



**HAL**  
open science

## Intégrons de classe 3 : aspects mécanistiques et épidémiologiques

Pierrette Landrie Simo Tchuinte

► **To cite this version:**

Pierrette Landrie Simo Tchuinte. Intégrons de classe 3 : aspects mécanistiques et épidémiologiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges; Université des Sciences et Techniques de Masuku (Gabon), 2016. Français. NNT : 2016LIMO0009 . tel-01314131

**HAL Id: tel-01314131**

**<https://theses.hal.science/tel-01314131v1>**

Submitted on 10 May 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Ecole Doctorale  
Régionale**



**Université de  
Limoges**

## **UNIVERSITE DE LIMOGES**

Ecole doctorale ; thématique : **Biologie-santé**

## **UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE MASUKU**

Ecole doctorale Régionale; thématique : **Infectiologie tropicale**

Thèse en co-tutelle  
pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR**

Présentée et soutenue par

**SIMO TCHUINTE Pierrette Landrie**

le 24/03/2016

**Intégrons de classe 3 : aspects mécanistiques et épidémiologiques**

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

Présentée devant le jury composé de :

Professeur **Guillaume ARLET**

Professeur **Vincent CATTOIR**

Professeur **Marie-Cécile PLOY**

Docteur **Nathalie Van DER MEE-MARQUET**

Docteur **Antoinette NGANDJIO**

Docteur **Olivier BARRAUD**

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Invité

*A la mémoire de ma Feu chère et tendre Maman Madeleine*

*A mon père SIMO MEUPHU Philippe*

*A mes frères et sœurs*

# Remerciements

Je remercie tout d'abord l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) particulièrement le Professeur **Alain ONDOUA**. Grâce à vous, j'ai bénéficié d'une bourse d'étude du master II jusqu'à la fin de mes 3 années de thèse. Je remercie aussi l'association ALDREM pour le financement octroyé. Ce travail de thèse a été effectué à la fois au sein de l'UMR Inserm 1092 à L'Université de Limoges, France et dans le Service d'Hygiène et d'Environnement (SHE) du Centre Pasteur du Cameroun (CPC).

J'exprime ma grande reconnaissance aux Professeurs **Guillaume ARLET** et **Vincent CATTOIR** qui ont aimablement accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie également le Docteur **Nathalie Van DER MEE-MARQUET** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de thèse le Professeur **Marie-Cécile PLOY**. Je n'aurais pas assez de termes pour témoigner l'immense reconnaissance que je porte à votre égard. Vous avez accepté de m'encadrer et m'avez fait confiance. Grâce à vous, j'ai fait mes premiers pas dans le monde scientifique. Je garderai toujours en moi cette passion que vous avez pour la recherche. Merci encore pour tout.

Je remercie ensuite mon co-directeur de thèse le Docteur **Antoinette NGANDJIO** qui a accepté de m'encadrer en master II et en thèse. Vous m'avez fait confiance, conseillée et encouragée. Merci pour les précieux conseils et le reconfort.

Mes prochains remerciements s'adressent ensuite à mon co-directeur Docteur **Olivier BARRAUD**. Vous avez su m'apporter l'encadrement technique nécessaire et les mots justes d'encouragements. Vous avez cru en moi et m'avez suivi durant mes travaux de thèse. Je garde en moi cette rigueur scientifique qui vous caractérise et tâcherai de la mettre en pratique dans ma carrière de jeune scientifique.

J'exprime toute ma gratitude au Docteur. **Benoit MARIN**. Vous avez recommandé ma candidature auprès du Professeur Marie-Cécile PLOY. Depuis le Gabon, vous avez cru en mon potentiel et avez fort contribué à l'expression de ce dernier. Merci pour vos différents mails d'encouragement.

Je remercie le Directeur du CPC le Docteur **Guy VERNET** pour l'admission dans sa prestigieuse institution et les moyens logistiques mis à ma disposition.

Merci également au Docteur **Marie Christine FONKOUA** ; Chef de service du laboratoire de Bactériologie du CPC pour l'accueil reçu dans son laboratoire. Merci aussi à tout le personnel des laboratoires de bactériologie et du SHE en particulier au Docteur. **Ariane NZOUANKEU**, au future Docteur. **Vanessa NKAMGA**, à **Yannick, Jean Romain, Narcisse, Olivier, Prudence et Jöelle**, pour les services rendus et la bonne humeur.

Je remercie profondément toute l'équipe de l'UMR Inserm 1092. Je pense au Professeur **Sophie Alain**, aux Docteurs **Sandra DR ; Sébastien H, Sébastien C, Emilie S, Emilie G, Thomas J, Elena B, Valentin T ; Déborah A**. Je n'oublie pas **Rémi M, Celine R, Dorian K** et **Elodie C, Melissa G** ; aux stagiaires **Florence, Chloé, Camille, Jean-Marc** et **Pamela**. Merci au personnel du laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène du CHU de Limoges, je pense à **Nadia** et **Delphine**. J'adresse mes sincères remerciements à Charlotte et Isabelle pour votre aide dans la partie administrative notamment pour tous les documents de fin de thèse pour que tout aille au plus vite.

Je remercie vivement **Margaux GASCHET** pour son aide et sa présence infaillible durant mes périodes de stress. Merci à **Yohann LACOTTE** et à **Benjamin CRESPIY** pour le soutien et la bonne humeur contagieuse que vous avez sus m'apporter

Je remercie particulièrement **Murielle BALTAZAR** pour ses conseils et ses encouragements. Tu as trouvé les mots justes quand il le fallait et me soutenir quand le moral n'était pas au beau fixe ; Merci encore ma "Mumu" et très bonne fin de thèse.

A toi ma chère Docteur **Sophie RAHERISON**, merci pour nos longs échanges dans votre bureau, votre soutien, votre présence et surtout pour votre sourire qui reflète votre simplicité.

A toi **Gaëtan LIGAT** ; je te remercie pour ta présence, ta disponibilité, tes encouragements et surtout pour la promesse tenue.

Je remercie tous les encadreurs de l'Ecole Doctorale Régionale (EDR) du Gabon, en particulier au Directeur Professeur **Jacques LEBIBI**, et au Professeur **Jean Bernard LEKANA-DOUKI** pour la qualité de la formation reçue. Un Merci aussi à Madame **MOUSSAVOU** et à Adeline **RIGAUD** pour l'accompagnement dans les procédures administratives durant ces années académiques.

Un merci au personnel de l'AUF particulièrement à Mesdames **Estelle PEZZANA**, **Sylvie MOUANGUE-EKIDI** et **Catinca BIRNA** pour les efforts fournis d'abord pour le bon déroulement de ma formation de master II et ensuite pour la thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements : A la grande Famille **SIMO** ; mon Papa chéri Monsieur **SIMO MEUPHU Philippe** qui m'a toujours encouragée dans mes études. A mes frères et sœurs pour leur présence et soutien infaillible. A la famille **DROISSART** pour vos encouragements et votre hospitalité. A la grande Famille **NGAYAP** en particulier à maman Marie, Tata Clothilde, Josiane, Yann, Toby, Cyrille et à mon feu Oncle **Papa Martial FEHEM** parti très tôt.

Mes vifs remerciements vont à l'endroit de ma grande **Famille Chrétienne** de l'Eglise Protestante de Limoges pour vos prières et votre soutien moral ; j'ai retrouvé en vous l'Amour d'une famille. Un merci particulier à **Luc, Audrey, Annick, Ansmas, Laure, Laurent, Ferdinand, Ray, Carole, Christine** et enfin à ma chère et tendre **Annie**. Que le Seigneur continue à veiller sur nous et qu'il maintienne cette flamme d'Amour Fraternel qui règne déjà.

Merci à mes amis **Michelle, Irène, Gérald, Boris, Linda, Nicaise, Dorothée, Stéphanie** et surtout à **Estelle**. J'ai bénéficié de votre soutien et de vos prières. A toi mon meilleur ami **Samuel** merci pour tes appels, tes encouragements, tes conseils et ta présence.

Je remercie mes camarades de promotions de l'Université de Yaoundé I et de l'EDR du Gabon. Je vous souhaite d'achever vos projets académiques respectifs.

Tous ceux qui, de près ou de loin m'ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail et dont les noms n'ont pas été mentionnés.

Remerciements	8
Résumé	9
Abstract	10
Liste des figures	11
Liste des tableaux	12
Glossaire	14
Préambule	15
<b>Introduction</b>	<b>17</b>
<b><u>CHAPITRE I : Généralités sur les intégrons</u></b>	<b>17</b>
<b>I.- Définition et structure des intégrons</b>	<b>17</b>
<b>I.1- La plateforme fonctionnelle</b>	<b>17</b>
I.1.1- Gène de l'intégrase : <i>intI</i>	18
I.1.2- Promoteur des cassettes Pc	19
I.1.3- Site de recombinaison <i>attI</i>	20
<b>I.2- La région variable : les cassettes</b>	<b>21</b>
I.2.1- La nature des cassettes	21
I.2.2- Le site de recombinaison <i>attC</i>	23
I.2.3- Le mouvement des cassettes	26
<b>I.3- Régulation de l'expression du gène de l'intégrase et celui des cassettes</b>	<b>26</b>
I.3.1- Régulation du gène de l'intégrase <i>intI</i>	30
I.3.1- Régulation du gène des cassettes	32
<b>I.4- Origine des intégrons</b>	<b>33</b>
<b>I.5- Epidémiologie des intégrons</b>	<b>33</b>
I.5.1- Les intégrons de résistance (IR)	33
I.5.1.1- Les IR1	34
I.5.1.2- Les IR2	36
I.5.1.3 - Les IR3	36
I.5.1.4 - Les IR4 et IR5	36
I.5.2- Les bactéries hôtes des IR	36
I.5.2.1- Bactéries à Gram négatif (BGN)	37
I.5.2.2- Bactérie à Gram positif (BGP)	39
I.5.3- Les Superintégrons (SI)	

<b><u>CHAPITRE II : Les intégrons de classe 3</u></b>	40
<b>II.1- Epidémiologique</b>	40
II.1.1- Dans le contexte clinique	40
II.1.2- Dans le contexte environnemental	43
II.1.3- Chez l'animal	45
<b>II.2- Structure, expression et mécanistique des intégrons de classe 3</b>	47
II.2.1- L'intégrase <i>IntI3</i>	47
II.2.2 - Site de recombinaison <i>attI3</i>	50
II.2.3 - Promoteur des cassettes Pc	51
II.2.4- Mécanisme de recombinaison chez les intégrons de classe 3	52
<b>Résultats</b>	55
<b>Présentation du travail de thèse</b>	56
<b><u>Etude épidémiologique des IR3</u></b>	58
<u>Partie 1</u> : Caractérisation des intégrons de classe 3 isolés des bactéries environnementales en France et au Luxembourg	59
<u>Partie 2</u> : Etude épidémiologique des intégrons de classe 3 au Cameroun : Cas des villes de Douala et Yaoundé	78
<b><u>Etude de l'expression des cassettes et de l'intégrase des IR3</u></b>	95
<u>Partie 3</u> : Caractérisation du promoteur du gène <i>intI3</i>	96
<u>Partie 4</u> : Evaluation de la force des variants des promoteurs Pc et <i>PintI3(1)</i>	109
<b>Discussion</b>	120
<b>Conclusions et perspectives</b>	134
<b>Références bibliographiques</b>	136



# Résumé

Les intégrons sont des supports génétiques bactériens de capture, d'expression et de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques sous forme de cassettes. Ils sont majoritairement décrits chez les bactéries à Gram négatif chez qui ils confèrent généralement un phénotype de multirésistance. Les intégrons de résistance (IR) jouent un rôle majeur dans l'acquisition de la résistance dans le monde bactérien. Il existe 3 principales classes d'IR ; les IR de classe 1, les IR de classe 2 et les IR de classe 3 (IR3). Contrairement aux 2 premières classes, les IR3 représentent la classe d'intégrons de résistance la moins étudiée. Très peu de travaux s'intéressent à leur étude et on dénombre actuellement moins de 10 IR3 entièrement caractérisés. Les objectifs de ce travail de thèse étaient (i) d'effectuer une étude épidémiologique des IR3 en France et au Cameroun et (ii) d'étudier les modalités d'expression de l'intégrase et des cassettes de ces intégrons. Nos travaux ont permis d'isoler puis de décrire 3 nouveaux IR3 présents au sein de bactéries environnementales appartenant aux genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Citrobacter*. Les cassettes de ces IR3 codent des résistances aux bêtalactamines, aminosides et ammoniums quaternaires. De plus, nous avons caractérisé des IR3 dans 3 souches de *Delftia* spp. (2 *D. acidovorans* et 1 *D. tsuruhatensis*) isolées en Afrique ; les cassettes de ces intégrons ne codent pas de résistance aux antibiotiques. L'axe plus fondamental de ce travail de thèse a permis de montrer que le *PintI3*(1) est le promoteur impliqué dans l'expression du gène *intI3*. De plus, nous avons montré que les variants du promoteur Pc, ainsi que les variants du promoteur *PintI3*(1) sont fonctionnels et de force différente. Il ressort de nos travaux que l'environnement constituerait un réservoir d'intégrons de classe 3 et que ces supports génétiques pourraient jouer un rôle important dans la dissémination de la résistance au sein de cet écosystème.

# Abstract

Integrans are bacterial genetic elements able to capture and express genes embedded within gene cassettes. They are widely described among Gram-negative bacteria and generally confer a multidrug resistance phenotype. Resistance integrans (RI) play an important role in the acquisition of antibiotic resistance. There are 3 main classes of RI. Class 3 RI has been poorly studied class with less than ten fully IR3 characterized. Objectives of this thesis were (i) to conduct an epidemiological study of class 3 RI in France and Cameroon and (ii) to better understand the modes of expression of the integrase and cassettes of IR3. We described 3 new class 3 RI isolated from environmental bacteria belonging to genus *Aeromonas*, *Acinetobacter* and *Citrobacter*. Gene cassettes encoded resistance to betalactams, aminoglycosides and quaternary ammonium compounds. We also described IR3 from three *Delftia* strains (2 *D.acidovorans* and 1 *D.tsuruhatensis*) in Africa containing cassettes that do not encode antibiotic resistance. The fundamental part of the work showed that the *PintI3*(1) promoter is involved in the expression of the *intI3* gene. Furthermore, we demonstrated that variants of the Pc promoter and variants of the *PintI3*(1) promoter are functional with different strengths. These results showed that the environment may constitute a reservoir of class 3 integrans and that these genetic elements could play an important role in the spread of the resistance in this ecosystem.

# Liste des figures

**Figure 1 :** Structure de la plateforme fonctionnelle d'un intégron.

**Figure 2 :** Structure du site *attI1* : exemple de la jonction entre *attI1/qacE*.

**Figure 3 :** Structure d'un site *attC* : cas de la jonction entre les cassettes *aadB/qacE*.

**Figure 4 :** Structure en (A) du site *attC<sub>aadA7</sub>* de la cassette *aadA7* (double brin) et

en (B) de la structure secondaire de *attC<sub>aadA7</sub>* (simple brin).

**Figure 5 :** Mécanisme d'intégration et d'excision de cassettes.

**Figure 6 :** Régulation du gène *intI* par la protéine LexA.

**Figure 7 :** Structure d'un intégron de classe 3.

**Figure 8 :** Alignement des séquences protéiques des intégrases IntI1, IntI2 et IntI3.

**Figure 9 :** Alignements des sites *attI1*, *attI2* et *attI3*.

**Figure 10 :** Alignement des séquences promotrices montrant les 2 promoteurs

putatifs *PintI3(1)* et *PintI3(2)* de l'intégrase *intI3*.

**Figure 11 :** Principe de la 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5'RACE).

**Figure 12 :** Disposition des amorces GSP1, GSP2 et GSP3 utilisées.

**Figure 13 :** Caractérisation du promoteur *PintI3* du gène de l'intégrase des IR3.

**Figure 14 :** Disposition des amorces utilisées au cours de ce travail

**Figure 15 :** Exemple de fusion transcriptionnelle réalisées au cours de ce travail.

**Figure 16 :** Constructions transcriptionnelles des variants des promoteurs Pc (A)

et *PintI3(1)* (B).

**Figure 17 :** Activités  $\beta$ -galactosidases des variants des promoteurs Pc (A) et *PintI(3)* (B).

# Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Principaux gènes de référence et enzymes codées.

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

**Tableau 3 :** Structures des différents intégrons de classe 3 décrits (au 23 Janvier 2016).

**Tableau 4 :** Séquences des promoteurs *PintI3*.

**Tableau 5 :** Pourcentage d'identité (en rouge) et de similarité (en noir) entre

les séquences protéiques des intégrases IntI1, IntI2 et IntI3

**Tableau 6 :** Séquences des variants du promoteur des cassettes Pc des intégrons de classe 3.

**Tableau 7 :** Excision de cassettes médiée par IntI1 et IntI3.

**Tableau 8 :** Séquences des amorces utilisées au cours de ce travail.

**Tableau 9 :** Souches bactériennes utilisées au cours de ce travail.

**Tableau 10 :** Oligonucléotides utilisées lors de ce travail.

**Tableau 11 :** Plasmides utilisés au cours de ce travail.

**Tableau 12 :** Tableau des intensités des forces des promoteurs Pc et *PintI3*(1)

# Glossaire

<b>5'CS</b>	Région 5' conservée
<b>5'RACE</b>	5'Rapid Amplification of cDNA Ends
<b>A</b>	Adénine
<b>aa</b>	Acide aminé
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BGN</b>	Bactéries à Gram Négatif
<b>BGP</b>	Bactéries à Gram Positif
<b>BLSE</b>	<u>B</u> é <u>t</u> a <u>L</u> actamase à <u>S</u> pectre <u>E</u> tendu
<b>DEPC</b>	DiEthypPyroCarbonate
<b>G</b>	Guanine
<b>GC</b>	Gene cassettes (cassette de gène)
<b>IR</b>	Intégrons de Résistance
<b>IR1</b>	IR de classe 1
<b>IR2</b>	IR de classe 2
<b>IR3</b>	IR de classe 3
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>mg /L</b>	Milligrammes par litre
<b>ng/μL</b>	Nanogrammes par microlitre
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Pc</b>	Promoteur de cassettes
<b>Pint</b>	Pomoteur de l'intégrase
<b>qPCR</b>	Quantitative PCR (PCR quantitative)

<b>R</b>	Purine
<b>T</b>	Thymine
<b>µg</b>	Microgramme
<b>µg/mL</b>	Microgramme par millilitre
<b>µL</b>	Microlitres
<b>Y</b>	Pyrimidine

# Préambule

La découverte des antibiotiques a permis de lutter contre de nombreuses infections bactériennes telles que la pneumonie et la méningite. Le taux de mortalité de ces infections bactériennes a considérablement baissé du fait de la diversité des options thérapeutiques et de l'activité plus efficace de ces molécules. Toutefois, malgré les efforts déployés pour la découverte de nouvelles molécules, la résistance des bactéries aux antibiotiques constitue de nos jours un véritable challenge médical. L'évolution de cette résistance chez les bactéries cliniques et environnementales résulte notamment des interactions antibiotiques-bactéries. Dans le contexte clinique, ces interactions sont favorisées par une utilisation abusive des médicaments liée soit à une prescription médicale inappropriée de la part du clinicien, soit à la pratique de l'automédication de la part du patient. Cette dernière pratique est très répandue dans les pays en voie de développement du fait de la vente anarchique des médicaments dans la rue et des conditions socio-économiques faibles. Dans le contexte environnemental, la résistance est favorisée par la pression de sélection exercée par les antibiotiques (partiellement métabolisés) présents généralement dans les effluents (hospitaliers et urbains). La présence des antibiotiques dans l'environnement constitue un problème écologique majeur. La lutte contre ce problème crucial passe par une sensibilisation des populations sur les risques liés à la mauvaise utilisation de ces molécules d'une part et à la compréhension des mécanismes impliqués dans cette résistance.

La dissémination de la résistance passe principalement par le transfert horizontal des supports génétiques de la résistance. Les intégrons de résistance (IR) sont connus comme étant des supports génétiques capables de conférer des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques. Trois classes d'IR ont été définies et les 2 premières ont été très bien étudiées (IR de classe 1 et 2). L'objectif de ce travail était de mieux comprendre l'épidémiologie et la fonctionnalité de la troisième classe d'IR ou intégrons de classe 3.

# Introduction

L'émergence de la résistance chez les bactéries est un problème crucial de santé publique dans le monde entier (OMS, 2014). Au fil des années, les bactéries ont su développer des mécanismes afin de s'adapter aux changements environnementaux liés à la présence des antibiotiques (Escudero *et al* ; 2015). Chez ces microorganismes, l'acquisition de la résistance passe, soit par des mutations génétiques, soit par le transfert horizontal de supports génétiques de résistance tels que les plasmides ou les transposons. Ces supports peuvent héberger eux-mêmes des éléments génétiques appelés intégrons. (Jury *et al* ; 2010). Décrits à la fin des années 80, les intégrons constituent des systèmes de capture, d'expression et de dissémination de gènes de résistance sous forme de cassettes. Ces éléments génétiques sont majoritairement décrits chez les bacilles à Gram négatif (BGN) et chez quelques bactéries à Gram positif (Cambray *et al* ; 2010, Mostafa *et al* ; 2015). Actuellement, trois principales classes d'IR (classe 1 à 3) sont définies comme les plus importantes d'un point de vue médical du fait de leur rôle dans la résistance aux antibiotiques (Escudero *et al* ; 2015). Ils ont été décrits en microbiologie humaine (Namvar *et al* ; 2015, Pan *et al* ; 2006, Mohammadi-Barzelighi *et al* ; 2012, Guney *et al* ; 2015), animale (Sung et Oh ; 2014, Essen Zandhergen *et al* ; 2007, Barlow et Gobius, 2006) et dans l'environnement (Liping *et al* ; 2012, Paiva *et al* ; 2015, Stalder *et al* ; 2013, 2014). Les IR de classe 3 demeurent la classe d'intégrons la moins prévalente. Leur présence a été signalée en Europe, en Asie et en Amérique, au sein de BGN (Arakawa *et al*; 1995, Correia *et al* ; 2003, Shibata *et al*; 2003, Poirel *et al*; 2010, Moura *et al* ; 2010, Barraud *et al* ; 2013, Cao *et al*; 2014, Kagar *et al*; 2014, Pavelkovich *et al*; 2014, Lee *et al*; 2015, Valdezate *et al*; 2015, Manageiro *et al* ; 2015, Papagianitsis *et al*; 2015). Dans le continent africain, peu de travaux s'intéressent à l'étude de la résistance bactérienne. Les *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae* constituent les 2 familles les plus étudiées (Vlieghe *et al* ; 2009, Baltazar *et al* ; 2014).



Dans ce continent, seuls les intégrons IR de classe 1 et IR de classe 2 ont mis en évidence ; aucun intégron de classe 3 n'a été décrit jusqu'à présent (Gassama-Sow *et al* ; 2003, 2004, Dubois *et al* ; 2007, Franck *et al* ; 2007, Kiiuru *et al* ; 2013, Odumosu *et al* ; 2013, Igbonosa *et al* ; 2013, Touati *et al* ; 2013 Adesoji *et al* ; 2015, Malek *et al* ; 2015). Du fait le de leur faible implication dans la résistance en microbiologie humaine par rapport aux IR de classe 1 et IR de classe 2, les IR de classe 3 sont très peu recherchés et par conséquent très peu étudiés. Cependant, des études récemment menées dans l'environnement portant sur des sédiments (Uyaguari *et al* ; 2013) ou des effluents urbains, hospitaliers et d'abattoir (Stalder *et al* ; 2014, Moura *et al* ; 2010), ont enregistré de fortes prévalences de ces éléments génétiques (pouvant aller jusqu'à ~95%). Bien que ces travaux aient mis en évidence la présence de ces éléments génétiques dans l'environnement, la caractérisation de la structure complète de ces intégrons n'a pas été réalisée. Actuellement, seuls 4 intégrons de classe 3 isolés à partir d'échantillons environnementaux ont été très bien caractérisés (Xu *et al* ; 2007, Barraud *et al* ; 2013, Lee *et al* ; 2015). Fort de ce constat, nous avons entrepris de mener nos travaux de thèse. Il a été question d'effectuer une étude épidémiologique des IR de classe 3 (en France et au Cameroun) et d'étudier les modalités d'expression de l'intégrase et des cassettes de ces supports génétiques. Les objectifs détaillés de nos travaux et les résultats obtenus sont présentés dans la suite de ce manuscrit.

# CHAPITRE I : Généralités sur les intégrons

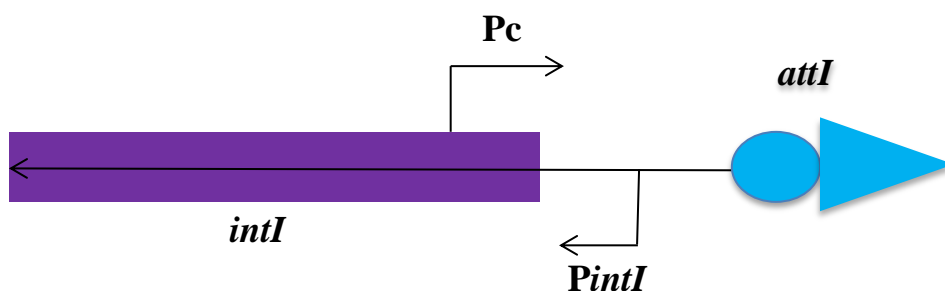
## I- Définition et structure des intégrons

Les intégrons sont éléments génétiques de capture, d'expression et de dissémination de gènes sous forme de cassettes. Ils ont été décrits pour la première fois à la fin des années 80 par 2 chercheurs australiens Ruth Hall et Hatch Stokes (Stokes et Hall ; 1989).

