbiologie.org/2020/07/08/place-des-integrons-dans-la-dissemination-de-la-resistance-aux-antibiotiques-en-clinique-et-dans-lenvironnement/>
45. Barraud O, François B, Chainier D, Vignaud J, Ploy MC. Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicemia. *Int J Antimicrob Agents*. 1 oct 2014;44(4):351-3.
46. Couvé-Deacon E. Épidémiologie et régulation des intégrons de classe 1 chez *Acinetobacter baumannii*. 2017.
47. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*. 1995;15(4):593-600.
48. Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiol Read Engl*. nov 2000;146 ( Pt 11):2855-64.
49. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P, et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002778.

50. Guérin E, Cambray G, Da Re S, Mazel D, Ploy MC. The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons. *Med Sci MS*. janv 2010;26(1):28-30.
51. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev*. nov 2014;38(6):1126-45.
52. Jové T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy MC. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet*. janv 2010;6(1):e1000793.
53. Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res*. 11 juin 1994;22(11):2071-8.
54. Collis CM, Recchia GD, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase Int1. *J Bacteriol*. avr 2001;183(8):2535-42.
55. Barraud O, Ploy MC. Diversity of class 1 integron gene cassette rearrangements selected under Antibiotic pressure. *J Bacteriol*. juill 2015;197(13):2171-8.
56. Mastella Botelho C. Characterization of integrons in sputum samples from cystic fibrosis patients at the university hospital of Limoges, France. 2019;
57. Barraud O, Baclet MC, Denis F, Ploy MC. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother*. août 2010;65(8):1642-5.
58. Sobral D, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Vu-Thien H, Hormigos K, Lebeau B, et al. A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. sept 2012;31(9):2247-56.
59. Vu-Thien H, Corbineau G, Hormigos K, Fauroux B, Corvol H, Clément A, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. oct 2007;45(10):3175-83.
60. Dawes FE, Kuzevski A, Bettelheim KA, Hornitzky MA, Djordjevic SP, Walker MJ. Distribution of class 1 integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *PLoS One*. 15 sept 2010;5(9):e12754.



## 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.

## Étude au cours du temps des intégrons de résistances chez un patient atteint de mucoviscidose

---

La mucoviscidose est la maladie héréditaire la plus répandue dans la population caucasienne. Les mutations du gène *CFTR* aboutissent au niveau pulmonaire à la formation d'un mucus plus épais, propice à la colonisation bactérienne chronique, malgré les différents traitements antibiotiques. Cette colonisation chronique permet la formation d'un biofilm par certain germe, milieu propice à l'échange de matériel génétique entre bactéries souvent multirésistantes. Chez les bacilles gram négatif, notamment le *Pseudomonas aeruginosa*, la multirésistance est souvent associée à la présence d'intégrons de résistance (IR) (élément génétique pouvant capture et exprimer des gènes intégrés dans des cassettes, codant pour des gènes de résistance aux antibiotiques). Ces IRs peuvent être porté par des éléments génétiques mobiles (EGM) et pourraient être transmis horizontalement entre espèces. Cette étude à chercher à caractériser les IRs de classe 1 au sein des souches de *P. aeruginosa* isolées du microbiote d'un patient atteint de mucoviscidose et suivi pendant 12 ans au CRCM de Limoges, dans le but d'évaluer leur évolution. Les différentes analyse par PCR et séquençage Sanger nous permettent de suspecter des mouvements d'IR au sein du génome d'un même clone de *P. aeruginosa*, entre deux souches de *P. aeruginosa*, et entre une souche de *P. aeruginosa* et de *P. putida*.

Mots-clés : [Intégrons, Mucoviscidose, *Pseudomonas aeruginosa*. Résistance antibiotique]

### Study over time of resistance integrons in a patient with cystic fibrosis

---

Cystic fibrosis is the most common inherited disease in the Caucasian population. Mutations in the *CFTR* gene lead to the formation of thick mucus in the lungs, which is conducive to chronic bacterial colonization, despite various antibiotic treatments. This chronic colonization allows the formation, by some germs, of a biofilm, an environment favorable to the exchange of genetic material between often multi-resistant bacteria. In Gram-negative bacilli, particularly *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug resistance is often associated with the presence of resistance integrons (RIs) (genetic elements that carry and express genes encoding antibiotic resistance integrated into cassettes). This study aimed to characterize the class 1 IRs found in *P. aeruginosa* strains isolated from the microbiota of a cystic fibrosis patient followed for 12 years at the CRCM in Limoges, with the aim of evaluating the RI evolution over time. The PCR and Sanger sequencing analyses indicate that the IR does not seem to have evolved over time in terms of resistance gene cassettes. However, they do suggest movement of the RI within the genome of the same *P. aeruginosa* clone, but also between strains in the patient's lung microbiota.

Keywords : [*Integrons, Cystic fibrosis, Pseudomonas aeruginosa. antibiotic resistance*]