La structure de base d'un intégron se définit par sa plateforme fonctionnelle (Figure 1).

### I.1- La plateforme fonctionnelle

La plateforme fonctionnelle d'un intégron se compose de trois éléments essentiels : un gène *intI* qui code une intégrase, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur de cassettes **Pc** (Hall et Collis; 1995).



**Figure 1 :** Structure de la plateforme fonctionnelle d'un intégron

*intI*: gène de l'intégrase; **Pc**: Promoteur des cassettes; *PintI* : Promoteur de l'intégrase, *attI*: site spécifique de recombinaison

#### I.1.1- Gène de l'intégrase : *intI*

Le gène *intI*, exprimé *via* un promoteur *PintI*, code une intégrase IntI qui appartient à la famille des recombinases à tyrosine spécifique de site (Hall et Collis; 1995).

L'intégrase est capable de catalyser des recombinaisons (excisions et/ou intégrations) de cassettes grâce à la reconnaissance de sites de recombinaison.

Les variations de séquences en acides aminés des intégrases IntI ont permis de distinguer 5 classes d'IR (Mazel *et al* ; 2010). Les intégrons de résistance de classe 1 (IR1) sont caractérisés par une intégrase IntI1 composée de 337 acides aminés; les intégrons de résistance de classe 2 (IR2) ont une intégrase IntI2 de 325 acides aminés. La taille de cette dernière est réduite à 178 acides aminés du fait de la présence d'un codon stop en position 179 dans le gène *intI2* rendant ainsi la protéine non fonctionnelle (Yu *et al* ; 2013). Chez les intégrons de résistance de classe 3 (IR3), l'intégrase IntI3 est composée de 346 acide aminés. Les intégrons de résistance de classe 4 et 5 (IR4 et IR5) sont des intégrons décrits uniquement chez *Vibrio* (Mazel *et al* ; 2006).

### **I.1.2- Promoteur des cassettes Pc**

Autrefois appelé Pant, le promoteur des cassettes Pc assure l'expression des gènes de cassettes (GC) situés en aval. Pc se compose, comme la majorité des promoteurs décrits chez *Escherichia coli*, de 2 éléments fonctionnels (boîtes) « -35 » et « -10 » espacés par une séquence (spacer) de 15 à 21 nucléotides (Shultzaberger *et al* ; 2007).

Le Pc a été très bien étudié chez les IR1 et IR3 où il a été localisé dans la région codante des gènes *intI1* et *intI3* (Collis *et al* ; 1995, 2002a). Une étude effectuée au laboratoire a permis de caractériser plusieurs variants de Pc chez les IR1; 5 principaux possèdent des efficacités d'expression variable (Jové *et al* ; 2010).

Dans 10 % de cas, un second promoteur P2 situé à 119 paires de bases de Pc est présent chez les IR1. Il se forme suite à l'insertion de 3 résidus de guanine (GGG) entre des boîtes « -35 » et « -10 » potentielles (Collis et Hall ; 1995). Ce promoteur a été retrouvé en combinaison avec le variant de Pc faible où il joue le rôle de promoteur majeur (Jové *et al* ; 2010).

Chez les IR2, le Pc a été décrit dans le site *attI2* et sa séquence codante est TTTAAT-N<sub>17</sub>-TAAAAT (Da Fonseca *et al* ; 2011).

L'analyse *in silico* des séquences des IR3 décrites jusqu'à présent montre l'existence de 3 variants de Pc ; leur force relative demeure jusqu'à présent inconnue. Les 3 variants de Pc des IR3 sont portés par les intégrons In3-1 (AF416297), In3-2 (AY219651) et In3-5 (HE616889).

### I.1.3- Site de recombinaison *attI*

Au sein d'un intégron, les cassettes sont localisées en aval du site *attI* (Figure 1). Celui-ci se compose au minimum de 2 sites de fixation de l'intégrase nommés L et R qui constituent le site simple (Partridge *et al* ; 2000). Pour le cas du site *attI1*, il existe deux autres sites indispensables au processus de recombinaison : un site de faible liaison et un site de forte liaison tous deux situés en amont du site simple (Figure 2).



**Figure 2 :** Structure du site *attI1* : exemple de la jonction entre *attI1/qacE*

Le site *attI1* est délimité par la barre noire, les barres blanches représentent les bases reconnues par IntI1 et impliquées dans la reconnaissance du site *attI1*. Les flèches horizontales indiquent l'orientation des sites de liaison (en gras) de l'intégrase IntI1 : site de forte liaison, site de faible liaison et site simple (composé de 2 séquences répétées inversées séparées par 6 nucléotides). La flèche verticale rouge indique le lieu d'intégration des cassettes précisément entre le G et le T de la séquence GTTAGAT du brin supérieur. (Partridge *et al* ; 2000).

Le point de recombinaison est situé au niveau du triplet 5'-GTT-3' situé dans le site R encore appelé core site (Collis et Hall ; 1995)

Les travaux de Collis *et al* ont montré que l'intégrase se fixe préférentiellement sur son site *attI* natif. Toutefois, l'intégrase IntI1 est capable de reconnaître aussi les sites *attI2* et *attI3* et d'assurer par la suite l'intégration d'une cassette au sein de l'intégron (Collis *et al* ; 1992).

## I.2- La région variable : les cassettes

La région variable est généralement caractérisée par la présence d'une ou de plusieurs cassettes. Les cassettes sont constituées d'un gène qui confère généralement une résistance à un antibiotique et d'un site de recombinaison spécifique *attC* (autrefois appelé l'élément 59-paires de bases) situé en aval du gène (Recchia et Hall; 1995).

Une cassette est une unité fonctionnelle qui peut être mobilisée de façon individuelle (Collis et Hall ; 1992). Leur taille varie de **262 à 1549** pb du fait de la taille du gène en présence et de la taille du site *attC*. Une cassette peut exister sous forme circulaire, libre, ou sous forme linéaire quand elle est intégrée au sein de l'intégron (Collis et Recchia ; 1995). Une cassette fait partie intégrante d'un intégron quand elle est intégrée au site *attI* ou entre 2 sites *attC* (Hall et Collis; 1995). Le nombre de cassettes au sein d'un IR est variable et peut atteindre 10. Les travaux de Lee ont mis en évidence la présence de 10 cassettes au sein d'un intégron de classe 1 (KC170993) isolé d'une souche clinique de *Delftia tsuruhatensis* CRS1243. Un autre intégron de classe 1 avec 8 cassettes de résistance aux antibiotiques a été décrit chez une souche clinique de *E. coli* MG-1. (Naas *et al* ; 2001).

## **I.2.1- Nature des cassettes**

Les gènes retrouvés dans les cassettes sont tous orientés dans la même direction et exprimés à partir d'un promoteur unique Pc (Recchia et Hall; 1995).

Toutefois, certaines cassettes telles que *cml* et *qac* impliquées respectivement dans la résistance au chloramphénicol et aux ammoniums quaternaires possèdent leur promoteur propre (Naas *et al* ; 2001). La majorité des gènes décrits au sein des cassettes d'IR codent des résistances à des antibiotiques ou à des désinfectants et antiseptiques. L'expression du gène d'une cassette est d'autant plus importante que la cassette est située en première position c'est-à-dire le plus proche du promoteur Pc (Collis et Hall ; 1995).

Une revue a recensé plus de 140 gènes de résistance aux antibiotiques (Szchepanowski *et al* ; 2009). Les cassettes codent des résistances à quasiment toutes les familles d'antibiotiques (aminoglycosides, bêtalactamines, phénicolés, macrolides, triméthoprime, quinolones, fosfomycine, lincomycine) et aux ammoniums quaternaires ont aussi été répertoriées. A côté de ces gènes de résistance, des cadres de lecture ouvert ou Open Reading Frame (*orf*) codant des protéines de fonctions inconnues ont aussi été décrits au sein des intégrons (Xu *et al* ; 2007).

## **I.2.2- Le site de recombinaison *attC***

Indispensable au processus de recombinaison des cassettes, le site *attC* est situé en aval du gène dans les cassettes. De séquence nucléotidique variable, les sites *attC* ont une taille qui varie de **57** à **141** paires de bases (pb).

De façon structurale, on distingue deux séquences consensus LH et RH constituées chacune de séquences répétées inversées imparfaites l'une de l'autre 1L- 2L et 1R- 2R (Figure 3).

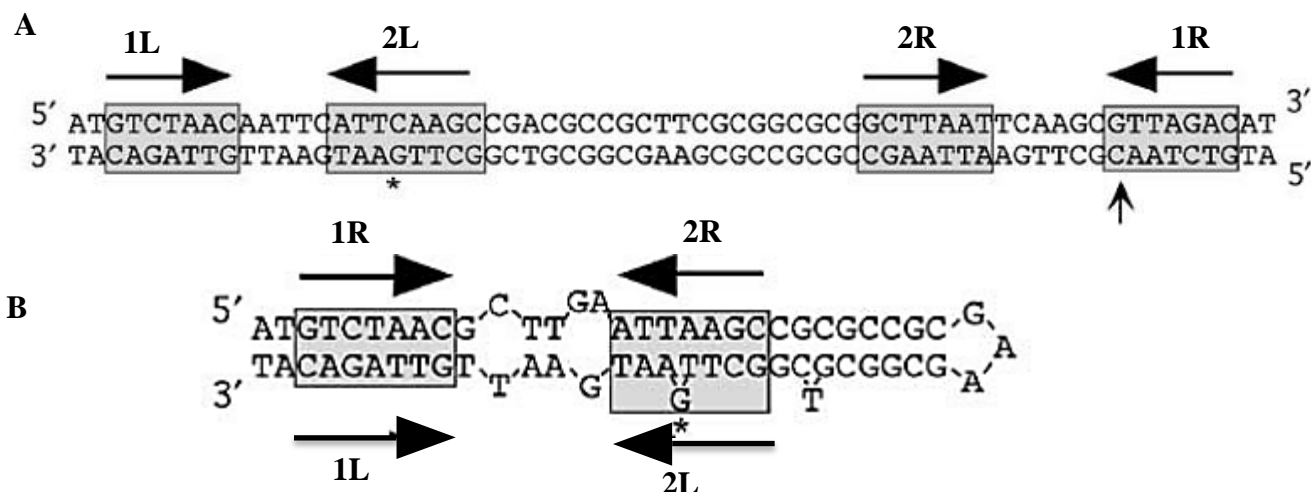
Les séquences 1R et 2R correspondent respectivement au « site core » de séquence consensus GTT suivi des bases de séquence consensus AGGC ou RRRY (R= purine A ou G, Y= pyrimidine T ou C), et au « site core inverse » de séquence consensus RYYAAC (Rowe-Magnus et Mazel; 2002) (Figure 3). Chaque séquence consensus comprend deux domaines inversement orientés et séparés de 7 à 8 paires de bases. Ces domaines sont reconnus par l'intégrase et correspondent aux sites de fixation de cette enzyme (Stokes *et al*; 1997).



**Figure 3 :** Structure d'un site *attC* : cas de la jonction entre les cassettes *aadB/qacE*.

Le site *attC* est délimité par la barre noire, les barres blanches représentent les bases reconnues et impliquées dans la reconnaissance du site *attI* par IntI1. Deux sites simples RH (Right-Hand) et LH (Left-Hand) composent le site *attC* et comprennent les séquences en gras reconnues par l'intégrase IntI1: 1L-2L, 1R-2R. Leur orientation est indiquée par des flèches horizontales. Le site 2L possède une base G supplémentaire par rapport à 2R et marquée par un astérisque noir en dessous. La flèche rouge indique la zone de jonction entre *aadB* et *qacE* (Partridge *et al* ; 2000).

La présence des séquences inversées répétées au niveau des sites *attC* leur permet d'adopter une structure secondaire tige-boucle (Figure 4) indispensable pour leur recombinaison par l'intégrase. Lors de la recombinaison, l'intégrase se fixe sur les 2 brins du site *attI* et sur le brin inférieur du site *attC* sous sa tige-boucle (Francia *et al* ; 1999, Bouvier *et al* ; 2005).



**Figure 4** : Structure en (A) du site  $attC_{aadA7}$  de la cassette  $aadA7$  (double brin) et en (B) de la structure secondaire de  $attC_{aadA7}$  (simple brin).

Les flèches noires horizontales indiquent les séquences inversées répétées 1L-2L, 2R-1R ; le site 2L présente une base G supplémentaire marquée par un astérisque et la séquence du site core est celle du site 1R. Les séquences encadrées en gris correspondent aux sites de fixation de l'intégrase. La flèche verticale noire indique le site de crossing-over. (Bouvier *et al* ; 2005).

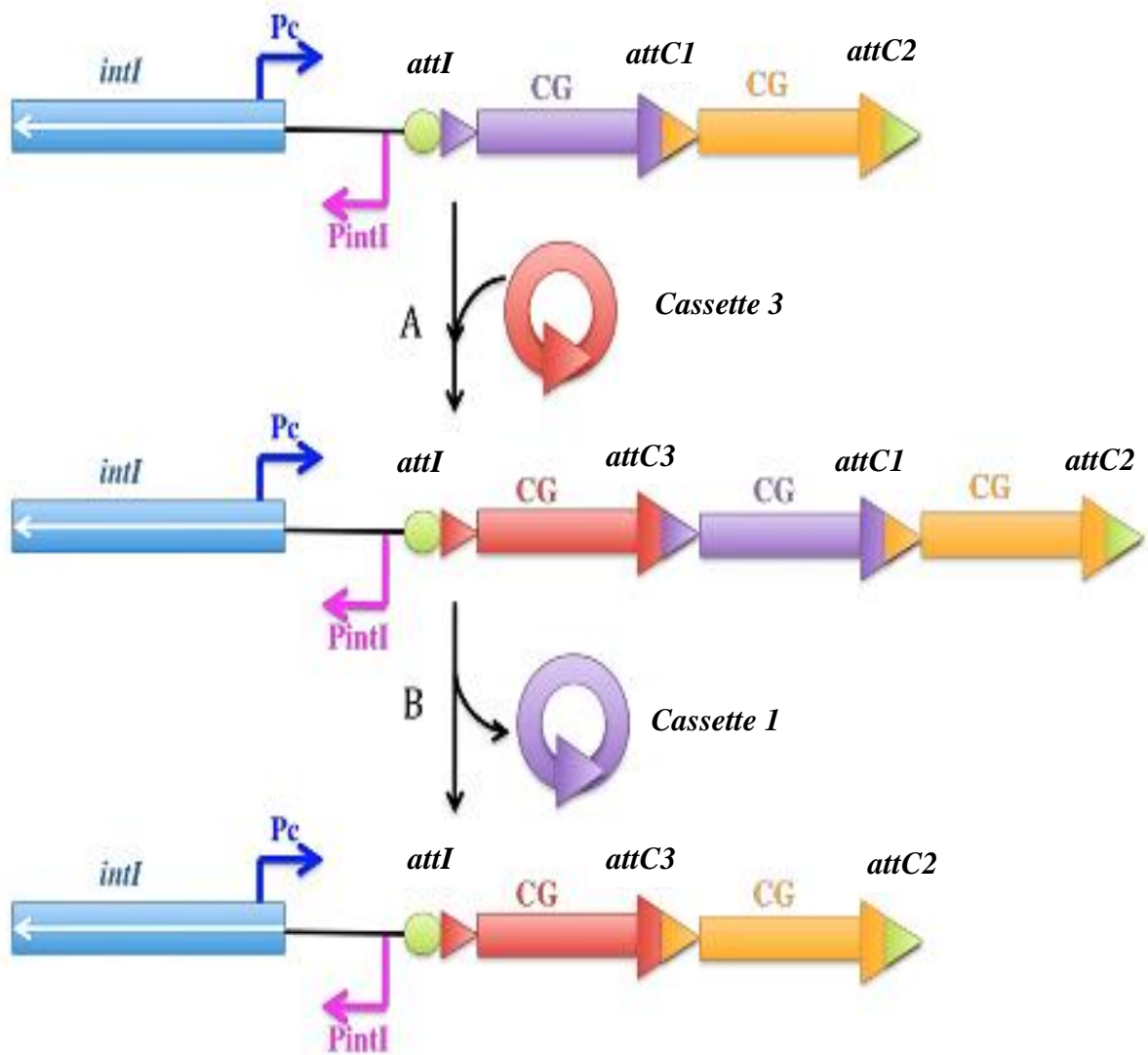
### I.2.3- Le mouvement des cassettes

Les mécanismes de recombinaison des cassettes (intégration ou excision) sont catalysés par l'intégrase *IntI* et font intervenir les sites *attI*, *attC*. Ces mécanismes se font rarement au niveau d'un site secondaire de recombinaison caractérisé par la présence d'un triplet GTT. Les trois bases GTT du motif GTTRRRY sont indispensables à la recombinaison des cassettes qui s'effectue entre le G du premier site de recombinaison et le premier T du deuxième site (Recchia et Hall ; 1995). Trois types de recombinaisons ont été décrits : *attI x attC* ; *attI x attI* et *attC x attC*. Les évènements impliquant deux sites *attI* sont moins efficaces que ceux impliquant deux sites *attC* et la réaction *attI x attC* est la plus fréquente des trois (Collis *et al.*; 2001).



L'**intégration** de cassettes se fait préférentiellement par recombinaison entre un site *attI* et un site *attC* (Figure 5A) permettant ainsi l'insertion de la cassette au début du réseau de cassettes, le plus proche possible du promoteur Pc (Hall *et al.*; 1991 ; Collis *et al.* ; 1993). Il a été montré que l'intégrase IntI1 catalyse la recombinaison entre la séquence double brin du site *attI1* et la séquence simple brin (brin inférieur) du site *attC* (Figure 4B). Au cours de ce mécanisme, il se produit un échange entre les 2 sites conduisant à la formation d'une jonction de Holliday qui sera résolue au cours de la réplication (Bouvier *et al.* ; 2005, Loot *et al.* ; 2012). Les recombinaisons *attI x attC* peuvent aussi se produire entre 2 intégrons portés chacun par un plasmide différent et conduire ainsi à la formation de co-intégrats (Collis *et al.*; 2001)

Le mécanisme d'**excision** de cassette au sein d'un intégron est catalysé par l'intégrase IntI et conduit à la libération d'une ou de plusieurs cassettes sous forme circulaire (**Figure 5B**) (Collis et Hall 1992). Les mouvements d'excision font intervenir le plus souvent les réactions *attC x attC* et plus rarement les réactions *attI x attC* (Bennett;1999). Les travaux de Collis *et coll.* (1992) ont mis en évidence des évènements de délétion de cassettes (*aadA2*, *aaaC1* et *aacA4*) catalysés par l'intégrase IntI1. Les cassettes libérées dans l'environnement bactérien peuvent être réintégrées dans un autre site de l'intégron. L'excision des cassettes intégrées au niveau des sites secondaires de recombinaison est moins fréquente. (Recchia et Hall; 1995).



**Figure 5 :** Mécanisme d'intégration et d'excision de cassettes.

**A :** Mécanisme de recombinaison impliquant le site *attI* et le site *attC3* de la cassette rouge ; l'intégration de cette dernière se fait au plus proche du promoteur *Pc*.

**B :** Recombinaison entre 2 sites *attC* des cassettes violette et rouge entraînant l'excision de la deuxième cassette (violette). Les recombinaisons sont médiées par l'intégrase *IntI*.

En plus des mécanismes d'intégration et d'excision de cassettes ; l'intégrase IntI peut catalyser aussi des réarrangements des cassettes au sein de la région variable. Une étude récente a montré que sous la pression de sélection exercée par le chloramphénicol, l'intégrase IntI assurait le réarrangement des cassettes *via* l'excision des cassettes adjacentes à la cassette *catB9* (code la résistance au chloramphénicol) facilitant ainsi le rapprochement de cette dernière au promoteur Pc (Barraud et Ploy 2015).

### **I.3- Régulation de l'expression du gène de l'intégrase et des cassettes**

#### **I.3.1- Régulation du gène de l'intégrase *intI***

L'une des propriétés essentielles des intégrons repose sur la faculté qu'a l'intégrase à catalyser les mécanismes de recombinaison des cassettes. La présence des cassettes de résistance au niveau de la région variable témoigne de la fonctionnalité de cette intégrase.

Du fait que la domestication d'une intégrase fonctionnelle constitue un coût biologique supplémentaire, il est bénéfique pour la bactérie hôte de réguler l'expression de ce gène (Harms *et al* ; 2013). En effet, après la mise en évidence d'un site de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice de l'intégrase (*PintI*), il a été démontré que l'expression du gène *intI* est régulée par la réponse SOS. Les expériences ont été menées avec l'intégrase d'un IR1 et l'intégrase d'un intégron chromosomique décrit chez *Vibrio cholerae* (Guérin *et al* ; 2009).

La protéine LexA est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS bactérienne qui est impliquée dans la réparation des dommages que l'ADN subit lors des différents stress (Walker G ; 1984).

Cette protéine réprime les gènes du régulon SOS en se fixant sur un site spécifique nommé boîte LexA situé dans la région promotrice de ces gènes (Erill *et al* ; 2007).

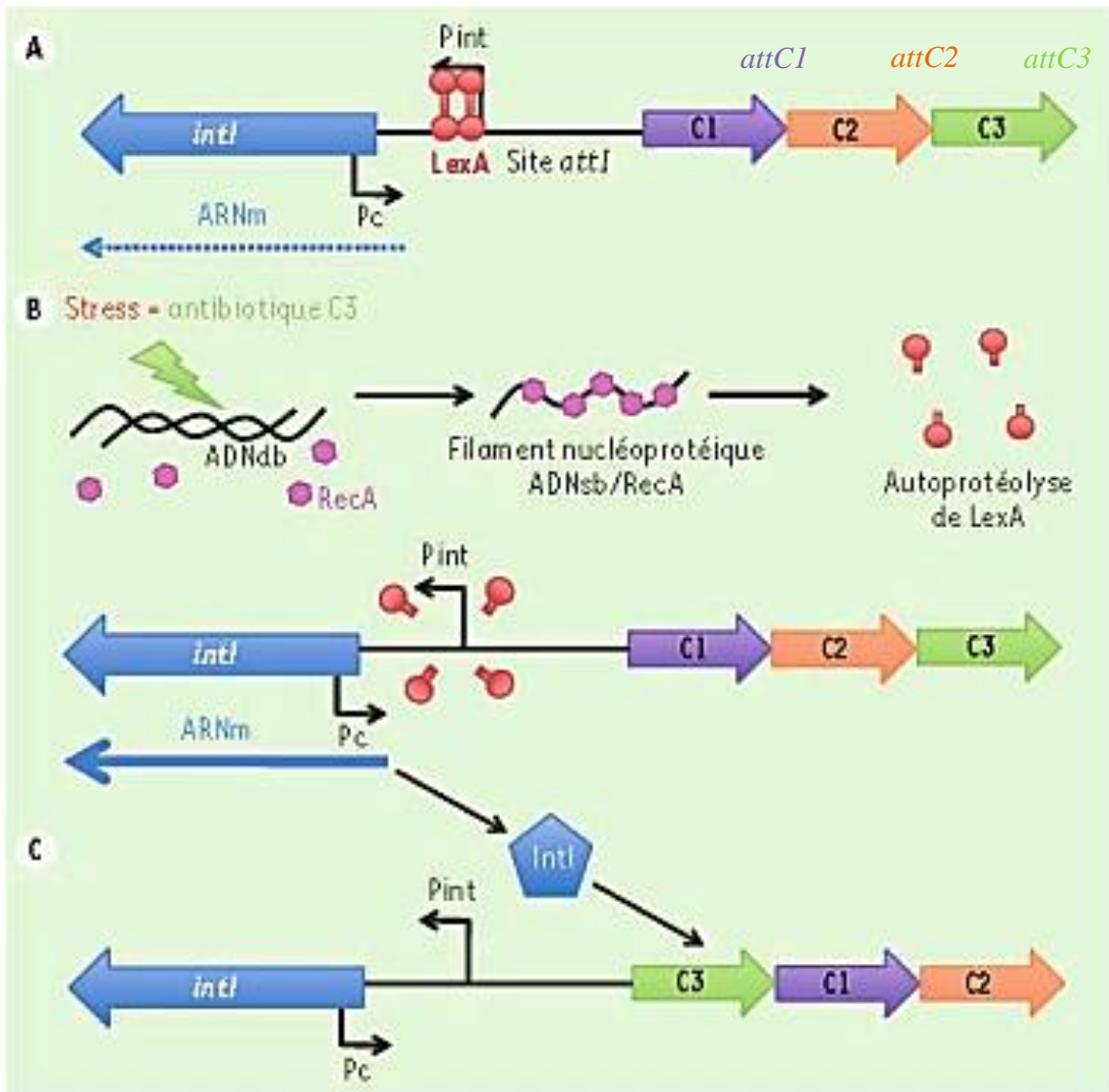
Sous l'action d'un stress affectant le génome bactérien, différentes voies conduisent à la formation d'ADN simple brin qui est reconnu par la protéine RecA. Le filament nucléoprotéique formé est recruté par LexA ; le complexe formé active alors la capacité autoprotéolytique de LexA entraînant ainsi son clivage et la libération de son site de fixation (Figure 6). Cette libération conduit à la dérégulation des gènes du régulon SOS permettant ainsi leur expression (Walker G ; 1984).

Les travaux de Guérin *et al.* ont démontré que la réponse SOS induite par les antibiotiques ampicilline, triméthoprime et ciprofloxacine augmente 4,5 fois l'expression du gène *intI1* (de l'IR1) et 37 fois l'expression de l'intégrase de l'intégron chromosomique de *V. cholerae*. Cette surexpression s'accompagne d'une augmentation de l'activité d'excision catalysée par ces intégrases. Les fréquences d'excision enregistrées étaient respectivement 141 et 340 fois plus importante au sein de l'intégron de classe 1 et de l'intégron chromosomique (Guérin *et al* ; 2009). Au cours des mêmes travaux, le site LexA a été mis en évidence chez les 3 principales classes d'IR (classe1 à 3). Cette observation laisse supposer que les intégrases IntI2 et IntI3 pourraient être aussi régulées par la réponse SOS. Les résultats de Guérin ont été confirmés par ceux de Cambray qui ont démontré que le gène de l'intégrase *intIA* de l'intégron chromosomique de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 était aussi régulé par la réponse SOS (Cambray *et al* ; 2011). La même étude a montré que LexA contrôlait l'expression de plus de 600 intégrases différentes ce qui laisse suggérer que l'ancêtre commun des intégrases était lui aussi régulé par LexA.

En 2004, les expériences réalisées par l'équipe de Beaber ont démontré que la réponse SOS favorise la dissémination de la résistance *via* le transfert horizontal de gènes de résistance.

Ces expériences ont réussi à démontrer que, sous l'effet de la réponse SOS déclenchée par la ciprofloxacine et la mitomycine C, l'expression des gènes *setC* et *setD* catalysant l'excision et le transfert de l'élément SXT augmente. L'élément SXT décrit généralement sur le chromosome de *V. cholerae* code la résistance au chloramphénicol, au triméthoprime-sulphaméthoxazole et à la streptomycine (Beaber *et al* ; 2004).

Si l'expression de l'intégrase affecte le fitness de la bactérie, la régulation de l'expression du gène *intI* par la réponse SOS serait donc avantageuse : elle permettrait d'une part un gain d'énergie et d'autre part le maintien du réseau de cassettes. Une cassette pourra donc sous l'effet de la pression de sélection être rapprochée du promoteur  $P_c$  pour être mieux exprimée comme démontrée récemment (Barraud *et al* ; 2015).



**Figure 6 :** Régulation du gène *intI* par la protéine LexA

(A). La protéine LexA chevauche le promoteur de l'intégrase *Pint*. (B). Lors d'un stress conduisant à la formation d'ADN simple brin, par exemple par un antibiotique dont la résistance est codée par la cassette C3, le filament nucléoprotéique ADNsb/RecA conduit à l'autoprotéolyse de LexA et donc à l'activation de la réponse SOS. Le promoteur de l'intégrase est alors libéré. (C). L'intégrase produite effectue un réarrangement de cassettes ramenant ainsi la cassette C3 en première position (plus proche du *Pc*) pour permettre à la bactérie de résister au stress antibiotique qu'elle subit. *Pc* : Promoteur des cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2*, *attC3* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI* : gène de l'intégrase, *Pint* : promoteur de l'intégrase, C1, C2 et C3 : cassettes de résistance. D'après (Guérin *et al* ; 2010).

### **I.3.2- Régulation de l'expression du gène des cassettes**

La majorité des cassettes décrites chez les IR sont dépourvues de promoteur. L'expression des gènes qu'elles hébergent est sous la dépendance du Pc. Chez les IR1, un second promoteur P2 contribue à l'expression des gènes de cassettes (GC). La localisation du Pc a été faite dans la séquence codante du gène de l'intégrase chez les IR1 et IR3 (Collis *et al* ; 1995, 2002) et dans le site *attI2* chez les IR2 (Hansson *et al* ; 2002).

L'expression des gènes de cassettes est fonction à la fois du variant du Pc présent et de la position de la cassette dans la région variable.

#### **(i)- Concernant le variant du Pc,**

Il a été démontré expérimentalement que plus le variant du Pc est fort, plus les gènes de cassettes seront exprimés et *vice-versa*. Chez les IR1, 13 variants de Pc ont été décrits et parmi ces derniers, 5 sont les plus fréquemment rencontrés (Tableau 2) avec des niveaux d'expression variables. Rangés du Pc le plus faible au Pc le plus fort, on distingue le PcW, PcH1, PcW<sub>TGN-10</sub>, PcH2 et PcS ; le PcS est 25 fois plus fort que le PcW. L'activité du PcW est, chez 10% des IR1 améliorée par la présence du P2 qui joue le rôle de promoteur majeur (Jové *et al* ; 2010).

En raison de la localisation du Pc dans le gène *intI1*, il a été montré que la séquence du Pc influence la séquence en acides aminés de l'intégrase IntI1. On distingue alors 3 types d'intégrases IntI1 et chacune possède une activité de recombinaison qui lui est propre. Des expériences effectuées au laboratoire, il ressort qu'il existe une relation inverse entre la force du Pc et l'activité de recombinaison d'IntI1 : plus le Pc est faible, plus l'activité de recombinaison d'IntI1 (excision de cassettes) est importante (Jové *et al* ; 2011).

Variant de Pc	Séquence nucléotidique « -35 » « -10 »	Fréquence	Force relative du Pc	Variant d'IntI1	Activité d'excision des cassettes par IntI1
PcH2	<b>TTGACA</b> -N14-TCNT <b>AAGCT</b>	4,4%	20	IntI1R32_N39	++
PcW <sub>TGN-10</sub>	<b>TTGACA</b> -N14-TG <u>N</u> T <b>AAGCT</b>	16,8%	18	IntI1P32_H39	+
PcW	<b>TGGACA</b> -N14-TCNT <b>AAGCT</b>	16,5%	1	IntI1R32_H39	+++++
PcH1	<b>TGGACA</b> -N14-TCNT <b>AAACT</b>	28%	6	IntI1R32_H39	+++++
PcS	<b>TTGACA</b> -N <sub>14</sub> -TCNT <b>AAACT</b>	24,3%	25	IntI1R32_N39	++

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

Les boîtes « -35 » et « -10 » du promoteur Pc sont représentées en gras. La base G du motif TGN du PcW<sub>TGN-10</sub> est soulignée. Les valeurs des fréquences ont été obtenues suite à une analyse *in silico* et la force des variants est rapportée à celle du Pc le plus faible (PcW=1). PcW : (Pc Weak), PcH1 (Pc Hybride 1), PcW<sub>TGN-10</sub>, (Pc Weak avec une région TGN dans la boîte -10), PcH2 (Pc Hybride 2) et PcS (Pc Strong). (Jové ; 2010).

Chez les IR2, il a été mis en évidence la co-existence de 2 promoteurs Pc2A et PcB' dans le site *attI2* capables d'assurer l'expression des gènes de cassettes (Hansson *et al* ; 2002). Chez les IR3, il existe 3 variants de Pc et seule la force d'un de ces variants a été évaluée (Collis *et al* ; 2002).

#### (ii)- Concernant la position de la cassette

Les travaux de Collis ont montré que, plus une cassette est située à proximité du Pc, plus elle sera exprimée et inversement (Collis et Hall ; 1995). Les mêmes travaux ont révélé que la cassette *aadA1* qui code la résistance aux antibiotiques streptomycine et spectinomycine était mieux exprimée quand elle était située en première position ; cette expression était 4 fois moins importante lorsque la cassette était précédée par une autre. Toutefois, une cassette très éloignée dans un réseau de cassettes peut au besoin (pression de sélection exercée par un antibiotique) être rapprochée du Pc afin d'être mieux exprimée (Barraud *et al* ; 2015).



## I.4- Origine des intégrons

Les intégrons sont des structures anciennes qui existaient bien avant l'ère des antibiotiques. En effet, des cassettes de gènes associées au gène de l'intégrase ont été décrites au sein des séquences répétées du génome de nombreuses bactéries appartenant au genre *Vibrio*, y compris la souche de *V. metschnikovii* isolée en 1888. Ces intégrons chromosomiques de structures très larges (au moins 100Kb) et capables d'héberger plus de 100 cassettes de gènes ont été appelés Superintégrons (SI) (Mazel *et al* ; 1998). Ils sont à distinguer des intégrons de résistance. Les gènes des cassettes présents dans ces superintégrons codent des fonctions adaptatives (virulence) et rarement la résistance aux antibiotiques, mais la majorité codent des protéines dont les fonctions demeurent encore inconnues (Rowe-Magnus *et al* ; 2001).

Sur le plan structurel, les intégrons de résistance (IR) présentent une organisation similaire à celle des SI laissant envisager que ces derniers seraient les précurseurs des IR. Les IR se seraient formés par capture du gène de l'intégrase *intI* et des sites de recombinaison *attC* via des éléments mobiles tels que les transposons (Rowe-Magnus *et al* ; 2001). De plus, la même équipe a démontré l'activité recombinante de l'intégrase décrite au sein du SI de *V. cholerae* (*VchintIA*). Il a été aussi démontré que les propriétés recombinantes des intégrases des IR sont capables de catalyser la capture des cassettes au sein des SI (Rowe-Magnus *et al* ; 2002). Les SI seraient des ancêtres des IR qui auraient évolué au cours de l'histoire afin de s'adapter aux diverses pressions de sélections liées aux environnements.

Le processus conduisant à la formation des cassettes demeure encore non élucidé.

Un modèle de formation des cassettes a été proposé en 2009. Les cassettes se seraient formées par recombinaison homologue entre deux copies d'introns, l'une étant intégrée au niveau des terminateurs de transcription d'un gène et l'autre au niveau d'un site *attC* (Leon et Roy, 2009).

## **I.5- Epidémiologie des intégrons**

### **I.5.1- Les intégrons de résistance (IR)**

Plusieurs travaux ont mis en évidence la présence d'IR au sein de différentes bactéries. Ces intégrons ont été fréquemment décrits au sein des bactéries d'intérêt clinique. Actuellement, on distingue 5 classes d'IR; il s'agit des intégrons de classe 1 à classe 5 (Mazel *et al* ; 2010).

#### **I.5.1.1- Les IR1**

La grande majorité des études recensées sur les intégrons ont été effectuées sur les IR1. Ces intégrons représentent actuellement la classe d'IR la plus prévalente dans le domaine clinique et constituent par conséquent la classe d'intégrons la plus étudiée. Les IR1 sont fréquemment décrits chez les BGN et chez quelques BGP. Ils sont portés le plus souvent par des éléments mobiles tels que les plasmides ou transposons de la famille Tn3 (Tn21 et Tn1696) et sont rarement localisés sur le chromosome bactérien (Hall; 1997). La présence de ces supports chez les microorganismes est généralement associée à un phénotype de multirésistance (Gillings *et al* ; 2008, Koczura *et al* ; 2014).

La région variable de ces intégrons héberge le plus souvent les cassettes codant la résistance à la streptomycine et spectinomycine (*aadA*) et au triméthoprim ( *dfrA*) (Fluit et Schimitz; 2004). L'équipe de Cao a récemment mis en évidence au Japon la présence d'IR1 chez 51 % des souches cliniques multirésistantes de *K. pneumoniae* ; les réseaux *orfD-aacA4* et *aadA5-dfrA17* ont été observés (Cao *et al* ; 2014). Une seconde équipe a noté des fréquences d'IR1 de 75 et 43 % respectivement chez les souches cliniques de *E. coli* et *Salmonella* résistantes au sulphaméthoxazole ; les cassettes *dfrA1* et *aadA1* étaient majoritairement représentées (Essen-Zandbergen *et al* ; 2007).

Les travaux de Gassama-Sow au Sénégal ont montré que les intégrons de classe 1 étaient les plus fréquents (26/28 souches soit 92.8 %) au sein de souches cliniques de *Shigella spp.*(Gassama-Sow *et al* ; 2003).

Les IR1 sont de plus en plus décrits au sein des bactéries d'origine environnementale (eaux, sols, sédiments) et animale (Stalder *et al* ; 2014, Gillings *et al* ; 2007 ; 2008, Sung et Oh ; 2014, Paiva *et al* ; 2015). Le relargage des effluents hospitaliers et municipaux constitue la principale voie d'entrée des IR dans l'environnement (Stalder *et al* ; 2012, 2014, Jechalke *et al* ; 2015)

### **I.5.1.2- Les IR2**

Les IR2 constituent la classe d'IR la plus décrite après celle des IR1. Comme ces derniers, les IR2 ont été décrits au sein de bactéries de diverses origines (aquatique, clinique, sol ...); ils ont été le plus souvent retrouvés dans les transposons de la famille Tn7. Leur mobilité se fait par transposition grâce aux 5 gènes *tns* (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* et *tnsE*) (Senda *et al* ; 1996). Ils se caractérisent par une intégrase *IntI2* le plus souvent non fonctionnelle ; cette caractéristique pourrait justifier la stabilité du réseau de cassettes de ces IR2 composé le plus souvent des cassettes *dfrA1*, *sat2* et *aadA1* (Hansson *et al* ; 2002, Laroche *et al*; 2006).

Ces cassettes confèrent respectivement la résistance au triméthoprim - streptothricine et streptomycine/spectinomycine. Toutefois, un IR2 conférant une résistance à l'érythromycine a été isolé d'une souche de *E. coli* ; le réseau de cassette *sat2-ereA-aadA1-orfX* a été mis en évidence au niveau de la région variable de cet intégron. L'expression du gène de la cassette *ereA* était assurée par son propre promoteur et son insertion a été assurée par la séquence d'insertion *IS1* situé en amont du gène *intI2* (Biskri et Mazel ; 2003).

La description de la cassette *sat* en première position a aussi été décrite chez les transposons TnI825(X56815) et Tn7::IS1-*ereA* (AY183453).

En 2005, l'équipe de Ramirez a décrit en Argentine trois souches cliniques de *Acinetobacter baumannii* (AB1, AB28, AB29) hébergeant un IR2 nommé In2-8 (DQ176450). Cet intégron était inséré dans un transposon Tn7 (Tn7::In2-8) et possédait le réseau *sat2-aadB-catB2(ΔattC)-dfrA1-sat2-aadA1-orfX*. (Ramirez *et al* ; 2005a). La même équipe a aussi mis en évidence un transposon Tn7::In2-1 (DQ082896) ayant une seule cassette *sat2* dans une souche clinique de *Burkholderia cepacia* (Ramirez *et al* ; 2005b).

Barlow et Gobius ont réussi à isoler chez une souche animale de *Providencia stuartii* un IR2 hébergeant 9 cassettes (*orf1* à *orf9*) codant des protéines de fonctions inconnues. L'intégrase de cet intégron était fonctionnelle (Barlow et Gobius ; 2006). Dans le contexte clinique, un IR2 (EU780012) isolé en Uruguay chez la souche de *E. coli* 8157 ayant une intégrase fonctionnelle a aussi été détectée (Marquez *et al* ; 2008). De plus, une étude récente effectuée en Chine a caractérisé chez 38 souches de *Proteus mirabilis* une intégrase fonctionnelle ; certaines souches présentaient un réseau de cassettes nouveau *dfrA1-catB2-sat2-aadA1* (Wei *et al* ; 2014). Dans le contexte environnemental, Rodriguez-Minguela en utilisant une approche métagénomique a mis en évidence la présence d'intégrases fonctionnelles IntI2 dans divers échantillons d'origine variée (sol, sédiments, déchets organiques) (Rodriguez-Minguela *et al* ; 2009).

Quelques études épidémiologiques réalisées en Afrique ont signalé la présence d'intégrons de classe 2. Ces intégrons ont été décrits principalement au sein des *Enterobacteriaceae* (Dubois *et al* ; 2007 ; Kiiuru *et al* ; 2013, Malek *et al* ; 2015, Gassama-Sow *et al* ; 2003). Les cassettes qui ont été décrites sont identiques à celles décrites couramment chez les IR2.

Toutefois, une étude menée au Sénégal en 2008 a isolé chez une souche *Shigella sonnei* un intégron de classe 2 dans lequel la cassette *sat2* située en deuxième position était interrompue par une IS911. Le réseau de cassette était *dfrA1-sat1/IS911-aadA1-orfX* (Gassam-Sow *et al* ; 2008).

Les IR1 et IR2 ont été décrits fréquemment chez les BGN appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (*Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*...) et aux genres *Acinetobacter*, *Pseudomonas*. La prévalence de ces intégrons chez les BGP demeure faible (Pan *et al* ; 2006, Deng *et al* ; 2015, Xu *et al* ; 2010, Namvar *et al* ; 2015)

### **I.5.1.3 -Les IR3**

Les IR3 représentent contrairement aux deux classes d'intégrons précédentes, la classe d'IR la moins étudiée. Actuellement, ils ont été décrits à la fois dans un contexte clinique, environnemental et plus rarement chez les animaux. L'étude détaillée de cette classe d'IR fait l'objet du chapitre II.

### **I.5.1.4 -Les IR4 et IR5**

Les IR4 et IR5 ont été décrits chez le genre *Vibrio* (Mazel *et al*; 1998, Clark *et al* ; 2000). Le réseau de cassettes présente un seul gène de résistance aux antibiotiques (*dfr1*) suivi de plusieurs autres gènes codant des protéines de fonction inconnue (AJ277063) (Collis *et al* ; 2002). L'implication de ces intégrons dans l'antibiorésistance est limitée.

## **I.5.2- Les bactéries hôtes des IR**

### **I.5.2.1- Bactéries à Gram négatif (BGN)**

La quasi-totalité des IR a été isolée des BGN. Parmi ces bactéries, celles appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* représentent la portion la plus importante. Des IR isolés chez ces microorganismes, les IR1 sont les plus décrits. Une revue récente a souligné des prévalences d'IR1 comprises entre 22 et 59% chez les BGN (Deng *et al* ; 2015). Les genres bactériens *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* sont les plus fréquents ; l'espèce *S. sonnei* étant le principal hôte des IR2 (Pan *et al* ; 2006, Franck *et al* ; 2007,

Gassama-Sow *et al* ; 2008, Malek *et al* ; 2015). Ce constat est lié au fait que la majorité des travaux réalisée en microbiologie clinique se focalise sur l'étude de l'antibiorésistance chez les BGN. Les BGN non fermentaires appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Providencia* et *Aeromonas* ont été occasionnellement décrits. (Koczura *et al* ; 2014, Barlow et Gobius ; 2006). En plus du domaine clinique, la présence des BGN hébergeant des IR a été signalée dans les échantillons d'origine environnementale et animale (Roe *et al* ; 2003, da silva *et al* ; 2007, Resende *et al* ; 2009, Islam *et al* ; 2008, Laroche *et al* ; 2009). La revue de Stokes *et al.*, en 2010 a recensé l'ensemble de travaux (2008-2010) ayant mis en évidence à partir d'échantillons environnementaux et animaux la présence d'IR chez les BGN. Ces échantillons ont été prélevés en Europe, Asie Amérique et en Afrique (Stokes *et al* ; 2010).

Du fait le leur forte implication en biologie clinique, les BGN constituent les principaux hôtes des IR. Les genres bactériens *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, et *Vibrio* sont ceux qui sont les plus documentés (Deng *et al*; 2015).

#### **I.5.2.2- Bactéries à Gram positif(BGP)**

Les intégrons ont été rarement mis en évidence chez les BGP. La description d'IR (principalement les IR1) chez les BGP a été faite au sein des genres bactériens *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Aerococcus* et *Brevibacterium*. L'investigation de ces supports génétiques de résistance chez ces bactéries demeure encore faible (Xu *et al* ; 2011). Les 2 premières études ayant mis en évidence une séquence similaire à celle d'IR1 chez des BGP ou apparentés remontent à 1990 et 1997 respectivement chez les souches de *Mycobacterium fortuitum* (Martin *et al* ; 1990) et de *Rhodococcus erythropolis* (Nagy *et al* ; 1997).

En 1998, la structure complète d'un IR1 (InCg) porté par le plasmide pCG4 a été décrite chez une souche de *Corynebacterium glutamicum*. Cet intégron portait au niveau de sa région variable, une cassette *aadA2a* conférant une résistance à la streptomycine et spectinomycine (Nesvera *et al* ; 1998). Au sein d'une autre souche de *C. glutamicum* LP-6, le gène *intI1* tronqué par une IS6100 a été observée sur le plasmide pTET3 (Tauch *et al* ; 2002). L'équipe de Clark en 1999, a décrit une séquence partielle d'intégron de 1009pb localisée sur un plasmide ~80Kb (pNCC801) renfermant la cassette *aadA* chez la souche *Enterococcus faecalis* W4770 (Clark *et al* ; 1999). L'étude de Xu réalisée en 2010 a révélé la présence d'IR1 et IR2 au sein de souches cliniques d'*E. faecalis* isolées entre 2003 et 2004 en Chine. Les cassettes *dfrA12-orfF-aadA2* et *dfrA1-sat1-aadA1* ont été décrites respectivement au niveau de la région variable d'intégrons de classe 1 et 2 (Xu *et al* ; 2010). Une collection de BGP composée de *Corynebacterium spp.* (*C. ammoniagenes*, *C. casei*, *C. glutamicum*), de *Staphylococcus spp.* (*S. lentus*, *S. nepalensis*, *S. xylosus*), de *Brevibacterium thiogenitalis* et *Aerococcus sp.* positive en IR1 a été isolée dans une litière de volailles (Nandi *et al* ; 2004).

Les nombreux travaux effectués par l'équipe de Xu en Chine ont caractérisé chez des souches cliniques de *S. aureus* les IR1 dont les cassettes codent la résistance pour la streptomycine-spectinomycine (*aadA*) et au triméthoprime (*dfrA*) (Xu *et al* ; 2007a, 2007b, 2011a, 2011b). De plus, une étude rétrospective aussi effectuée en Chine sur 1739 souches cliniques de *S. aureus* a montré que 31,6 % hébergeaient un intégron de classe 1 (Deng *et al* ; 2015). Deux travaux récents ont noté la présence d'intégrons de classe 1 chez les souches de *S. aureus* isolées à la fois dans le contexte clinique en Turquie (Guney *et al* ; 2015) et environnemental à Taïwan (Wam et Chou ; 2015). Les travaux menés en Iran par Mostafa *et al* & Yahaghi *et al* ont mis en évidence chez des souches cliniques de *S. aureus* des IR1 (Yahaghi *et al* ; 2014) ; des IR2 ont aussi été observés (Mostafa *et al* ; 2015). En 2013, une autre étude réalisée en Iran sur 200 souches de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*) a souligné la présence d'IR1 chez 40,5% (81/200) de souches.

Les travaux de Guo ont observé l'excision et l'intégration de cassettes au sein de l'intégron de classe 1 qu'hébergeait la souche de *S. aureus* RN4220 (Guo *et al* ; 2011).

Les cassettes *aadA* et *dfrA* codant respectivement la résistance pour la streptomycine-spectinomycine et au triméthoprimine sont ont été plus fréquemment décrites au sein de ces intégrons chez les BGP. La présence des cassettes précédemment observées chez les BGN laisse suggérer l'existence d'un échange de ces éléments entre BGN et BGP. Cet échange passe par des mécanismes de recombinaison (excision et intégration) catalysés par l'intégrase IntI.

### **I.5.3- Les Superintégrons (SI)**

Les SI ont été décrits principalement chez de nombreuses espèces appartenant à la famille des *Vibrionaceae* (*V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, *V. fischeri*) ainsi que chez des bactéries appartenant aux genres *Xanthomonas*, *Shewanella*, *Profobacterium*, *Listonella*, *Alteromonas* et *Pseudomonas* (Rowé-Magnus *et al* ; 2001, Mazel *et al* ; 2010).

Bien que partageant des structures similaires, les SI se distinguent des IR par trois caractères (Mazel *et al* ; 1998) :

(1)- Les SI sont toujours présents sur le chromosome alors que les IR sont véhiculés par les éléments mobiles tels que les plasmides ou transposons ;

(2)- La région variable est caractérisée par un nombre de cassettes plus élevé (pouvant aller jusqu'à 200 cassettes) ;

(3)- Les sites de recombinaison *attC* des cassettes d'un même SI sont très conservés tandis qu'ils varient en séquences et en taille pour les cassettes présentes chez les IR.



## **CHAPITRE II : Les intégrons de classe 3**

### **II.1- Epidémiologie**

Les intégrons de classe 3 représentent la troisième classe d'IR. Actuellement, on dénombre moins de 10 publications ayant décrit la structure complète d'un intégron de classe 3. Toutefois, quelques travaux ont réussi à mettre en évidence la présence du gène de l'intégrase *intI3* au sein de souches appartenant à des genres différents (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Nocardia*).

Contrairement aux deux autres classes d'IR (classe 1 et 2), les IR3 constituent la classe d'IR dont la prévalence au sein des isolats bactériens est la plus faible. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la majorité des travaux sont axés sur l'étude des IR1 et IR2. Ainsi, très peu de données sont disponibles dans la littérature sur cette classe d'IR.

Les intégrons de classe 3 ont été décrits chez des BGN isolées dans le contexte clinique, environnemental et chez l'animal.

#### **II.1.1- Dans le contexte clinique**

En microbiologie clinique, des auteurs ont mis en évidence au sein des bactéries isolées dans différents pays et appartenant à des genres distincts la présence d'intégrons de classe 3 ; dans la majorité des cas, seul le gène *intI3* a été détecté.

Le premier IR3 nommé **In3-1** d'après la nomenclature proposée par Xu (Xu *et al* ; 2007) a été détecté sur un plasmide de 9 Kb dans la souche clinique de *Serratia marcescens* AK9373 isolée au Japon (Arakawa *et al*; 1995). La région variable d'In3-1 se compose de 2 cassettes codant des protéines impliquées dans la résistance aux antibiotiques.

La cassette *bla*<sub>IMP-1</sub> codant une métallo-β-lactamase est suivie de la cassette *aac(6')-Ib* qui confère une résistance aux aminoglycosides. La présence de cet intégron a conféré une résistance acquise à l'imipénème à la souche de *S. marcescens* AK9373. Les travaux de Shibata menés au Japon ont retrouvé les gènes *intI3* et *intI1* chez 4 souches cliniques (4/587 soit 0.68 %) de *Pseudomonas putida* hébergeant aussi le gène *bla*<sub>IMP-1</sub> (Shibata *et al* ; 2003).

Une équipe portugaise en 2003 a décrit le second IR3 nommé **In3-2**. Ce dernier a été isolé sur un plasmide (p22K9 de 9.4 Kb) qu'hébergeait la souche de *Klebsiella pneumoniae* FFUL22K présentant un profil BLSE (Béta Lactamase à Spectre Etendu) et responsable d'une infection urinaire. Ce profil était lié à la présence de la cassette *bla*<sub>GES-1</sub> en première position au niveau de la région variable. En aval de *bla*<sub>GES-1</sub>, une seconde cassette *bla*<sub>OXA10</sub>/*aac(6')-Ib* formée par la fusion des 2 cassettes *bla*<sub>OXA-10</sub> (les 32 première bases) et *aac(6')-Ib* conférait notamment une résistance à la kanamycine (Correira *et al* ; 2003). Un intégron de classe 3 identique à In3-2 décrit également sur un plasmide nommé pQ7 (9 Kb) a été isolé de la souche clinique de *E. coli* TB7 en Suisse (Poirel *et al* ; 2010).

Des travaux réalisés en Chine ont permis de mettre en évidence la présence du gène de l'intégrase *intI3* au sein de 8 souches cliniques multi-résistantes de *K. pneumoniae*, soit 29.6% (8/27) ; 2 hébergeaient aussi un intégron de classe 1. Les plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité IncFII, IncN et IncA/C ont été décrits au sein de ces souches et le réseau de cassettes était identique à celui décrit chez In3-2 (Cao *et al* ; 2014). De même, l'étude récemment menée par Valdezate et ses collaborateurs en Espagne a montré que 43 des 76 souches (56,57%) de *Nocardia* résistantes au sulfamethoxazole hébergeaient aussi le gène de l'intégrase *intI3* ; 42,1% de ces bactéries (32/76) hébergeaient également le gène de l'intégrase *intI1* (Valdezate *et al* ; 2015).

La séquence complète d'un intégron de classe 3 (nommé In3-8) a été caractérisée sur le plasmide pKP-M1144 de 12 Kb qu'hébergeait la souche *K. pneumoniae* ST252 au Portugal. Cet intégron a été nommé In1144 (correspond à **In3-8** selon la nomenclature Integrall, Moura *et al* ; 2009) et la caractérisation de sa région variable a révélé la présence de cassettes codant des résistances aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides : *bla<sub>IMP-8</sub>-bla<sub>GES-1</sub>-bla<sub>BEL-1</sub>-aac(6')-Ib* (Papagianitsis *et al* ; 2015). Une autre souche clinique de *K. pneumoniae* (Kpn 21.22) hébergeant un intégron de classe 3 nommé **In3-10** a été décrite en Espagne. En aval du gène *intI3*, la région variable de séquence  $\Delta$ *bla<sub>OXA10</sub>-bla<sub>OXA434</sub>/aac(6')Ib* a été décrite. Le gène de la première cassette est identique à la séquence de 32 pb de la cassette *bla<sub>OXA-10</sub>* décrite chez In3-2 ; la deuxième cassette résulte de la fusion entre les cassettes *bla<sub>OXA434</sub>* et *aac(6')Ib* (del Castillo *et al* ; 2015).

Lors d'une étude multicentrique menée dans les pays Baltes (Estonie, Lettonie, Lituanie) et à St. Pétersbourg (Russie), 0.37% des souches (36/9757) (11 productrices de carbapénémases et 25 non productrices) de *E. coli* et *K. pneumoniae* hébergeant le gène *intI3* ont été caractérisées ; la majorité d'entre elles hébergeaient le gène de résistance *bla<sub>CTX-M-1</sub>* codant une BLSE (Pavelkovich *et al* ; 2014). Une portion d'une séquence d'intégron de classe 3 *intI3-bla<sub>GES-5</sub>* a été décrite chez des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase isolées au Portugal (Managiero *et al* ; 2015).

Une analyse réalisée en Iran (Kagar *et al* ; 2014) sur des souches diarrhéiques de *E. coli* multirésistantes a révélé que 26.09% (18/69) hébergeaient le gène *intI3*. Le réseau de cassettes de ces intégrons n'a pas été caractérisé mais, une association significative entre la présence de ces intégrons et une résistance à la gentamicine, la kanamycine et la streptomycine a été observée.

En 2009, l'équipe de Xu a également mis en évidence la présence du gène *intI3* à la fois chez 12 souches (la moitié possédant en plus un intégron de classe 1) de *E. coli*, soit 8.2 % (12/146), et chez 1 souche de *P. aeruginosa* (1/71 soit 0.14 %) (Xu *et al* ; 2009). Un intégron de classe 3 hébergeant un gène codant une métallo-bétalactamase a été décrite chez 3 souches de *P. fluva* isolées au Japon. La séquence de l'intégron décrite est la suivante *intI3-aac(6')Ib-fosE-bla<sub>IMP-1</sub>* (Yamamoto *et al* ; 2014) mais, elle n'a pas été déposée dans la Genbank.

De ce qui précède, il ressort que dans le contexte clinique, les intégrons de classe 3 ont été décrits au sein des Entérobactéries et chez les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*. Seule une publication fait état de la description d'IR3 chez des bactéries à Gram positif du genre *Nocardia*. Dans certains cas, les IR3 ont été décrits en présence d'intégrons de classe 1 et leur prévalence varie de 0,14 à 56,57 %.

### **II.1.2- Dans le contexte environnemental**

Les premiers intégrons de classe 3 nommés **In3-3** et **In3-4** décrits dans le contexte environnemental (boues activées) ont été isolés sur le chromosome de souches de *Delftia acidovorans* C17 et *D. tsuruhatensis* A90. C'est lors d'une étude visant à évaluer l'antibiorésistance *via* la recherche d'IR dans l'environnement que l'équipe de Xu a isolé en Amérique du Nord (USA et Canada) les souches C17 et A910 (Xu *et al* ; 2007). La région variable de ces intégrons comprend les cassettes *orfA* ; *orfC/orfD* et *orfE* dont les gènes codent des protéines de fonctions inconnues; In3-4 possède les mêmes cassettes que In3-3 plus la cassette *orfB* (*orfA-orfB-orfC/orfD-orfE*). Les gènes *orfC* et *orfD* séparés chacun de 23 nucléotides constituent les cadres de lecture de la troisième cassette. Le gène *orfB* est identique à celui déjà décrit au sein d'un intégron de classe 1 (Sajjad *et al* ; 2011).



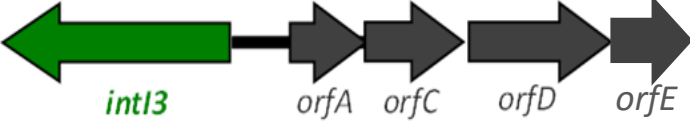
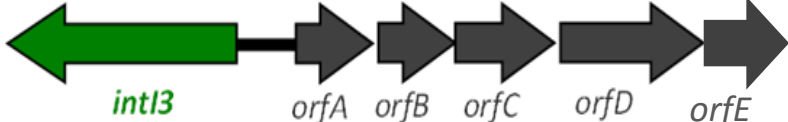

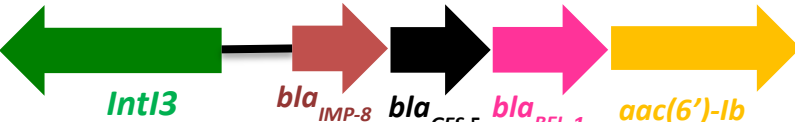

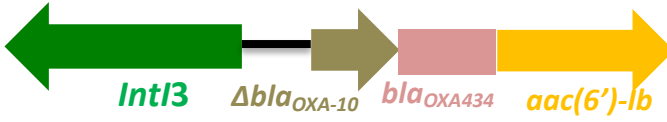
Lors d'une analyse métagénomique, un intégron de classe 3 de structure similaire à In3-2 a été caractérisé sur un plasmide nommé pEMB-2. Ce plasmide a été isolé d'un échantillon de boue activée d'une station d'épuration en Corée du Sud et sa séquence est similaire à celle du plasmide pQ7 de la souche de *E. coli* TB7 (KJ631731). Le plasmide pEMB-2 conférait la résistance acquise à l'ampicilline aux transconjuguants *E. coli* TOP10 (Lee *et al* ; 2015). Une autre étude employant aussi l'approche métagénomique a détecté *via* la méthode d'hybridation de l'ADN une forte prévalence du gène *intI3* dans les effluents urbains et d'abattoirs au Portugal (Moura *et al* ; 2010). En 2009, une souche de *Enterobacter cloacae* LIM73 hébergeant un intégron de classe 3 nommé **In3-5** a été isolée à partir d'un effluent hospitalier prélevé en France. In3-5 a été localisé sur un plasmide mobilisable pUL3AT de 9 Kb appartenant au groupe d'incompatibilité IncQ. Le séquençage complet de cet intégron a montré la présence de 2 cassettes de résistance aux antibiotiques : *bla<sub>OXA-256</sub>* et *aac(6')-Ib* codant respectivement une résistance aux bêtalactamines et aux aminosides. La cassette *bla<sub>OXA-256</sub>*, était précédée d'une séquence de 161 pb hébergeant 2 promoteurs putatifs qui faciliteraient l'expression de cette dernière (Barraud *et al* ; 2013).

Les travaux menés par Uyaguari, Scott et Norman visant à évaluer l'impact de la pollution urbaine sur la distribution des intégrons de résistance ont souligné la présence du gène *intI3* dans le compartiment aquatique et les sédiments de la rivière Charleston Harbor (Caroline du Nord ; USA) et dans les eaux usées se déversant dans ladite rivière. Les intégrons de classe 3 étaient présents à la fois au niveau des compartiments pollués et non pollués et leurs prévalences évaluées en nombre de copies / ng d'ADN total étaient plus élevées dans le compartiment aquatique que dans les sédiments (Uyaguari *et al* ; 2013).

Une étude métagénomique quantitative réalisée en France en 2014 a montré que ces supports sont abondants dans les effluents hospitaliers et urbains (Stalder *et al* ; 2014).

### **II.1.3- Chez l'animal**

Dans le contexte animalier, des IR3 ont été rarement rapportés. En 2000, les travaux de Golstein *et al*, ont détecté par hybridation moléculaire, le gène *intI3* chez 12% des souches de *E. coli* (35/294) responsables d'infections chez le porc et le bœuf. Toutefois, aucun produit d'amplification n'a été obtenu par PCR ciblant le gène *intI3* (Goldstein *et al* ; 2000). Ensuite, le gène *intI3* a été mis en évidence dans des huîtres (fluides et tissus) *Crassostrea virginica* isolées dans la rivière Altamaha (Georgie ; USA) (Barkovskii *et al* ; 2010).

Intégrons (Acc. Nub.)	Structures	Références
In3-1 (AF416297)		Arakawa <i>et al</i> ; 1995
In3-2 (AY219651)		Correira <i>et al</i> ; 2003
In3-3 (EF467661)		Xu <i>et al</i> ; 2007
In3-4 (EF469602)		
In3-5 (HE616889)		Barraud <i>et al</i> ; 2013
In3-8 (KF745070)		Papagianitsis <i>et al</i> ; 2015
/ (/)		Yamamoto <i>et al</i> ; 2014
In3-10 (/)		del Castillo <i>et al</i> ; 2015

**Tableau 3** : Structures des différents intégrons de classe 3 décrits (au 15 février 2016).

(/) : Séquence non déposée dans la GenBank

## II.2- Structure, expression et mécanistique des intégrons de classe 3

Ce chapitre regroupe l'ensemble des processus impliqués dans le fonctionnement de des intégrons de classe 3 (les mécanismes de recombinaison des cassettes, l'expression des gènes des cassettes et de celui de l'intégrase, la régulation de cette expression...). Contrairement aux IR1, peu de données sont disponibles sur la mécanistique des IR3.

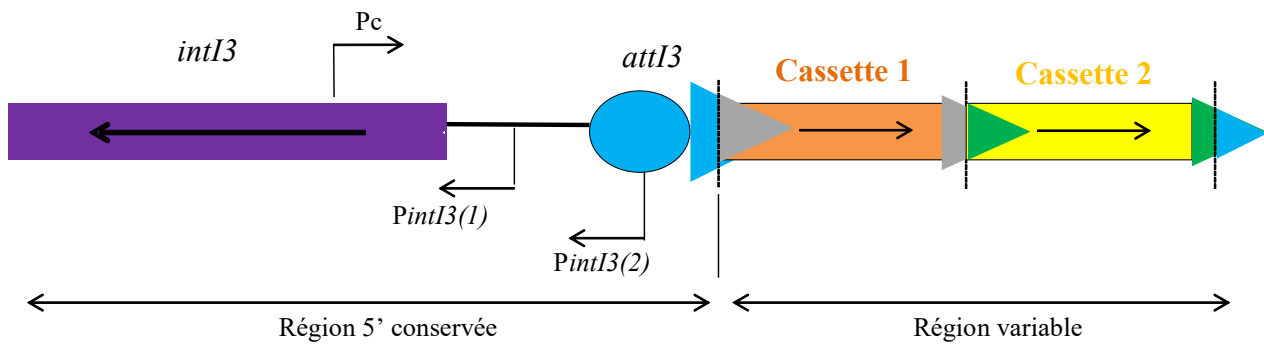
Les premières études sur la mécanistique des IR3 remontent à 1999 (Hall *et al* ; 1999). Ces dernières ont évalué l'activité recombinante de l'intégrase IntI3 de In3-1. Trois ans plus tard ; les travaux de Collis ont fourni d'une part les données sur la caractérisation structurale de cet intégron et d'autre part ont permis d'étudier le système de recombinaison spécifique catalysé par l'intégrase IntI3 (Collis *et al* ; 2002a).

### II.2.1- L'intégrase IntI3

Le gène de l'intégrase *intI3* code une tyrosine-recombinase spécifique de site IntI3 de 346 acides aminés (Hall *et al* ; 1999, Nunes-Düby *et al* ; 1998). Deux promoteurs putatifs *PintI3(1)* et *PintI3(2)* (Collis *et al* ; 2002a) situés en amont de *intI3* ont été proposés (Figure 7) mais leur fonctionnalité n'a jamais été prouvée expérimentalement.

L'analyse des séquences des promoteurs de l'intégrase montre qu'il existe 3 variants du promoteur *PintI3(1)*. En revanche, le variant *PintI3(2)* est le même chez tous les intégrons de classe 3 (Tableau 4).





**Figure 7 :** Structure d'un intégron de classe 3.

Le gène de l'intégrase *intI3* est représenté par le rectangle violet, la flèche indique le sens d'orientation du gène ; Pc : promoteur des cassettes ; *PintI3(1)* et *PintI3(2)* : promoteurs putatifs du gène *intI3* ; *attI3* : site de recombinaison de l'intégron ; dans cet exemple, la région variable est composée de 2 cassettes ; les flèches indiquent l'orientation du gène ; les sites *attC* sont représentés par des triangles gris et vert.

	Intégrons	Séquences <i>PintI3</i>	
		(-35)	(-10)
<i>PintI3(1)</i>	In3-3 ; In3-4 ; In3-5	TTGAAA N <sub>3</sub> -ATT-N <sub>11</sub>	CATACT
	In3-1	TTGAAA N <sub>3</sub> -ATC-N <sub>11</sub>	CATACT
	In3-2 ; In3-8	TTGAAA N <sub>3</sub> -ATT-N <sub>11</sub>	C <u>T</u> TACT
<i>PintI3(2)</i>	In3-1 ; In3-2 ; In3-3 ; In3-4 ; In3-5, In3-8	CGGATA N <sub>17</sub>	TAAACA

**Tableau 4:** Séquences des promoteurs *PintI3*.

Les bases qui diffèrent d'un promoteur à un autre sont en gras et soulignées.

L'intégrase IntI3 est plus proche de celle des intégrons de classe 1 (IntI1) avec qui elle partage 60 % d'identité (Tableau 5). Elle possède des acides aminés communs avec IntI1 et IntI2 (Figure 8).

Intégrases	IntI1	IntI2	IntI3
IntI1	<b>100</b>	<b>46,5</b>	<b>59,6</b>
IntI2	63	100	<b>46,3</b>
IntI3	72,8	59,7	100

**Tableau 5 :** Pourcentage d’identité (en rouge) et de similarité (en noir) entre les séquences protéiques des intégrases IntI1, IntI2 et IntI3 (Hall *et al* ; 1999).



**Figure 8 :** Alignement des séquences protéiques des intégrases IntI1, IntI2 et IntI3. Les domaines 1 et 2 (soulignés) renfermant la tétrade R-H-R-Y (arginine, histidine, arginine, tyrosine) représentent les 2 motifs les plus conservés des trois intégrases. La tyrosine est surlignée en rouge et les acides aminés RHR en jaune. Les acides aminés communs aux trois intégrases sont marqués par des astérisques. Alignement réalisé avec le logiciel ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blastw/index.html>, juin 2007) (Barraud ; 2011).

L’alignement des séquences nucléotidiques des gènes *intI3* des différents intégrons de classe 3 décrits, révèle que le codon start ATG code une méthionine pour la majorité des cas (80%); une exception est observée pour les intégrons In3-5 et In3-10 (Poster 1014 ;

ECCMID 2015) pour lesquels le codon start est ATA (Isoleucine) mais l'initiation de la traduction à ce codon n'a pas été démontrée expérimentalement.

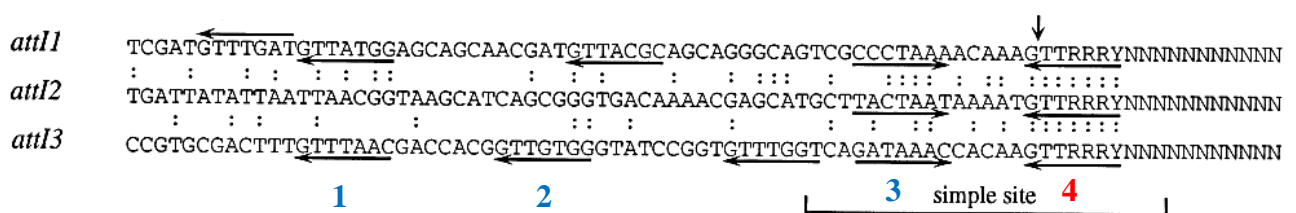
De plus, la séquence en acides aminés des différentes intégrases IntI3 varie peu (<1%) ; les mutations sont observées au niveau des 40 premiers acides aminés.

## II.2.2 - Site de recombinaison *attI3*

Situé en amont du gène de l'intégrase *intI3*, *attI3* est le site de recombinaison spécifique chez les IR3. Il se compose: d'un site de forte de liaison (1) , d'un site de faible liaison (2) qui améliore l'activité du précédent ; et enfin d'un site simple (3 et 4) où s'effectue la recombinaison catalysée par les intégrases IntI3 ou IntI1 (Figure 9) (Collis *et al* ; 2002). En 2004, les expériences de Collis et coll. ont montré que des délétions dans les sites 1 et 2 peuvent réduire de 10 à 1000 fois l'activité de recombinaison de l'intégrase IntI3.

Ces recombinaisons se font au niveau du site simple entre le G du site core (4) et le T du site core de la cassette (Collis *et al* ; 2004).

Un alignement des séquences nucléotidiques des 3 sites *attI* montre qu'il existe entre eux une faible similarité (Collis *et al* ; 1998) (Figure 9).



**Figure 9 :** Alignements des sites *attI1*, *attI2* et *attI3*.

L'alignement a été effectué avec 64 pb de chaque site ; les séquences 1, 2, 3 et 4 sont des sites de fixation de l'intégrase. La recombinaison se réalise au niveau du site 4 (core site); la flèche verticale indique le point de recombinaison. Les points indiquent les bases communes aux 3 sites. (Collis *et al* ; 1998)

## II.2.3 - Promoteur des cassettes Pc

Chez les IR 3, le promoteur Pc a été décrit dans la séquence codante du gène *intI3* (Collis *et al* ; 2002a). Il occupe une position similaire au Pc des IR 1, soit à 99 pb du codon start putatif du gène *intI3*. La séquence du Pc (TAGACA- N<sub>17</sub>- TAGGCT) de l'intégron In3-1 est la première à avoir été décrite. Par la suite, de nouveaux IR 3 ont été caractérisés (Tableau 6).

La force du variant de Pc d'In3-1 a été évaluée par détermination du niveau de résistance de la souche de *E. coli* UB5201 (Collis *et al* ; 2002a) à la streptomycine conférée par la cassette *aadA2* située en première position.

Intégrons	Origine	Pc			Numéro d'accès
		« -35 »	Spacer	« -10 »	
In3-1	<i>S. marcescens</i> AK9373				AF416297
In3-3	<i>D. acidovorans</i> C17	TAGACA	-N <sub>3</sub> -GCC-N <sub>11</sub> -	TAGGCT	EF467661
In3-4	<i>D. tsuruhatensis</i> A90				EF469602
In3-2	<i>K. pneumoniae</i> FFUL 22K	TAGACA	-N <sub>3</sub> -GCT-N <sub>11</sub> -	TAGGAT	AY219651
In3-8	<i>K. pneumoniae</i> ST252				KF745070
In3-5	<i>E. cloacae</i> LIM 73	TAGACA	-N <sub>3</sub> -GCT-N <sub>11</sub> -	TAGGCT	HE616889

**Tableau 6:** Séquences des variants du promoteur des cassettes Pc des intégrons de classe 3. La base qui diffère d'un Pc à un autre est en gras et soulignée. Les intégrons In3-1, In3-3 et In3-4 possèdent la même séquence du promoteur Pc ; celle-ci diffère d'un nucléotide au niveau du spacer pour le Pc d'In3-5. Le Pc des intégrons In3-2 et In3-8 présente une boîte « -10 » différente.

## II.2.4- Mécanisme de recombinaison chez les intégrons de classe 3

Les intégrons sont des éléments génétiques capables d'intégrer ou d'exciser des cassettes de gènes *via* un mécanisme de recombinaison spécifique de site catalysé par une intégrase IntI. La recombinaison s'effectue le plus souvent entre les sites *attI* de l'intégron et le site *attC* de la cassette. Des expériences ont démontré que ce mécanisme est plus efficace lorsque l'intégrase utilise son propre site de recombinaison *attI* (Collis *et al* ; 1992 ; 1993 ; Recchia *et al* ; 1994 ; Francia *et al* ; 1997).

Concernant les IR 3, des travaux ont réussi à mettre en évidence l'activité recombinante de l'intégrase IntI3. Les premières expériences remontent à 1999 ; ces dernières ont été menées avec l'intégrase IntI3 de l'intégron In3-1. Les résultats de ces travaux et de ceux effectués par Larouche et Roy (Larouche et Roy ; 2011) et par Collis et coll. (Collis *et al* ; 2002) ont démontré que l'intégrase IntI3 est capable de catalyser :

- (i) Les recombinaisons entre deux sites de recombinaison portés par deux plasmides différents.
- (ii) L'intégration ou l'excision d'une ou de plusieurs cassettes au sein d'un intégron ou au niveau d'un site secondaire de recombinaison.

Chez les IR3, l'intégration et l'excision des cassettes au niveau des sites spécifiques de recombinaison ont été très bien décrits (Hall *et al* ; 1999 ; Collis *et al* ; 2002a ; Larouche et Roy, 2011).

Concernant les essais d'**intégration** des cassettes, il a été montré que IntI3 était capable d'assurer l'insertion d'une cassette au sein d'un intégron *via* la recombinaison ***attI3 x attC***.

Tout comme IntI1, les évènements de recombinaison intégrative catalysés par IntI3 se réalisent préférentiellement au niveau du site natif *attI3*; ceux impliquant les sites *attI1* et *attI2* étaient rarement obtenus (Collis *et al*; 2002b). Les fréquences de recombinaison montrent que IntI3 recombine 100 fois plus efficacement que IntI1 au niveau du site *attI3*.

Les évènements d'**excision**, catalysés par l'intégrase IntI3 et conduisant en la libération d'une ou de plusieurs cassettes ont aussi été mis en évidence expérimentalement (Collis *et al*; 2002b).

Il en ressort que, les recombinaisons *attC* x *attC* ont été les plus fréquemment décrites contrairement à celles impliquant les sites *attI3* x *attC* et *attI1* x *attC* (Tableau 7). Dans ce dernier cas, la fréquence d'excision des cassettes était quasi nulle indiquant que le site *attI1* est faiblement reconnu par l'intégrase IntI3. Les travaux de Larouche et Roy ont en outre démontré que l'activité d'excision des cassettes par IntI3 est fortement influencée par la structure du site *attC* de la cassette (Larouche et Roy; 2011).

Cassettes	Fréquence d'excision (%) <sup>b</sup>					
	IntI1			IntI3		
	<i>aacA4</i>	<i>aadA2</i>	<i>aacA4</i> + <i>aadA2</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA2</i>	<i>aacA4</i> + <i>aadA2</i>
<i>attI1-aacA4-aadA2-</i>	0.4	36	<0.5	<0.2	9	<0.2
	1.5	89.5	4	<0.5	74.5	<0.5
<i>attI3-aacA4-aadA2-</i>	0.2	18	0.8	1.8	25	3.1
	<0.5	91	1	12	40	5
<i>attI1-aacA4-aadA2-</i>	17	7	40	<0.1	22.5	<0.1

**Tableau 7 :** Excision de cassettes médiée par IntI1 et IntI3.

Les valeurs de la première ligne sont les résultats des fréquences d'excision catalysées par les intégrases IntI1 et IntI3 (500 ou 1000 colonies utilisées); les valeurs de la ligne de-dessous sont celles obtenues avec les intégrases Flag-IntI1 et Flag-IntI3 (200 ou 500 colonies utilisées). D'après (Collis *et al*; 2002b).

En plus de sa faculté à catalyser les recombinaisons spécifiques de site, l'intégrase IntI3, peut aussi catalyser des réactions entre un site *attC* (*attC<sub>dfvB2</sub>* ou *attC<sub>orfA</sub>*) et un site secondaire de recombinaison le plus souvent caractérisé par la présence du triplet GTT. Les triplets GTA et GCT étaient rarement impliqués. Il est intéressant de noter que, IntI3 recombine préférentiellement au niveau des sites secondaires GTT, contrairement à IntI1 pour qui les recombinaisons au niveau des sites GTT et GAT se réalisent à la même fréquence. La fréquence des événements obtenue était 10 fois moins efficace ( $1,7 \times 10^{-6}$ ) que celle obtenue avec IntI1 ( $1,3 \times 10^{-5}$ ) (Collis *et al* ; 2002a).

# **RESULTATS**



# Présentation du travail de thèse

Les recherches menées au cours de ce travail de thèse ont étudié les intégrons de classe 3 avec deux volets

**Un volet épidémiologique** qui a consisté en la caractérisation de nouveaux intégrons de classe 3 chez des bactéries d'origine environnementale isolées en Europe et au Cameroun.

Les travaux de ce volet ont été subdivisés en 2 parties :

**Partie 1 :** L'objectif était de décrire la structure complète des intégrons de classe 3 mis en évidence à partir d'une collection de souches bactériennes précédemment isolées et conservées au laboratoire de l'UMR Inserm 1092 de Limoges (France). Après extraction du matériel génétique, les techniques de PCR, de séquençage et des essais de conjugaison bactériennes ont permis de caractériser les réseaux de cassettes, les variants du promoteur Pc des cassettes et les supports génétiques de ces intégrons.

**Partie 2 :** Les travaux avaient pour objectif de mettre en évidence puis de caractériser de nouveaux intégrons de classe 3 au Cameroun. Ce travail a été réalisé en partenariat avec le Centre Pasteur du Cameroun (CPC). Dans un premier temps, il a été question de rechercher à partir des effluents aquatiques environnementaux les souches susceptibles d'héberger un intégron de classe 3 en utilisant la technique de PCR en temps réel (qPCR) précédemment mise en place au laboratoire. Les échantillons ont été prélevés dans les 2 plus grandes villes Douala et Yaoundé du Cameroun. Par la suite, une caractérisation structurale complète des intégrons de classe 3 isolés et de leur support génétique a été effectuée par des techniques de PCR et de séquençage.

Les résultats de ce volet ont fait l'objet de 2 publications scientifiques présentées dans la première partie des résultats. Le premier article a été soumis dans le *International Journal of Antimicrobial Agents* et le second est en cours de finalisation et sera prochainement soumis dans The ISME journal.

- **Un volet fondamental** dont le but était d'étudier les aspects mécanistiques des intégrons de classe 3 qui n'avaient à ce jour pas encore été explorés.

Les travaux du volet fondamental ont été répartis en 2 parties :

**Partie 3 :** L'objectif était de caractériser le(s) promoteur(s) du gène l'intégrase par la recherche du nucléotide (+1) de transcription en employant la technologie de la 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Les expériences ont été effectuées à la fois dans des souches de *E. coli* transformées avec un plasmide portant l'intégron de classe 3 In3-5 et à partir de souches natives hébergeant leur propre intégron de classe 3. Dans les 2 conditions expérimentales, le nucléotide (+1) de transcription du gène *intI3* a été défini et le promoteur du gène de l'intégrase caractérisé.

**Partie 4 :** L'objectif était d'étudier la force des différents variants du promoteur du gène de l'intégrase *intI3* et de ceux des promoteurs Pc des cassettes de gènes. L'évaluation de la force des différents variants des promoteurs Pc et *PintI3* a été effectuée par la mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase à partir de constructions génétiques dans lesquelles l'expression du gène rapporteur *lacZ* était placée sous le contrôle de chaque variant Pc ou *PintI3*.

Les résultats de ce volet fondamental sont présentés en français dans le manuscrit de thèse.

## **Volet épidémiologique**

## **Partie 1**

Caractérisation des intégrons de classe 3 isolés des bactéries  
environnementales en France et au Luxembourg

L'objectif de ce travail était de caractériser des intégrons de classe 3 qui avaient été détectés antérieurement dans l'UMR1092 à partir de souches environnementales isolées en Europe.

Trois bactéries hébergeant des intégrons de classe 3 ont été isolées à partir d'échantillons environnementaux (effluents hospitaliers et boues activées) prélevés en France et au Luxembourg. Après extraction de l'ADN plasmidique et/ ou génomique de ces bactéries, les intégrons de classe 3 ont été détectés par une technique de qPCR décrite précédemment au laboratoire (Barraud *et al* ; 2010). Ensuite, des réactions de PCR et de séquençage à haut débit (NGS) ont permis de caractériser la structure complète de chaque intégron et de déterminer leur support génétique.

Les souches bactériennes *Acinetobacter johnsonii* LIM 75, *Aeromonas allosaccharophila* LIM 82 et *Citrobacter freundii* LIM 86 hébergeaient respectivement les intégrons désignés In3-6, In3-7 et In3-9. Ces derniers avaient pour support génétique un plasmide mobilisable. Le réseau de cassettes de chaque intégron comportait une cassette *bla*<sub>OXA</sub> codant une oxacillinase ; les autres cassettes conféraient des résistances aussi aminoglycosides et aux bêta-lactamines. C'est ainsi que les trois réseaux de cassettes ***aac(6')-Ib-bla*<sub>OXA-10</sub>-*aadA1-like-qacE2-like* ; *bla*<sub>OXA-368</sub>-*aac(6')-Ib'* et *bla*<sub>OXA-2</sub>-*bla*<sub>GES-1</sub>-**GroupeIIc-attCintron**** ont été décrits respectivement chez In3-6, In3-7 et In3-9.

Les travaux ont été présentés à la 111<sup>ième</sup> réunion générale de la Société Américaine de Microbiologie (ASM) en 2011 (Poster 540), au 5<sup>ième</sup> Symposium sur l'Antibiorésistance chez l'Animal et dans l'Environnement (ARAE) en 2013 (Poster 036) et au 25<sup>ième</sup> Congrès Européen sur la Microbiologie Clinique et les Maladies Infectieuses (ECCMID) (e-Poster EV0195) en 2015.

Les résultats de ce travail ont été soumis dans la revue scientifique *International Journal of Antimicrobial Agents*.

# Characterization of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes from hospital sewage and sludge samples in France and Luxembourg

Pierrette Landrie Simo Tchuinte<sup>1,2,3</sup>, Thibault Stalder<sup>1,2,4</sup>, Silvia Venditti<sup>5</sup>, Antoinette Ngandjio<sup>3</sup>, Christophe Dagot<sup>4</sup>, Marie-Cécile Ploy<sup>1,2,6§</sup>, Olivier Barraud<sup>1,2,6,§\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Limoges, UMR-S 1092, F-87000 Limoges, France.

<sup>2</sup>INSERM, U1092, F-87000 Limoges, France.

<sup>3</sup>Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroun.

<sup>4</sup>Université de Limoges, GRESE, EA 4330, F-87000 Limoges, France.

<sup>5</sup>Centre de Ressources des Technologies pour l'Environnement, Esch-Belval, Luxembourg.

<sup>6</sup>CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, F-87000 Limoges, France.

\* Corresponding author.

§ These authors have participated equally to the work.

E-mail: [olivier.barraud@unilim.fr](mailto:olivier.barraud@unilim.fr)

Phone (+1) 33 555 056 165; Fax: (+1) 33 555 056 722

Running title: *class 3 integrons and oxacillinase*

**Key words:** class 3 integron; environment; antimicrobial resistance; oxacillinase; effluent

## SYNOPSIS

**Objectives:** We characterized antibiotic-resistance class 3 integrons and their genetic contents in Gram-negative bacteria isolated from hospital sewage and sludge.

**Methods:** Two samples of hospital effluent from France and Luxembourg and one sample of sludge from a wastewater treatment plant in France were collected in 2010 and 2011. Bacteria were cultured on selective agar plates and integrons were detected in colonies by qPCR. Integron gene cassette arrays and genetic environments were analyzed by Next-Generation Sequencing.

**Results:** Three class 3 integron-positive isolates were detected: *Acinetobacter johnsonii* LIM75 (French hospital effluent), *Aeromonas allosaccharophila* LIM82 (sludge) and *Citrobacter freundii* LIM86 (Luxembourg hospital effluent). The gene cassettes were all implicated in antibiotic (aminoglycoside and  $\beta$ -lactam) or antiseptic resistance. An oxacillinase gene cassette, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-368</sub> or *bla*<sub>OXA-2</sub>, was found in each integron. All the class 3 integrons were located on small mobilizable plasmids.

**Conclusions:** This study highlights the role of class 3 integrons in the dissemination of clinically relevant antibiotic resistance genes, notably oxacillinase genes, in an environmental setting.

## INTRODUCTION

Bacterial resistance is increasing worldwide, in humans, animals and the environment. <sup>1</sup> Integrons are genetic elements involved in the dissemination of antibiotic resistance, mainly among Gram-negative bacteria (GNB). <sup>2</sup> Integrons are defined by three key elements: i) an *intI* gene encoding an integrase ii) an *attI* recombination site recognized by IntI, and iii) a Pc promoter. <sup>3</sup> Integrons are able to capture and express genes contained within mobile gene cassettes. Gene cassettes include a gene expressed *via* Pc and an *attC* recombination site. More than 130 gene cassettes involved in antibiotic resistance have been described. <sup>4</sup> Gene cassettes can be integrated into the integron or excised through a site-specific recombination event catalyzed by IntI. Three main classes of integrons are involved in antibiotic resistance, class 1 being the most frequent. <sup>2</sup> Fewer than ten class 3 integrons have been characterized in GNB of clinical (*Serratia* <sup>5</sup>, *Klebsiella* <sup>6-8</sup> and *Escherichia* <sup>9</sup>) or environmental origin (*Enterobacter* <sup>10</sup> and *Delftia* <sup>11</sup>). Except in *Delftia*, all known class 3 integrons harbor gene cassettes encoding resistance to  $\beta$ -lactams (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>BEL</sub>, *bla*<sub>OXA-256</sub>) and to aminoglycosides (*aac(6')-Ib*).

We recently showed that class 3 integrons were abundant in hospital effluents, but we did not characterize their gene cassette contents. <sup>12</sup> The aim of the present study was to detect and characterize class 3 integrons in hospital sewage and sludge samples. We detected three novel class 3 integrons, all harboring oxacillinase gene cassettes.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Environmental samples and isolation of class 3 integron-positive isolates**

Two hospital effluent samples were collected, in June 2010 (Limoges university hospital center, Limoges, France) and June 2011 (Emile Mayrisch hospital center, Esch-sur-Alzette, Luxembourg), and an activated sludge sample was taken from the Limoges municipal wastewater treatment plant in May 2011. One liter of sludge was centrifuged, and the resulting pellet was resuspended in sterile water. The effluents were vacuum-filtered with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  and bacteria were resuspended in sterile water. Serial dilutions were plated on Luria-Bertani agar plates supplemented with vancomycin (32 mg/L) plus kanamycin (50 mg/L), cefotaxime (16 mg/L) or imipenem (8 mg/L). The plates were incubated at 30°C for 48 hours and isolated colonies were screened for class 1, 2 and 3 integrons by qPCR.<sup>13</sup>

### **DNA extraction and Next-Generation Sequencing (NGS)**

Total DNA was extracted with the QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini kit (Qiagen) and plasmid DNA with the PureYield<sup>™</sup> plasmid Miniprep Purification System (Promega,). NGS was performed with Ion Proton<sup>™</sup> technology (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. The reads were assembled using MIRA (Mimicking Intelligent Read Assembly). Contigs were analyzed with Geneious software (Biomatters). Bacterial identification was based on analysis of the *gyrB*, *rpoB* and 16S RNA-encoding genes.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

Antimicrobial susceptibility was determined by the agar diffusion method as recommended by the French Society for Microbiology. MICs were determined with *Etests* (bioMérieux), following the manufacturer's recommendations.

## Mating and transformation experiments

Plasmid DNA was electroporated into *E. coli* recipient strain DH5- $\alpha$  (Table 1), with selection on LB agar plates containing ampicillin (100 mg/L) or kanamycin (25 mg/L). Mating experiments were conducted in LB broth. *E. coli* DH5- $\alpha$  was used as the recipient strain.

## RESULTS AND DISCUSSION

A qPCR signal for a class 3 integron was detected in three isolates: *Acinetobacter johnsonii* LIM75, *Aeromonas allosaccharophila* LIM82 and *Citrobacter freundii* LIM86, from the French hospital effluent, the French sludge, and the Luxembourg hospital effluent, respectively. LIM86 also harbored a class 1 integron. NGS was used to characterize the gene cassette content and genetic environment of the integrons. The three class 3 integrons were designated In3-6 (from LIM75; LN877969), In3-7 (from LIM82; KT736121) and In3-9 (from LIM86; KT984195) (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

LIM75, LIM82 and LIM86 all expressed acquired resistance to  $\beta$ -lactams and aminoglycosides (Table 1). All the genes found in In3-6, In3-7 and In3-9 were implicated in antibiotic or antiseptic resistance (Figure 1). In3-6 harbored four gene cassettes: *aac(6')-Ib* encoding resistance to tobramycin and amikacin; *bla<sub>OXA-10</sub>* encoding resistance to penicillins; a new variant of *aadAI* (one substitution, Gly78Arg) encoding resistance to streptomycin and spectinomycin; and a *qacE2*-like gene with one substitution (Ala8Val), implicated in resistance to quaternary ammonium compounds. Two gene cassettes were detected in In3-7: a novel *bla<sub>OXA</sub>* variant *bla<sub>OXA-368</sub>* (<http://www.lahey.org/Studies/>) and *aac(6')-Ib'* encoding resistance to tobramycin and gentamicin already described in In3-5.<sup>10</sup> The *bla<sub>OXA-368</sub>* gene is very close to *bla<sub>OXA-74</sub>* (one substitution, Gly149Asp), previously described in a class 1 integron (AJ854182).

In3-9 also contained two gene cassettes: *bla*<sub>OXA-2</sub> previously found in several class 1 integrons,<sup>4</sup> and the ESBL-encoding *bla*<sub>GES-1</sub> previously found in In3-2.<sup>6</sup> Interestingly, an oxacillinase gene cassette was present in each of the three class 3 integrons: *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-368</sub> and *bla*<sub>OXA-2</sub>. Only one other oxacillinase gene cassette, *bla*<sub>OXA-256</sub> had previously been described in a class 3 integron (In3-5).<sup>10</sup> Several other reported class 3 integrons contained only the first 32 bp of *bla*<sub>OXA-10</sub>.<sup>6, 7, 9</sup> The *bla*<sub>OXA</sub> genes are widely distributed in GNB and have frequently been reported as gene cassettes in class 1 integrons retrieved from clinical and environmental bacteria.<sup>4</sup> The *aac(6')Ib*-like gene cassettes, present in In3-6 and In3-7, have been found in all other previously reported class 3 resistance integrons<sup>5, 6, 8, 10</sup> and also in class 1 integrons from hospital effluents.<sup>12</sup> The nature of the gene cassettes found in class 1 and class 3 integrons suggests that gene cassette rearrangements may have occurred between the two classes. Such rearrangements would be facilitated by the richness of the microbiome and resistome in effluents.<sup>14, 15</sup> Furthermore, the biomass in effluents and activated sludge is submitted to stressors, including antibiotic waste.

IntI1 is regulated by the SOS response thanks to a LexA binding site overlapping the *PintII* promoter.<sup>16</sup> It has not been shown experimentally for IntI3 but a LexA binding site is also present within the promoter region. Subinhibitory antibiotic concentrations in hospital effluents could induce the SOS response, leading to continuous IntI expression and, thus, to a high rate of gene cassette rearrangement.<sup>12, 16</sup>

In In3-9, a Group IIC-*attC* intron disrupts the *bla*<sub>GES-1</sub> *attC* site (Figure 1); the same intron also disrupts the *smr-2 attC* site of the class 1 integron present in LIM86 (Figure S1). Group IIC-*attC* introns constitute mobile genetic units inserted into *attC* sites. They have been described in class 1 integrons, and can provide an internal promoter enabling the expression of gene cassettes located downstream.<sup>17</sup> Its role in In3-9 remains unclear, as no gene cassette is present downstream.

Three Pc variants have been previously described in class 3 integrons.<sup>10</sup> A fourth Pc variant was identified in In3-6 (Figure 2). As in class 1 integrons, the four class 3 integron Pc variants might have different strengths.<sup>18</sup> Although the Pc sequence is located within the *intI3* gene, this new variant did not modify the amino-acid sequence of IntI3. Two putative promoters of *intI3* have been identified.<sup>19</sup> *PintI3(2)* is conserved in all known class 3 integrons, whereas variants of *PintI3(1)* have been described (Figure 2). We identified a new *PintI3(1)* variant in In3-7. This variant disrupts the LexA binding site, which would probably lead to higher expression of *intI3* and, consequently, to more frequent gene cassette rearrangements.

Analysis of the genetic environment of In3-6, In3-7 and In3-9 revealed they were all located on small plasmids (8 to 12 kb), designated pULIn3-6, pULIn3-7 and pULIn3-9 respectively (Figure S2). In pULIn3-6, two genes encoding a putative plasmid mobilization protein and a quaternary ammonium transporter are 100% identical to genes described from *Acinetobacter* plasmids (JX101645, CP010903), while two *repAci* genes are >95% identical to genes characterized from other *A. baumannii* plasmids (e.g. NG\_036788). Plasmid pULIn3-7 is very similar to plasmids pASa-1 (AY301063) and pASa-2 (AJ508383) described in *Aeromonas salmonicida*, notably possessing three putative mobilization genes (*mobA*, *mobB* and *mobD*). Plasmid pULIn3-9 is closely related to mobilizable plasmids IncQ pQ7 and pUL3AT,<sup>9, 10</sup> with *repA*, *repC*, *mobA* and *mobC* genes 100% identical to those in pQ7. Transformation assays and mating experiments failed to transfer pULIn3-6 or pULIn3-7 to the *E. coli* recipient strain. It is conceivable that pULIn3-6 and pULIn3-7, found in *Acinetobacter* and *Aeromonas* species respectively, cannot replicate in *E. coli*. However, the sizes of the plasmids, the absence of *tra* genes, and the presence of genes necessary for mobilization suggest that the three plasmids are not self-conjugative but mobilizable.

As pULIn3-9 was found in a member of the *Enterobacteriaceae* (*C. freundii*), we used *E. coli* MFD $\pi$ ir::pULIn3-9 as the donor strain and successfully obtained transconjugants (Table S1) positive for class 3 integron, confirming that pULIn3-9 is a mobilizable plasmid.

Human activities lead to abundant release of integrons and antibiotic resistance gene cassettes into the environment,<sup>14, 20</sup> and class 3 integrons have been found at high concentrations in hospital effluents.<sup>12</sup> In this study, we highlight the role of class 3 integrons in the dissemination of clinically relevant antibiotic resistance genes, notably oxacillinase genes, in an environmental setting. Class 3 integrons have rarely been found in clinical strains but could nonetheless serve as a reservoir of antibiotic resistance genes in the environment.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was presented at the 111<sup>th</sup> General Meeting American Society for Microbiology (ASM), New Orleans, USA, 2011 (Poster 540); at the 5<sup>th</sup> symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), Ghent, Belgium, 2013 (Poster P036); and at the 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark (e-Poster EV0195).

We thank the city and hospital of Limoges and Emile Mayrisch hospital in Luxembourg. We thank the Limoges University Genolim platform for technical and bioinformatic assistance. We thank Brigitte Lamy for precious help in identifying LIM82.

## **FUNDINGS**

This work was supported by grants from Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the European INTEREG program PILLS, and CPAM Haute-Vienne.

Pierrette Landrie SIMO TCHUINTE received financial support from Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

## **TRANSPARENCY DECLARATIONS**

None to declare.

## REFERENCES

1. Gonzalez-Zorn B, Escudero JA. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int Microbiol* 2012; **15**: 101-9.
2. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet* 2010; **44**: 141-66.
3. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995; **15**: 593-600.
4. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E *et al*. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; **33**: 757-84.
5. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K *et al*. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1612-5.
6. Correia M, Boavida F, Grosso F *et al*. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2838-43.
7. Cao X, Xu X, Zhang Z *et al*. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; **13**: 16.
8. Papagiannitsis CC, Dolejska M, Izdebski R *et al*. Characterization of pKP-M1144, a novel ColE1-like plasmid encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 beta-Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 5065-8.
9. Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S *et al*. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1594-8.
10. Barraud O, Casellas M, Dagot C *et al*. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: E306-8.
11. Xu H, Davies J, Miao V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J Bacteriol* 2007; **189**: 6276-83.

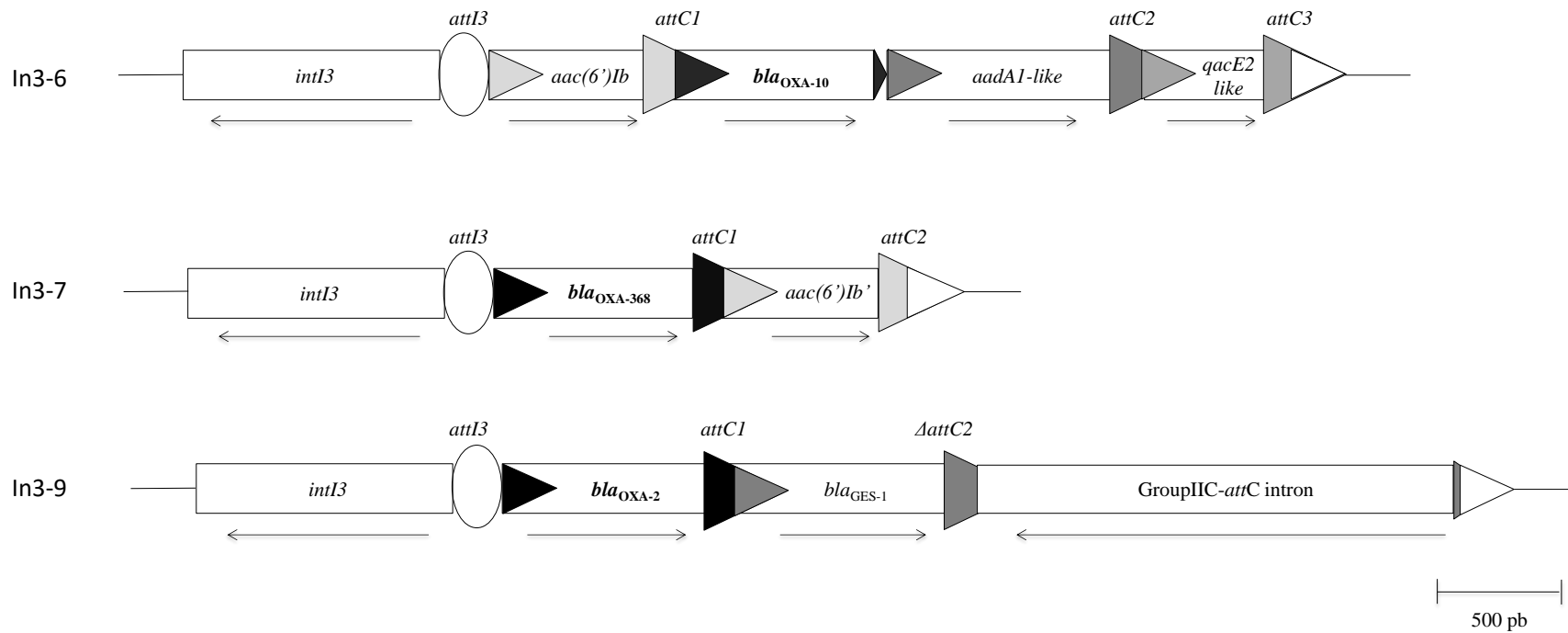
12. Stalder T, Barraud O, Jove T *et al.* Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J* 2014; **8**: 768-77.
13. Barraud O, Baclet MC, Denis F *et al.* Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1642-5.
14. Stalder T, Barraud O, Casellas M *et al.* Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 2012; **3**: 119.
15. Amos GC, Gozzard E, Carter CE *et al.* Validated predictive modelling of the environmental resistome. *ISME J* 2015; **9**: 1467-76.
16. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N *et al.* The SOS response controls integron recombination. *Science* 2009; **324**: 1034.
17. Leon G, Quiroga C, Centron D *et al.* Diversity and strength of internal outward-oriented promoters in Group IIC-*attC* introns. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: 8196-207.
18. Jove T, Da Re S, Denis F *et al.* Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet* 2010; **6**: e1000793.
19. Collis CM, Kim MJ, Partridge SR *et al.* Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 2002; **184**: 3017-26.
20. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J* 2015; **9**: 1269-79.



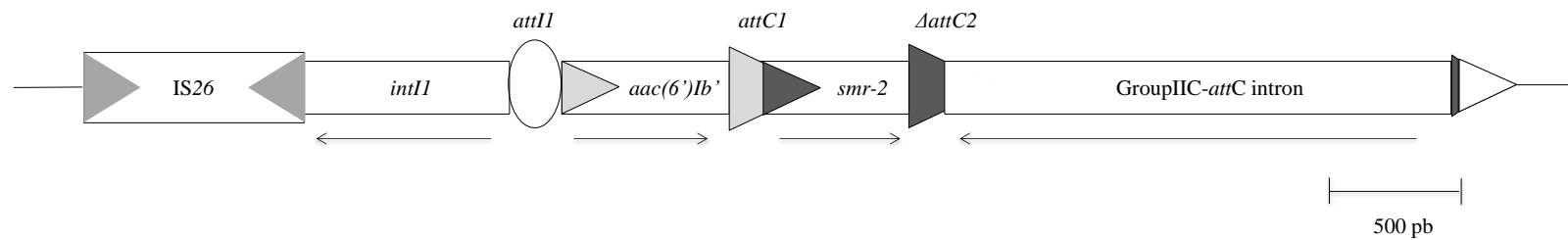
**Table 1: Strains used in this study**

<b>Strain</b>	<b>Genotype or description</b>	<b>Antibiotic resistance</b>	<b>Source</b>
<i>Acinetobacter johnsonii</i> LIM75	Strain with integron In3-6 isolated from hospital effluent (France)	AMX, TIC, CEF, TOB, SPT, STR, KAN	This study
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> LIM82	Strain with integron In3-7 isolated from activated sludge (France)	AMX, TIC, CEF, TOB, STR, KAN	This study
<i>Citrobacter freundii</i> LIM86	Strain with integron In3-9 isolated from hospital effluent (Luxembourg)	AMX, AMC, TIC, CEF, CAZ, CXM, FOX, KAN, TOB, GEN, NAL, OFX, CIP, SSS	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	[F- $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ -thi-1 <i>gyrA96 relA1</i> ].	NAL	Laboratory collection
<i>Escherichia coli</i> MFDpir	MG1655RP4-2-Tc::[ $\Delta$ Mu1::aac(3)IV- $\Delta$ aphA- $\Delta$ nic35- $\Delta$ Mu2::zeo] $\Delta$ dapA::(erm-pir) $\Delta$ recA.	APRA, ERM, ZEO	Gift from JM Ghigo (Pasteur Institute, Paris)
<i>Escherichia coli</i> MFDpir::pULIn3-9	<i>Escherichia coli</i> MFDpir transformed with plasmid pULIn3-9. Donor strain used for mating experiments	APRA, ERM, ZEO, AMX, TIC, AMC	This study

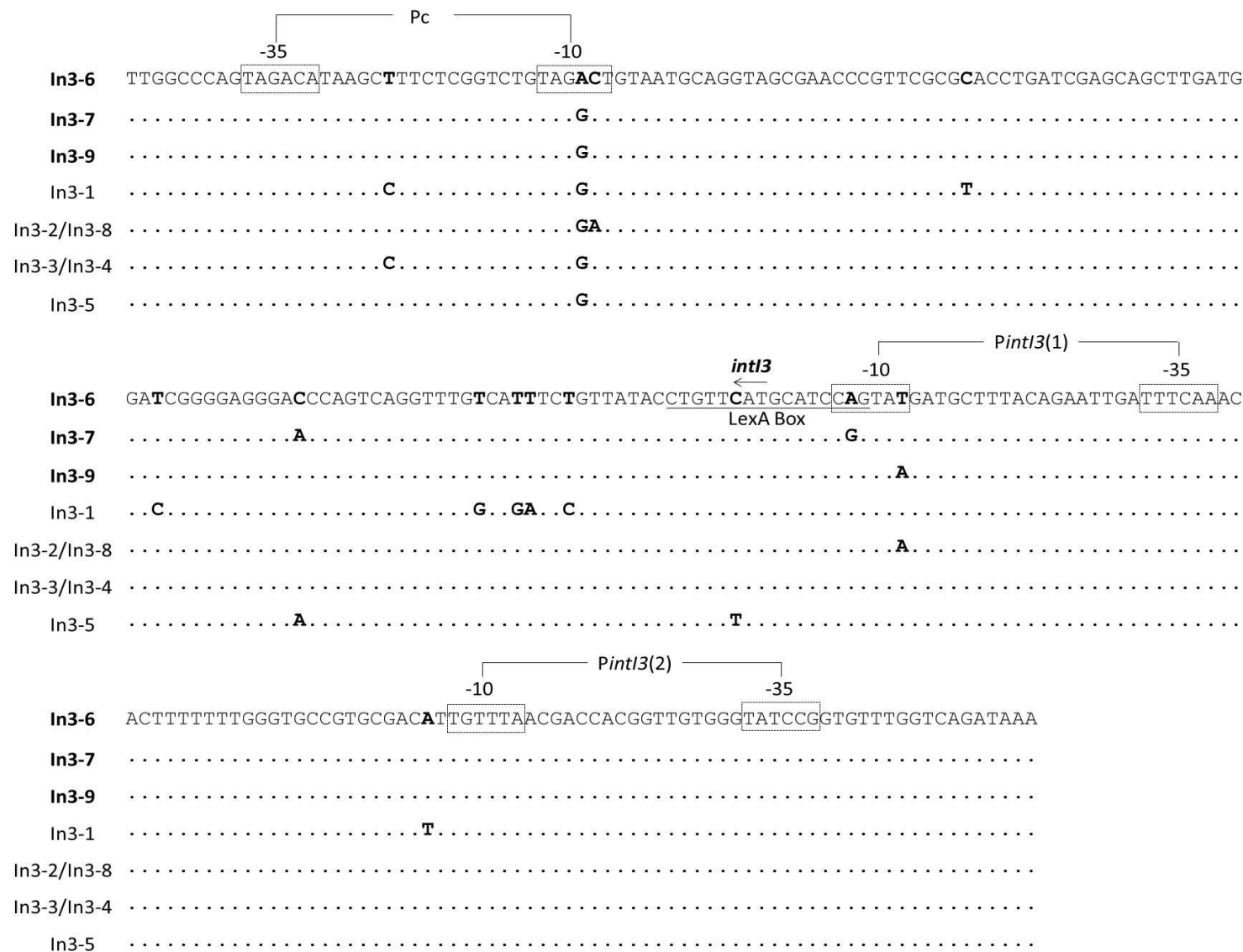
AMX: Amoxicillin, AMC: Amoxicillin-clavulanic acid, TIC: Ticarcillin, CEF: Cefalotin, CAZ: Ceftazidime, CXM: Cefuroxim, FOX: Cefoxitin, KAN: Kanamycin, TOB: Tobramycin, GEN: Gentamicin, SPT: Spectinomycin, STR: Streptomycin, NAL: Nalidixic acid, OFX: Ofloxacin, CIP: Ciprofloxacin, SSS: Sulfamethoxazole, APRA: Apramycin, ERM: Erythromycin, ZEO: Zeomycin.



**Figure 1:** Physical map of class 3 integrons In3-6, In3-7 and In3-9. Arrows represent the coding sequences of the integrase gene and gene cassettes. The recombination sites *attI1*, *attC1*, *attC2*,  $\Delta attC2$  and *attC3* are represented by triangles; the GroupIIC-*attC* intron is represented by a rectangle. Integrase gene: *intI3*;  $\beta$ -lactam resistance genes: *bla<sub>OXA-10</sub>*, *bla<sub>OXA-368</sub>*, *bla<sub>OXA-2</sub>*, *bla<sub>GES-1</sub>*; aminoglycoside resistance genes: *acc(6')Ib*, *acc(6')Ib'*, *aadA1*; quaternary ammonium compound resistance gene: *qacE2*.



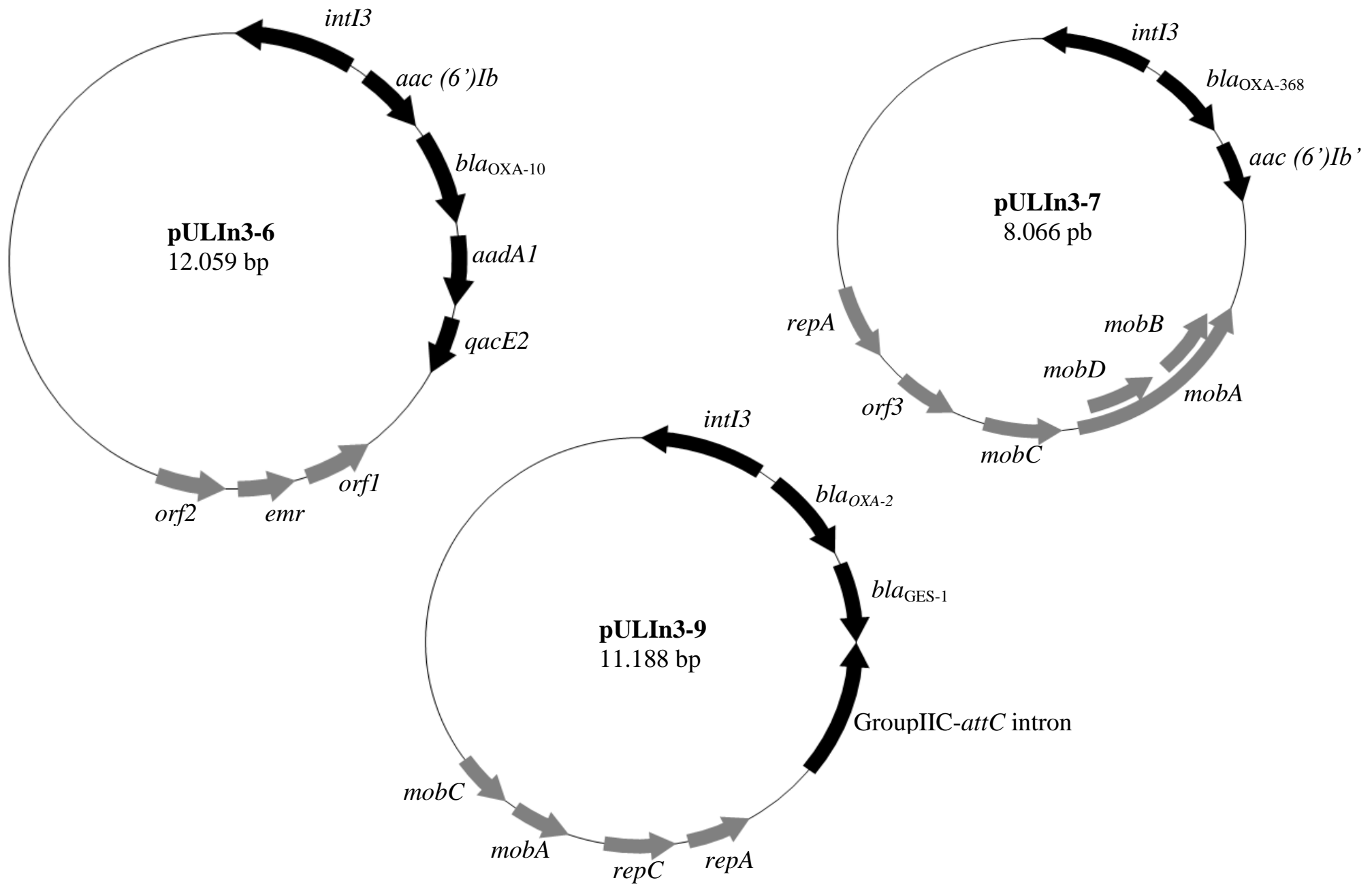
**Figure S1:** Physical map of the class 1 integron from *C. freundii* LIM86. Thin arrows represent the coding sequences of the *aac(6')Ib'* and *smr-2* genes. The full dashed arrow indicates the *intI1* gene coding sequence disrupted by IS26. The recombination sites *attI1*, *attC1* and *attC2* are represented by triangles; *aac(6')Ib* encodes resistance to aminoglycosides, and *smr-2* resistance to quaternary ammonium compounds.



**Figure 2:** Partial sequences of In3-6, In3-7 and In3-9, from Pc to *PintI3(2)*, and alignment with other class 3 integrons. The -35 and -10 regions of Pc and of the two putative promoters *PintI3(1)* and *PintI3(2)*<sup>19</sup> are boxed. The potential start codon of *IntI3* is represented by an arrow. The sequence of the LexA box is underlined. Letters in bold indicate mutations. In3-1: AF416297 from *Serratia marcescens*; In3-2: AY219651 from *Klebsiella pneumoniae*; In3-3: EF469602 from *Delftia tsuruhatensis*; In3-4: EF467651 from *Delftia acidovorans*; In3-5: HE616889 from *Enterobacter cloacae*. In3-8: KF745070 from *Klebsiella pneumoniae*.

Table S1: MICs (mg/L) of antibiotics for *E. coli* DH5 $\alpha$  and *E. coli* DH5 $\alpha$ ::pULIn3-9

Antibiotics	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ::pULIn3-9
Amoxicillin	3	>256
Amoxicillin-clavulanic acid	3	8
Piperacillin-tazobactam	0.75	1
Cefotaxime	0.032	0.19
Ceftazidime	0.125	3



**Figure S2:** Genetic map of pULIn3-6, pULIn3-7 and pULIn3-9. Arrows show the direction of transcription of open reading frames and regulatory elements. The structure of In3-7, In3-8 and In3-9 is represented in dark, with regulatory elements in gray. The *intI3* gene encodes the integrase IntI3; *aac(6')Ib*, *bla<sub>OXA-10</sub>*, *aadA1*, *qacE2*, *aac(6')Ib'*, *bla<sub>OXA-368</sub>*, *bla<sub>OXA-2</sub>*, *bla<sub>GES-1</sub>* are antibiotic resistance genes; *repA*, *repC* replicase genes; *mobA*, *mobB*, *mobC*, *mobD* mobilization genes; *emr* encodes resistance to quaternary ammonium compounds; *orf1* encodes a putative mobilization gene; *orf2* and *orf3* encode hypothetical proteins.

## **Partie 2**

Etude épidémiologique des intégrons de classe 3 au Cameroun :

Cas des villes de Douala et Yaoundé

L'objectif de ce travail était de rechercher des intégrons de classe 3 à partir d'échantillons environnementaux africains et de les caractériser. Des prélèvements ont été faits en 2014 et 2015 dans les 2 plus grandes villes du Cameroun (Yaoundé et Douala), et analysés au Laboratoire d'Hygiène et Environnement du CPC et au laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'UMR 1092 à Limoges.

Nous avons par la technique de qPCR, détecté 3 bactéries appartenant au genre *Delftia* hébergeant un intégron de classe 3 ; 2 ayant été isolées d'un même échantillon d'effluent hospitalier prélevé à Douala et la troisième d'un effluent hospitalier originaire de Yaoundé. Par la même technique, une analyse antérieure effectuée au laboratoire a permis d'isoler à partir d'effluents hospitaliers et de boues activées prélevés en France et en Allemagne 4 autres isolats de *Delftia* hébergeant un intégron de classe 3. Après séquençage du gène codant l'ARNr 16S, nous avons réussi à identifier 2 souches de *D. acidovorans* et 5 souches de *D. tsuruhatensis* portant ainsi à 7 le nombre total de souches de *Delftia* hébergeant un intégron de classe 3. Parmi ces souches, 5, toutes isolées d'effluents hospitaliers, hébergeaient aussi un intégron de classe 1.

La caractérisation de la structure complète de ces 7 intégrons de classe 3 a révélé que les réseaux de cassettes étaient identiques à ceux précédemment décrits chez 2 souches environnementales de *Delftia* (*D. acidovorans* et *D. tsuruhatensis*) isolées en Amérique du Nord (Xu *et al* ; 2007). Les deux réseaux *orfA-orfC/orfD-orfE* et *orfA-orfB-orfC/orfD-orfE* dont les gènes codent des fonctions inconnues ont été décrits. Les cassettes décrites au sein des intégrons de classe 1 sont toutes impliquées dans la résistance aux antibiotiques.

L'analyse de l'environnement génétique a montré que les 7 intégrons de classe 3 sont situés sur le chromosome bactérien.

Nos résultats et ceux précédemment obtenus en Amérique pourraient laisser penser que les bactéries appartenant au genre *Delftia* seraient peut-être des réservoirs naturels d'intégrons de classe 3 dans l'environnement.



Cette étude permet d'identifier des intégrons de résistance en Afrique. Ce travail vient donc compléter les quelques travaux épidémiologiques sur l'antibiorésistance en Afrique et permet d'enrichir les données sur la dissémination de la résistance dans cette partie du monde.

## ***Delftia*, environmental reservoirs of class 3 integrons?**

Pierrette Landrie Simo Tchuinte<sup>1,2,3</sup>, Antoinette Ngandjio<sup>3</sup>, Thibault Stalder<sup>1,2,4</sup>, Magali Casellas<sup>4</sup>,  
Christophe Dagot<sup>4</sup>, Olivier Barraud<sup>1,2,5,§</sup>, Marie-Cécile Ploy<sup>1,2,5,§,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Limoges, UMR-S 1092, F-87000 Limoges, France.

<sup>2</sup>INSERM, U1092, F-87000 Limoges, France.

<sup>3</sup>Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroun.

<sup>4</sup>Université de Limoges, GRESE, EA 4330, F-87000 Limoges, France.

<sup>5</sup>CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, F-87042 Limoges, France.

\* Corresponding author.

§ These authors participated equally to the work

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

Phone (+1) 33 555 056 727; Fax: (+1) 33 555 056 722

Key words: class 3 integron; *Delftia*; environment; Wastewater treatment plant; hospital effluent

## **Abstract**

The role of the environment in the dissemination of antibiotic resistance is a relevant issue in the context of the worldwide emergence of multidrug resistance in humans and animals. Horizontal gene transfer of mobile genetic elements may involve various bacteria from different ecosystems. Integrons play a major role in antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Besides class 1 integrons that were largely described in clinics, the role and origin of class 3 integrons is still unknown. Only few class 3 integrons with antibiotic resistance gene cassettes were described. In this study, we described 7 class 3 integron-positive *Delftia* strains from hospital effluents and activated sludges in Europe and Africa. These chromosomal integrons were highly similar to those previously described from *Delftia* strains isolated in North America, suggesting that integron acquisition was an ancient event. Our study suggests that *Delftia* could be the reservoir of class 3 integrons in the environmental setting.

*Delftia* are ubiquitous Gram-negative bacteria (GNB) retrieved from the environment (soil, water, infected plants, activated sludge...) and have been described in Europe, Asia and America (Wen et al 1999). Two main species are described: *Delftia acidovorans* and *D. tsuruhatensis*. Integrons are bacterial genetic elements able to capture and express genes embedded within gene cassettes (Stokes and Hall 1989). They are defined by three components: an integrase gene (*intI*); a recombination site (*attI*) and a Pc promoter. Gene cassettes are composed of an open reading frame and an *attC* recombination site. The integrase catalyzes recombination between *attI* and *attC* sites, allowing excision or insertion of gene cassettes within the integron (Collis and Hall 1992, Collis et al 1993). Three main classes of integrons are involved in the dissemination of antibiotic resistance. Current knowledge on class 3 integrons is still scarce with less than ten fully described. They were found in clinical and environmental isolates of *Delftia*, *Nocardia* or *Enterobacteriaceae* (Arakawa et al 1995, Barraud et al 2013, Correia et al 2003, Papagiannitsis et al 2015, Poirel et al 2010, Valdezate et al 2015, Xu et al 2007). Most contained gene cassettes encoding resistance to antibiotics used in clinical settings and previously found in class1 integrons. Recent metagenomics approaches suggested that class 3 integrons are highly frequent in aquatic environment (Moura et al 2010, Stalder et al 2014, Uyaguari et al 2013) suggesting that these integrons may acquire antibiotic resistance gene cassettes from clinical class 1 integrons and might play a significant role in antibiotic resistance dissemination in the environment. However, the environmental bacteria allowing class 3 integrons dissemination have not been precisely identified.

Our aim was to characterize class 3 integron-containing isolates from environmental samples collected in Europe and Central Africa. We isolated seven *Delftia* isolates, all harboring the same class 3 integron in their chromosome.

Four hospital effluents and two activated sludges were collected from 2010 to 2015 in Germany, Cameroon and France.

Each sample was serially diluted in sterile water before inoculation on selective Luria Bertani (LB) agar plates supplemented with vancomycin (32mg/L) + kanamycin (50mg/L), vancomycin (32mg/L) + cefotaxime (16mg/L) and vancomycin (32mg/L) + imipenem (8mg/L). Plates were incubated overnight at 30°C for 48 hours and isolated colonies were screened by qPCR for class 1, 2 and 3 integrons, as previously described (Barraud et al 2010). Next-Generation Sequencing (NGS) was performed on the class 3 integron-positive isolates using the Ion Proton™ technology (Life Technologies, Carlsbad, USA). The reads were assembled using MIRA (Mimicking Intelligent Read Assembly). Contigs were analyzed with Geneious software (Biomatters).

We isolated seven class 3 integron-positive isolates: two from the activated sludge samples from France (F1, F2) and five from the hospital effluents from Cameroon (C1, C2, C3), Germany (G1) and France (F3) (Table 1). All the class 3 integron-containing isolates belonged to the *Delftia* genus (Figure 1). These class 3 integrons contained the same gene cassette array as in In3-3 and In3-4, two class 3 integrons previously described also from *Delftia* strains (Xu et al 2007). These seven integrons contained either three or four gene cassettes encoding unknown functions (Figure 2), i.e. *orfA*, *orfC/D* and *orfE* (In3-3), or *orfA*, *orfB*, *orfC/D* and *orfE* (In3-4). The *intI3* gene, Pc promoter and *attI3* sites had identical sequences except for integron G1 where one substitution in *intI3* generated a stop codon leading to a likely non-functional protein of 108 amino acids. Integrons from isolates F2 and F3 had respectively one mutation in the ORFA protein (A73S) and in the *attC* site of *orfC/D*. The conservation of the gene cassette array, with gene cassettes encoding for proteins with unknown function, is a remaining question. One can hypothesize that these gene cassettes play a role in adaptive functions for *Delftia* sp.

Flanking sequences of the class 3 integrons are similar for all *Delftia* strains (Figure 2) with class 3 integrons always located between the *lf4* and *ia1* genes, as previously observed by Xu (Xu et al 2007). The *lf4* gene encodes a hypothetical protein and the *ia1* gene encodes a putative integrase/recombinase. However, the *lf* and *ia* genes are not present in the genome of the 2 sequenced *Delftia* strains that do not contain a class 3 integron (NC\_015563, NC\_010002). These genes have strong similarities to genes described in the genome of *Acidovorax* sp strains JS42 and MUL2G8 (Xu et al 2007). The analysis of the 16S-RNA encoding genes showed that *Acidovorax* and *Delftia* are phylogenetically close (Figure 1). The *ia2*, *ia3* and *ia4* genes encoding respectively a putative transcriptional regulator, a small multidrug resistance protein and a phage P4-type tyrosine recombinase were also present, but not in all strains (Figure 2). For F1, F2 and C3, *Delftia* chromosomal genes *rf1* to *rf5* (*rf4* encoding the DNA gyrase A subunit) were found downstream the *ia* genes. For the other strains, we found other genes than *rf* genes, encoding transcriptional regulators or proteins of unknown function. Our results confirm the hypothesis by Xu: this highly conserved genetic organization suggests that the acquisition of a class 3 integron is likely an ancient event in a genetic island coming from *Acidovorax*. Then, bacterial clonal spread might lead to class 3 integron dissemination.

In our study, 5 *Delftia* strains harboured also class 1 integrons (Table S1). All these class 1 integron-positive *Delftia* strains were isolated from hospital effluents and all contained gene cassettes encoding antibiotic or antiseptic resistance. Class 1 integrons harboring antibiotic resistance genes have been previously isolated in one clinical *D. tsuruhatensis* (KC170993) and two environmental *D. acidovorans* (KM278186; KM401410). The simultaneous presence of class 1 and 3 integrons would favor the capture by class 3 integrons of gene cassettes involved in antibiotic resistance, as previously described with In3-5 isolated from an environmental *Enterobacter cloacae* (Barraud et al 2013). Both class 1 and 3 integrases are able to recognize *attC* sites (Collis et al 2002a, Collis et al 2002b) allowing gene cassettes exchanges between class 1 and class 3 integrons.

The *orfB* gene cassette present in In3-4 was also found in a class 1 integron from a *Pseudomonas* strain recovered from prawns (Sajjad et al 2011). Recent studies demonstrated that integrons and more specifically class 1 integrons from clinical or environmental origin are highly frequent in effluents and wastewater treatment plants (Gillings 2014, Stalder et al 2014). This coexistence of class 1 and class 3 integrons allows acquisition of gene cassettes encoding resistance to antibiotics used in clinics by environmental bacteria and then dissemination within the environment.

We described here seven class 3 integrons from *Delftia* isolates retrieved from three different countries (France, Germany and Cameroon). The class 3 integrons were identical to integrons previously found in *Delftia* from the American continent. This description of common class 3 integrons from *Delftia*, which is a ubiquitous bacterium in the environment, suggests that *Delftia* could be one of the environmental reservoirs of class 3 integrons.

## **Acknowledgements**

This work was presented in 2015 at the 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark (Poster 2567).

We thank the city and hospital of Limoges, the Generale and Brazzaville hospital's of Cameroon. We thank the Genolim platform of Limoges University for technical and bioinformatic help in NGS.

## **Fundings**

This work was supported by grants from Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and the European INTEREG program PILLS.

Pierrette Landrie SIMO TCHUINTE received financial support from Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

## **Transparency declarations**

None to declare.



## References

- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S *et al* (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1612-1615.
- Barraud O, Baclet MC, Denis F, Ploy MC (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother* **65**: 1642-1645.
- Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC (2013). An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin Microbiol Infect* **19**: E306-308.
- Collis CM, Hall RM (1992). Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* **174**: 1574-1585.
- Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* **9**: 41-52.
- Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM (2002a). Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* **184**: 3017-3026.
- Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM (2002b). Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a *59-be* site. *Mol Microbiol* **46**: 1415-1427.
- Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM *et al* (2003). Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2838-2843.
- Gillings MR (2014). Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**: 257-277.
- Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol* **161**: 58-66.

Papagiannitsis CC, Dolejska M, Izdebski R, Dobiasova H, Studentova V, Esteves FJ *et al* (2015). Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 beta-Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 5065-5068.

Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Bruderer T, Frei R, Nordmann P (2010). A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **65**: 1594-1598.

Sajjad A, Holley MP, Labbate M, Stokes HW, Gillings MR (2011). Preclinical class 1 integron with a complete Tn402-like transposition module. *Appl Environ Microbiol* **77**: 335-337.

Stalder T, Barraud O, Jove T, Casellas M, Gaschet M, Dagot C *et al* (2014). Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J* **8**: 768-777.

Stokes HW, Hall RM (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **3**: 1669-1683.

Uyaguari MI, Scott GI, Norman RS (2013). Abundance of class 1-3 integrons in South Carolina estuarine ecosystems under high and low levels of anthropogenic influence. *Mar Pollut Bull* **76**: 77-84.

Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Villalon P, Medina-Pascual MJ, Saez-Nieto JA (2015). Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains. *Front Microbiol* **6**: 376.

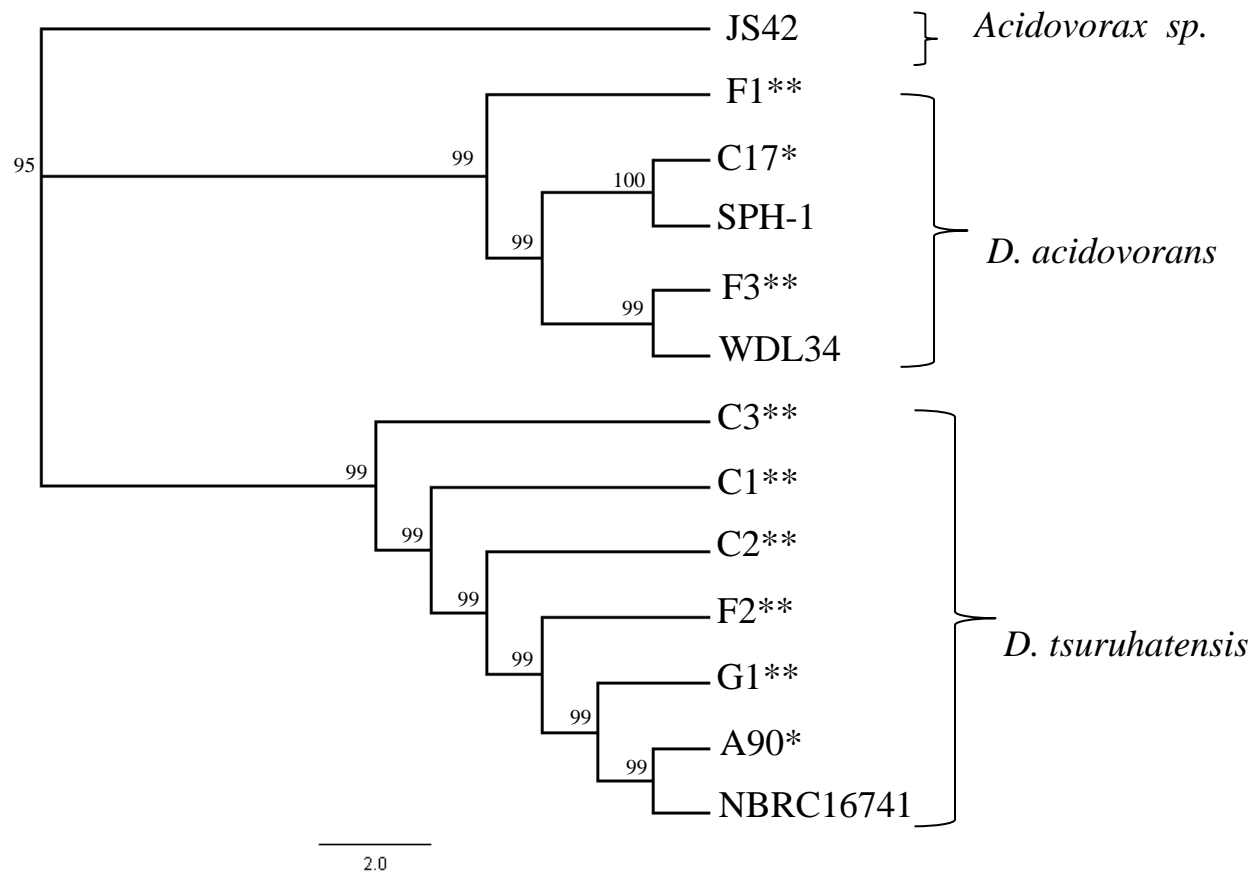
Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI (1999). Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 567-576.

Xu H, Davies J, Miao V (2007). Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J Bacteriol* **189**: 6276-6283.

Table 1: Features of the samples and strains used in this study.

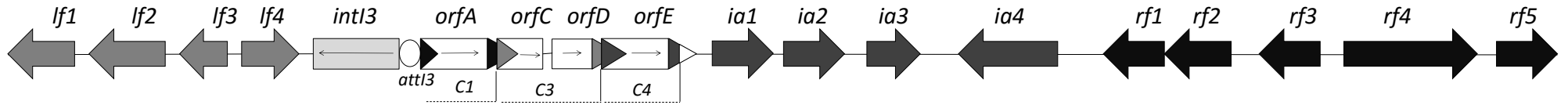
WWTP: Wastewater treatment plant

Samples	Origin	Strains	Year
Activated sludge	Municipal WWTP Limoges (France)	<i>D. acidovorans</i> (F1)	2010
	Municipal WWTP Limoges (France)	<i>D. tsuruhatensis</i> (F2)	2011
Hospital effluent	Hospital effluent (Germany)	<i>D. tsuruhatensis</i> (G1)	2012
	Hospital effluent Yaounde (Cameroon)	<i>D. tsuruhatensis</i> (C1)	2014
		<i>D. tsuruhatensis</i> (C2)	
	Hospital effluent Annemasse (France)	<i>D. acidovorans</i> (F3)	2014
Hospital effluent Douala (Cameroon)	<i>D. tsuruhatensis</i> (C3)	2015	

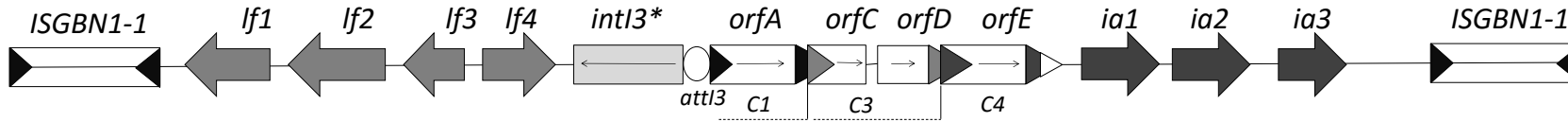


**Figure 1:** Phylogenetic tree of 16S RNA encoding gene of *Delftia* isolates. Class 3-integron positive *Delftia* isolates described in this study are indicated with two asterisks and those described by Xu *et al.*; (2007) by one asterisk. Sequences of C1, C2, C3, F2 and G1 are 99.9% identical to that described for *D. tsuruhatensis* A90 and NBRC16741; F1 and F3 are 99.9% identical to C17. Sequences of F1-F3 and that of C1, C2, C3, F2 and G1 are 99.8% identical. Assembly was performed with 1401 nucleotides and dendrogram construction (neighbor-joining method, default parameters) was done with Geneious software (version 7.0.1). The accession numbers of *Acidovorax sp.* JS42; *D. acidovorans* C17; *D. acidovorans* SPH-1; *D. acidovorans* WDL34; *D. tsuruhatensis* A90; *D. tsuruhatensis* NBRC16741 are available to AASD01000022; EF421404; AB021417; AF538930; EF421407 and AB075017 respectively.

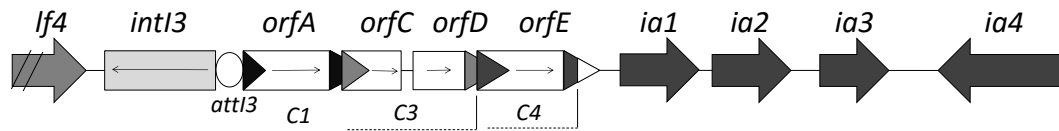
***D. acidovorans* F1 and *D. tsuruhatensis***



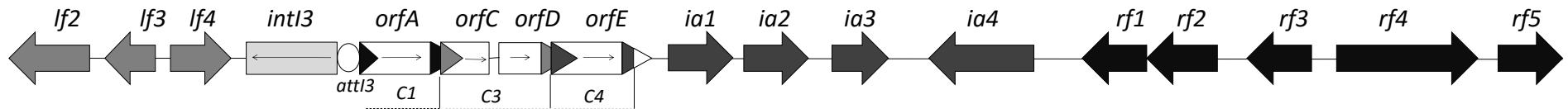
***D. tsuruhatensis* G1**



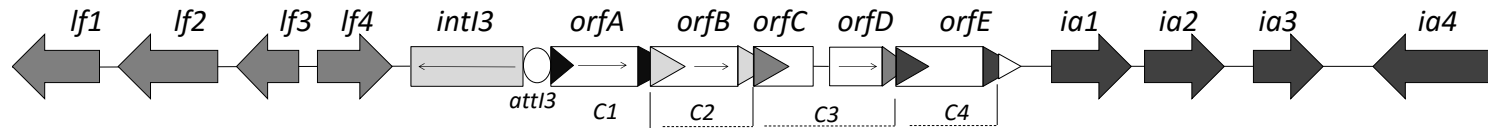
***D. tsuruhatensis* C2**



***D. tsuruhatensis* C3**



***D. tsuruhatensis* C1**



***D. acidovorans* F3**

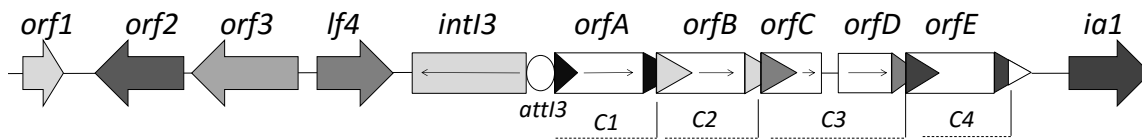


Figure 2: Structures of the seven *Delftia* class 3 integrons with flanking chromosomal regions.

Arrows represent coding sequences of integrase gene and gene cassettes. The *attC* recombination sites are represented by triangles. Black and dark grey arrows represent common flanking genes with class 3 integrons In3-3 and In3-4 (Xu *et al.*; (2007)). The genes *orf1*, *orf2* and *orf3* are highly similar to those described in genome of *D. acidovorans* SPH-1 (CP000884), they encode for a conserved hypothetical protein, one hypothetical protein and a phage antirepressor protein respectively. The *orf4* gene encoding for protein with unknown function is very similar (99.6% identity) with that described in plasmid pU01 retrieved from *D. acidovorans* (AB063332). For *D. tsuruhatensis* C2, *ia4* gene is truncated. The ISGNB1-1 is inserted sequence identical to that described on uncultured bacterium plasmid pGNB1 (EF628291).

Table S1: *Delftia* strains, origin and gene cassettes array of class 1 integrons.

Species	Strains	Origin	Gene cassette arrays of class 1 integrons
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	G1	Germany	<i>bla<sub>OXA</sub>-aacA4'8</i>
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	C1	Cameroon	<i>aadB; aadA1</i>
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	C2	Cameroon	<i>ereA; dfrA1-aadA2; aadB-PSE1-aadA2</i>
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	C3	Cameroon	<i>dfrA1-aadA2; aadB</i>
<i>Delftia acidovorans</i>	F3	France	<i>qacG</i>

# **Volet fondamental**

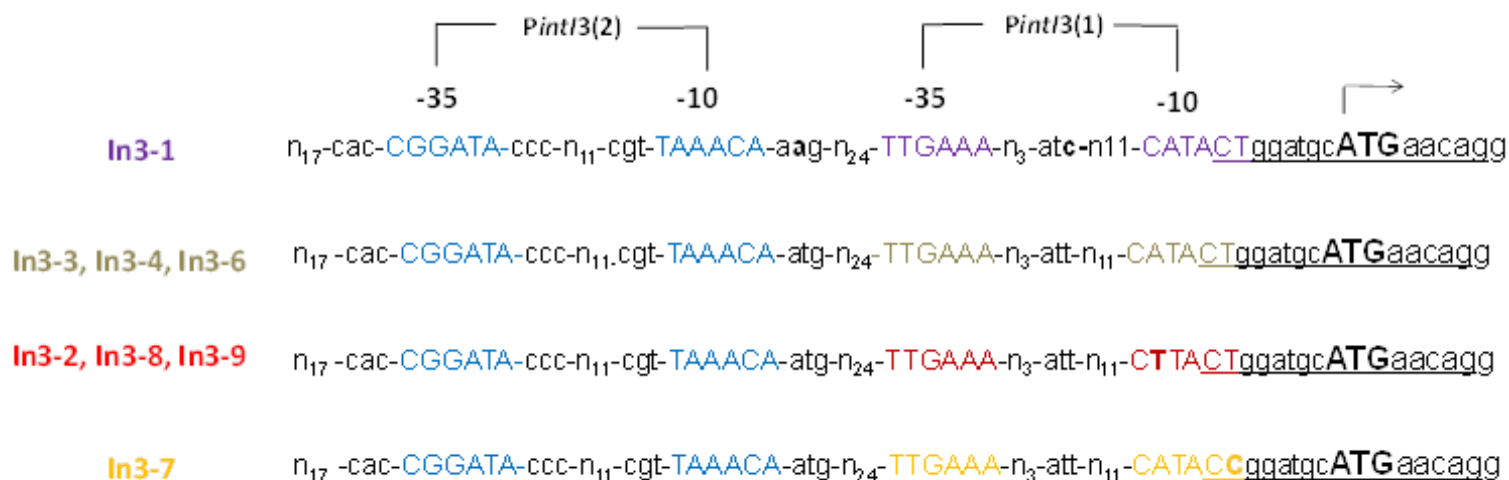


## **Partie 3**

Caractérisation du promoteur du gène *intI3*

Depuis la découverte du premier IR3 en 1995 par Arakawa, de nombreuses études ont été réalisées enfin de mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement de cette nouvelle classe d'IR. La description de cet élément génétique a permis de noter la présence d'un gène *intI3* situé en amont de la région variable composée de cassettes de résistance aux antibiotiques. La présence de ces dernières laisse envisager l'existence d'une intégrase fonctionnelle. En effet, les premiers essais effectués par Hall et ses collaborateurs (Hall *et al* ; 1999) ont permis de confirmer la fonctionnalité de l'intégrase IntI3 de cet intégron. Par la suite, les résultats obtenus par la même équipe ont confirmé leurs résultats précédents (Collis *et al* ; 2002). L'intégrase IntI3 est capable de catalyser l'intégration et/ou l'excision de cassettes au sein d'un intégron. Ces mêmes auteurs ont proposé l'existence de 2 promoteurs putatifs *PintI3(1)* et *PintI3(2)* susceptibles d'assurer l'expression du gène *intI3*.

Le but de ce travail était de caractériser expérimentalement le promoteur du gène de l'intégrase. L'analyse *in silico* des 9 IR3 décrits jusqu'à présent nous a permis de confirmer la présence de ces 2 séquences. De plus, nous avons identifié une boîte *LexA* chevauchant *PintI3(1)* (Figure 10). *PintI3(2)* ne comporte qu'un seul variant alors que 4 variants existent pour *PintI3(1)*.



**Figure 10** : Alignement des séquences promotrices montrant les 2 promoteurs putatifs *PintI3*(1) et *PintI3*(2) de l'intégrase *intI3*.

La flèche indique le codon START putatif d'IntI3 et la séquence de la boîte LexA est soulignée. L'alignement a été réalisé avec les IR3 : In3-1, In3-2, In3-3, In3-4, In3-6, In3-7, In3-8 et In3-9. L'intégron In3-5 possède la même séquence promotrice que In3-346 mais, la boîte LexA présente une mutation dans le codon start (ATA et non ATG). La séquence du site LexA est souligné.

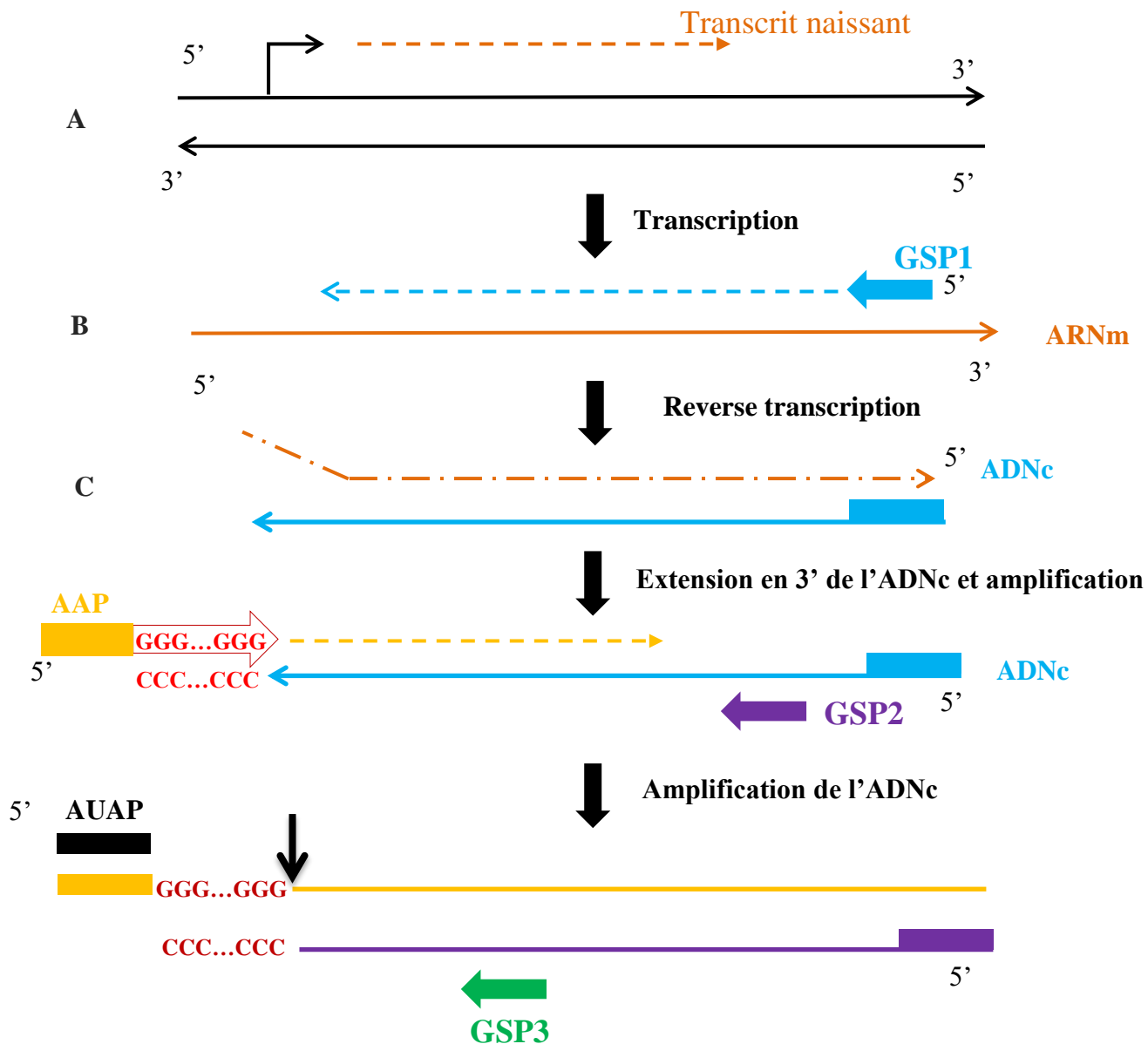
Nous avons recherché le (+1) de transcription de ce gène en employant la technologie de 5'RACE. Les expériences ont été menées premièrement dans les souches de *E. coli* MG1656 et *E. coli* MG1656 $\Delta$ *Lex A* contenant le plasmide pUL3AT qui héberge l'intégron In3-5. Par la suite, nous avons réalisé les mêmes essais à partir de souches natives isolées au laboratoire et hébergeant 1 IR3.

## **Matériel et Méthodes**

Nous avons utilisé la méthodologie de 5'RACE avec le kit 5'RACE System version 2.0 d'Invitrogen (Cergy-Pontoise, France).

### **1- Principe général de la 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)**

La 5'RACE est une technique qui permet l'isolation et la caractérisation du (+1) d'initiation de la transcription d'un promoteur *via* le séquençage de l'extrémité 5' de l'ARNm correspondant. La première étape qui fait appel à une rétrotranscriptase consiste à synthétiser à l'aide d'une amorce anti-sens (GSP1) un ADNc spécifique du gène d'intérêt, qui comprend en son extrémité 3' la base correspondant au (+1) de transcription (Figure 11). Après un traitement chimique qui détruit l'ARNm et une réaction enzymatique qui permet d'ajouter une série de bases C (queue polyC) à l'extrémité 3' de l'ADNc, une première réaction d'amplification de cet ADNc utilisant les amorces AAP et GSP2 est réalisée. Par la suite, les produits d'amplification obtenus servent de matrice pour une seconde amplification interne (PCR nichée) réalisée avec les amorces AUAP et GSP3. Enfin, le séquençage des amplicons permet de déterminer la première base transcrite en ARNm qui représente celle qui précède immédiatement la série des 17 bases de Cytosine de la molécule (Figure 11).

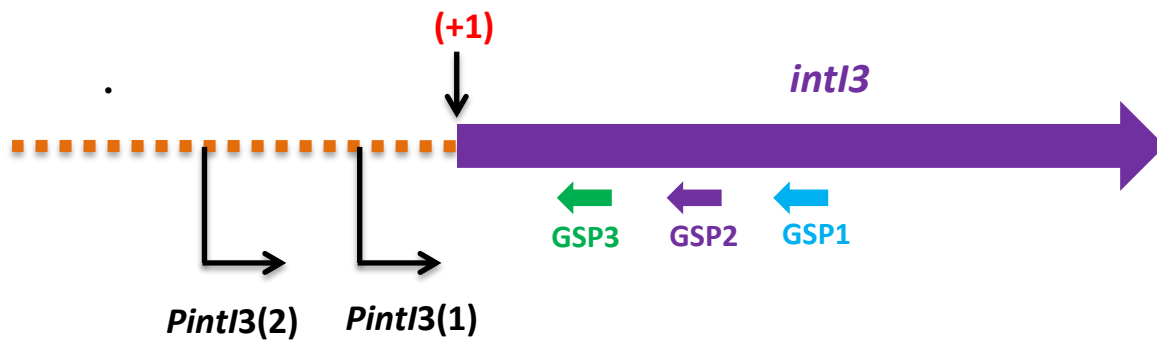


**Figure 11:** Principe de la 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5'RACE)

La séquence d'ADN qui suit le promoteur est représentée par 2 traits horizontaux noirs (A). L'ARNm messager (trait orange) est synthétisé par transcription d'un des brins d'ADN sous l'action de l'ARN polymérase cellulaire à partir du (+1) de transcription (B). La reverse transcription de l'ARNm synthétisé à l'aide d'une amorce spécifique GSP1 (C) conduit à la formation de l'ADN complémentaire (ADNc) en bleu. Au cours de cette rétrotranscription, les ARN restants (traits interrompus oranges) sont dégradés par traitement enzymatique avec un mix de RNAses. Les ADNc synthétisés sont étendus en 3' par une série de bases de cytosine C (en rouge) qui servent par la suite de pont d'ancrage pour l'amorce AAP fournie par le Kit. La molécule d'ADNc est ensuite amplifiée par les amorces AAP (jaune) / GSP2 (violet) et AUAP (noire) / GSP3 (vert) ; la molécule matrice nécessaire pour l'amplification est le simple brin obtenu par l'amorce AAP et l'amorce GSP2 s'hybride après synthèse des premières molécules d'ADN double brin. La position exacte du (+1) de transcription (flèche verticale noire) peut-être déterminée par séquençage du produit de PCR issu de cette amplification. *GSP* : Gene Specific Primer, *AUAP* : Abridged Universal Amplification Primer. *AAP* : Abridged Anchor Primer

## 2.1- Choix des amorces

Les amorces spécifiques GSP1, GSP2 et GSP3 nécessaires pour les différentes étapes de la manipulation ont été dessinées grâce au logiciel Geneious version 7.0.1. Les amorces AAP et AUAP ont été fournies par le kit (Tableau 9).



**Figure12 :** Disposition des amorces GSP1, GSP2 et GSP3 utilisées.

Les amorces GSP1 (bleu), GSP2 (violet) et GSP3 (vert) sont représentées sur le gène *intI3* (flèche violette). Les 2 promoteurs putatifs *PintI3(1)* et *PintI3(2)* sont marqués par des flèches noires. Le (+1) de transcription en rouge est indiqué par une flèche noire.

Amorces	Séquences (5' → 3')
GSP1	5'-AACCCACTGCCGTA AAA-3'
GSP2	5'-GGCGAGCATGGTCAGAAAAC-3'
GSP3	5'-CGACCGTTCAGCTGGATATTAC-3'
AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3'
AUAP	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

**Tableau 8:** Séquences des amorces utilisées au cours de ce travail.

## 2.2- Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées au cours cette expérience sont décrites dans le tableau 9. Les premières expériences ont été effectuées avec les souches de *E. coli* obtenues après transformation du plasmide pUL3AT hébergeant In3-5. L'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée à l'aide du kit Pureyield™ Plasmid MiniPrep System (Promega, Madison). Comme chez les intégrons de classe 1, la boîte LexA chevauche l'un des promoteurs putatifs de l'intégrase ( $P_{intI(3)I}$ ) chez les intégrons de classe 3 (Figure 10). Il a été démontré expérimentalement que cette protéine réprime l'expression du gène de l'intégrase *intI1* (Guérin *et al* ; 2009). Dans l'objectif de s'affranchir de l'effet répresseur probable de cette protéine sur l'expression du gène *intI3* (pas de synthèse de l'ARNm), nous avons utilisé aussi la souche de *E. coli* MG1656  $\Delta$  *lexA* pour lesquelles l'expression du gène *intI3* ne peut être réprimée. C'est ainsi que 2 conditions expérimentales ont été testées (présence et absence de la protéine LexA). Les transformants *E. coli* MG1656::pUL3AT et *E. coli* MG1656 $\Delta$ *lexA*::pUL3AT ont été utilisés.

Par la suite, les mêmes expériences ont été réalisées avec les souches natives de *E. cloacae* (LIM73), *A. johnsonii* (LIM75), *A. allosaccharophila* (LIM82) et *C. freundii* (LIM86) isolées au laboratoire et hébergeant un intégron de classe 3. Les cultures bactériennes ont été réalisées à 37°C dans du BHI (Brain Heart Infusion) supplémenté d'antibiotiques : kanamycine 25  $\mu$ g/ml et ampicilline 100 $\mu$ g/ml.

Souches	Description/caractéristiques	Références
<i>E. coli</i> MG1656	Souche sauvage de <i>E. coli</i> K12 MG1655 délétée du gène <i>lacZ</i>	(Espeli, Moulin et Boccard, 2001)
<i>E. coli</i> MG1656::pUL3AT	Souche de <i>E. coli</i> MG1656 obtenue après transformation du plasmide pUL3AT hébergeant l'intégron de classe 3 In3-5 ( <i>bla</i> <sub>OXA-256</sub> - <i>aac(6')-Ib'</i> )	Ce travail
<i>E. coli</i> MG1656Δ <i>Lex A</i>	Souche de <i>E. coli</i> MG1656 délétée du gène <i>lexA</i>	(Guérin <i>et al</i> ; 2009)
<i>E. coli</i> MG1656Δ <i>Lex A</i> ::pUL3AT	Souche de <i>E. coli</i> MG1656Δ <i>Lex A</i> :: pUL3AT obtenue après transformation du plasmide pUL3AT hébergeant l'intégron de classe 3 In3-5	Ce travail
<i>E. coli</i> DH5α	(F <sup>+</sup> ) <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG !80 " lacZ!M15 "(lacZYAargF) U169, hsdR17(rK<sup>-</sup> mk<sup>-</sup>), λ-</i>	Collection du laboratoire
<i>E. cloacae</i> (LIM 73)	Souche hébergeant un intégron de classe 3 (In3-5) composé des cassettes <i>bla</i> <sub>OXA-256</sub> - <i>aac(6')-Ib'</i>	(Barraud <i>et al</i> ; 2009)
<i>A. johnsonii</i> (LIM 75)	Souche hébergeant un intégron de classe 3 (In3-6) composé des cassettes <i>aac(6')-Ib-bla</i> <sub>OXA-10</sub> - <i>aadA1-like-qacE2-like</i>	Collection du laboratoire
<i>A. allosaccharophila</i> ((LIM 82)	Souche hébergeant un intégron de classe 3 (In3-7) composé des cassettes <i>bla</i> <sub>OXA-368</sub> - <i>aac(6')-Ib'</i>	Collection du laboratoire
<i>C. freundii</i> ((LIM 86)	Souche environnementale hébergeant un intégron de classe 3 (In3-9) composé des cassettes <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> - <i>bla</i> <sub>GES-1</sub> - <b>GroupIIC-attCintron</b>	Collection du laboratoire

**Tableau 9:** Souches bactériennes utilisées au cours de ce travail.

### 2.3- Extraction et purification des ARN totaux (transcription)

Les ARN totaux ont été extraits à partir des cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance à l'aide du kit RNA Problue (MP Biomedicals, Illkirch, France) en utilisant



l'appareil FastPrep (MP Biomedicals). La méthode guanidine isothiocyanate/acid-phenol décrite par Chomzynski et Sacchi a été utilisée (Chomzynski et Sacchi ; 1987).

Les ARN totaux extraits ont été repris dans de l'eau traitée DEPC (DiEthylPyroCarbonate) puis, les ADN contaminants ont été éliminés *via* deux traitements successifs à la DNase à l'aide du kit Turbo DNA-free (Ambion, Courtaboeuf) et leur absence vérifiée par PCR. L'intégrité des ARN extraits purifiés a été contrôlée sur gel d'agarose 0,8% ; leur quantité et pureté ont été évaluées par dosage spectrophotométrique à 260 nm puis 280 nm.

#### **2.4- Synthèse et purification de l'ADN complémentaire (ADNc)**

La synthèse de l'ADNc correspondant à l'ARNm produit *via* le promoteur *PintI3* a été réalisée avec l'enzyme PrimeScriptII<sup>TM</sup>-RT selon les conditions du fournisseur. La réaction de reverse transcription a été réalisée avec l'amorce spécifique GSP1 et avec les ARNm des souches *E. coli* MG1656::pUL3AT, *E. coli* MG1656 $\Delta$ *lexA*::pUL3AT, *E. cloacae* LIM73, *A. johnsonii* LIM75, *A. allosacharophila* LIM82 et *C. freundii* LIM86. Par la suite, les ARNm matrices ont été dégradés par traitement chimique (RNase mix = RNase H+ RNase T1) avant la purification des ADNc. L'absence d'ADN plasmidique et la présence d'ADNc ont été vérifiées par PCR. Les différents ADNc synthétisés dans chacun des cas ont été purifiés sur colonne (suivant les instructions du fournisseur) puis élués dans de l'eau DEPC et conservés à 20°C.

#### **2.5- Ajout de la queue poly-C et réactions d'amplification de l'ADNc**

L'extrémité 3' de chaque ADNc a été étendue par ajout d'une séquence nucléique composée d'une série de 17 bases de cytosine C (queue polyC) puis une première amplification a été faite avec les oligonucléotides AAP (qui s'hybride sur la queue polyC) et GSP2. Le produit a été identifié sur gel d'agarose à 1,6%. Ensuite, une PCR nichée a été réalisée avec pour matrice le produit de la première amplification utilisant les amorces AUAP et GSP3.

Les produits ont été aussi vérifiés par migration sur gel d'agarose 1,6% puis clonés dans le vecteur pGem®T-Easy selon les conditions du fournisseur (Promega, Madison). Après purification des produits de clonage par dialyse, ces derniers ont été transformés dans une souche électrocompétente de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## **2.6- Séquençage des inserts hébergeant les produits d'amplification de la 5'RACE**

Les inserts issus des 72 clones recombinants ont été séquencés par la méthode de Sanger. De ces clones, on distinguait 11 clones de *E. coli* MG1656::pUL3AT, 14 de *E. coli* MG1656 $\Delta$ LexA::pUL3AT, 18 de *A. allosaccharophila* LIM82, 19 de *C. freundii* LIM86 et enfin 5 clones chacun de *E. cloacae* LIM73 et *A. johnsonii* LIM75.

Les mélanges réactionnels étaient composés de 50  $\mu$ g d'ADN plasmidique, 2  $\mu$ L de tampon 5X, d'une des amorces (Fwd-lacZ ou SP6) à une concentration finale de 0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L et de 3  $\mu$ L de BigDye® (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) qui contient les désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), la polymérase et les terminateurs (ddNTP). Nous avons utilisé un automate ABI Prism 3310 (Applied Biosystems). Les séquences générées ont été analysées avec le logiciel Geneious version 6.0.1.

# Résultats

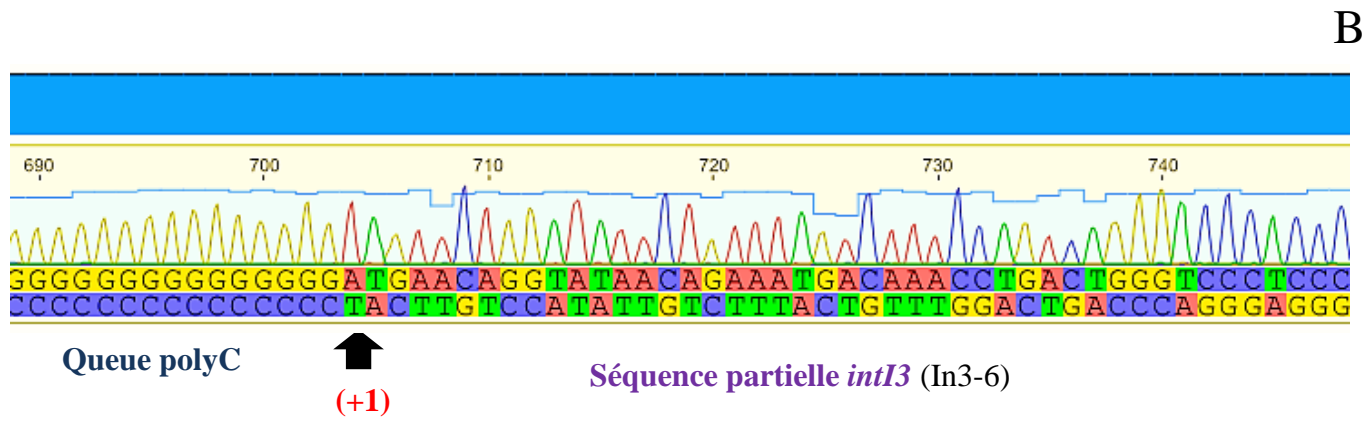
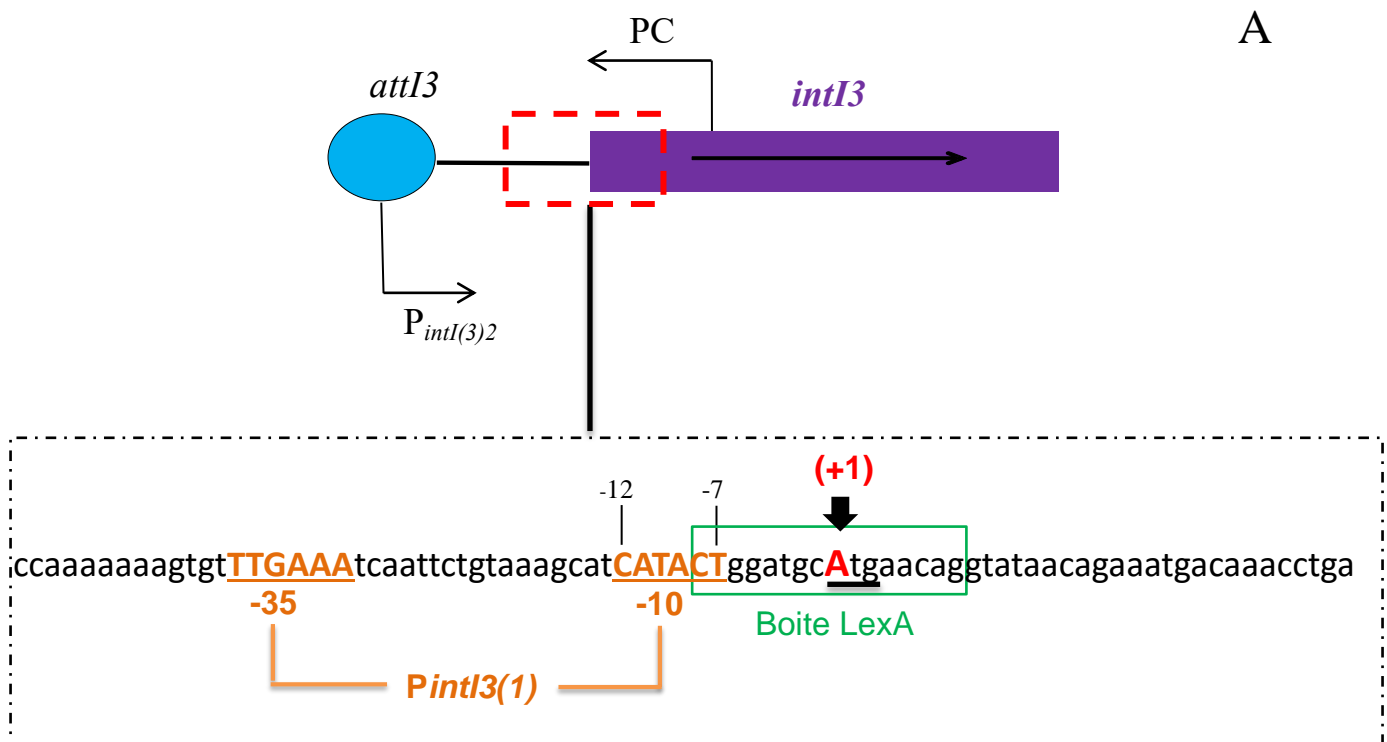
## Caractérisation du promoteur de l'intégrase *intI3*

Les expériences ont été faites d'une part avec des souches de *E. coli* hébergeant le plasmide pUL3AT portant un intégron de classe 3 (In3-5) et d'autre part avec 4 souches bactériennes natives hébergeant leur propre intégron de classe 3.

A l'issue de l'expérience de 5'RACE réalisées dans les différentes conditions expérimentales, un seul produit de 350 pb a été obtenu puis cloné dans le pGem®T-Easy.

L'analyse a révélé que 13/72 des clones obtenus permettaient d'identifier l'adénine qui est la première base du gène de l'intégrase *intI3* de tous les IR3 décrits jusqu'à présent (Figure 13 A). De ces 13 clones, 6 ont été obtenus à partir de la souche de *E. coli* et les 7 autres à partir des souches natives, les autres séquences obtenues ne correspondaient pas à la séquence 5' du gène *intI3*. Ce résultat pourrait s'expliquer soit par la dégradation des ARNm obtenus après l'étape de reverse transcription ou alors par une hybridation aspécifique des amorces GSP dans le plasmide conduisant plutôt à l'amplification des régions plasmidiques.

La position du (+1) caractérisée ici est compatible avec l'élément « -10 » du *PintI3(1)*. Ce promoteur est présent chez tous les intégrons de classe 3 décrits dans la littérature et se compose de 2 éléments fonctionnels appelés boîtes « -35 » et « -10 » séparées par 17 pb. De ce résultat, nous pouvons donc conclure que le promoteur ***PintI3(1)*** précédemment décrit dans les travaux de Collis (Collis *et al* ; 2002a) est le promoteur qui assure l'expression du gène *intI3* ; la distance entre la boîte -10 de ce promoteur et son +1 (A) de transcription est de 6 pb (Figure 13B). Aucune séquence n'a permis d'identifier le *PintI3(2)*.



**Figure 13:** Caractérisation du promoteur *PintI3* du gène de l'intégrase des IR3

(A) Séquence du promoteur *PintI3(1)* du gène *intI3* de In3-6. Les séquences des boîtes -35 et -10 (en orange) sont représentées en majuscule, en gras et sont soulignées ; le variant présenté est celui décrit chez In3-6. Le (+1) de transcription de ce promoteur (rouge) est la base (A) marquée ici par une flèche verticale noire. La boîte LexA qui chevauche le promoteur *PintI3-1* est encadrée en vert. Le codon start putatif de l'intégrase est souligné en noir (Collis *et al* ; 2002).

(B) Séquence du produit de la 5'RACE réalisée avec l'intégron In3-6. Le (+1) de transcription qui précède la queue polyC (en bleue) est indiqué en noir : il s'agit d'une adénine (A) indiquée en rouge.

Une analyse *in silico* des séquences de tous les intégrons de classe 3 décrits dans la littérature montre qu'il existe un polymorphisme de ce promoteur. Au total, on distingue 4 variants et les différences entre ces derniers se situent au niveau de la boîte -10 et du spacer (Figure 10). Il est intéressant de noter comme chez les intégrons de classe 1, que les séquences de la boîte LexA et de la boîte -10 de ce promoteur se chevauchent. La présence d'une telle organisation laisse supposer que l'expression du gène de l'intégrase *intI3* pourrait comme chez les intégrons de classe 1 (Guérin *et al* ; 2009) être régulée par la réponse SOS.

Au vu de la variabilité de séquences des promoteurs (*PintI3(1)*) et (Pc), nous avons jugé intéressant d'évaluer la force de chacun d'entre eux. C'est ainsi que des expériences ont été réalisées afin d'étudier la force de ces derniers. La méthodologie et les résultats obtenus sont présentés dans la partie 4 de ce travail de thèse.

## **Partie 4**

Evaluation de la force des variants des promoteurs

Pc et *PintI3(1)*

Chez les IR3, il existe à ce jour 4 variants du Pc et 4 variants de *PintI3(1)*. Pour ce qui est du Pc, seule la force du variant décrit au sein de l'intégron In3-1 a été estimée par détermination de l'IC50 (concentration de l'antibiotique capable d'inhiber la croissance de 50% de la population bactérienne) (Collis *et al*; 2002a). Aucune étude n'a été effectuée sur l'évaluation de la force des différents variants du promoteur de l'intégrase. Dans ces travaux, nous nous sommes donc intéressés à l'étude des forces des différents variants de ces deux promoteurs Pc et *PintI3-(1)*.

## **Matériel et Méthodes**

### **1- Souches bactériennes, conditions de culture**

Les souches de *E. coli* MG1656 et *E. coli* MG1656 $\Delta$ *lexA* dont les caractéristiques ont été présentées dans le tableau 9 ont été utilisées au cours de cette étude. La culture des bactéries s'est faite à 37°C dans le bouillon Luria Bertani (LB) supplémenté quand cela était nécessaire avec de la kanamycine 25 $\mu$ g/ml.

### **2- Techniques de biologie moléculaire**

#### **2.1- Plasmides et réactions d'amplification par PCR**

Différentes constructions plasmidiques précédemment construites au laboratoire et hébergeant à la fois les différents variants des promoteurs Pc et *PintI3* ont été utilisés comme matrice pour les réactions d'amplification. Tous les plasmides ont été extraits avec le kit PureYield Plasmid Minipreps (Promega) suivant les recommandations du fabricant.

Les amplifications des régions renfermant uniquement les différents variants de Pc (132 pb) et de *PintI3(1)* (64pb) destinées à être clonées ont été réalisées à l'aide d'une polymérase haute-fidélité Ex Takara™ DNA polymérase (NEB™).

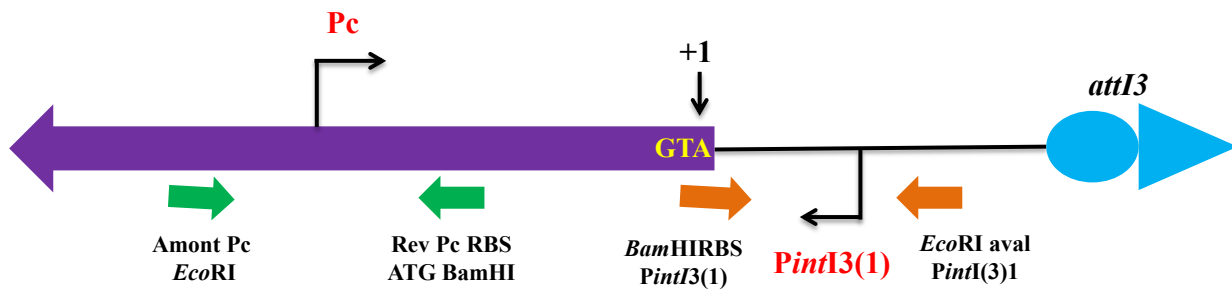
Les séquences des oligonucléotides utilisées sont consignées dans le tableau 10.

Les réactions de PCR ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur suivant les conditions suivantes : dénaturation initiale 3 min à 98°C suivie de 25 cycles [3 min à 98°C (dénaturation), 10 sec. à 55 °C (hybridation), 15 sec à 1 min à 72°C selon la taille du fragment (élongation)] et 4 min à 72°C pour l'élongation finale.

Oligonucléotides	Séquences (5' → 3')
Amont Pc <i>EcoRI</i>	5' - CCGGAATTCGCCTTGGCCCAGTAGACAT - 3'
Reverse Pc-RBS-ATG <i>BamHI</i>	CGCGGATCCATGGCTGTTTCCTTCCCTCCCCATCCATC AAGCTGCTCGATCACGTGCGCGA - 3'
<i>EcoRI</i> aval <i>PintI3(1)</i>	5'-CCGGAATTCATGTCGCACGGCACCCAAA-3'
<i>BamHI</i> -RBS- <i>PintI(3)</i> _In3-3456	5'-CGCGGATCCATGGCTGTTTCCTATGCATCCAGTA TGATGCTTTACAGAATTGATTTC-3'
<i>BamHI</i> -RBS- <i>PintI(3)</i> _In3-1	5'-CGCGGATCCATGGCTGTTTCCTATGCATCCAG TATGATGCTTTACAGGATTGATTTC-3'
<i>BamHI</i> -RBS- <i>PintI(3)</i> _In3-29	5'-CGCGGATCCATGGCTGTTTCCTATGCATCCAG TAAGATGCTTTACAGAATTGATTTC-3'
<i>BamHI</i> -RBS- <i>PintI(3)</i> _In3-7	5'-CGCGGATCCATGGCTGTTTCCTATGCAT CCGGTATGATGCTTTACAGAATTGATTTC-3'
Fwd <i>lacZ</i>	CGCCAGGGTTTTCCAGTCAC

**Tableau 10 :** Oligonucléotides utilisés lors de ce travail.



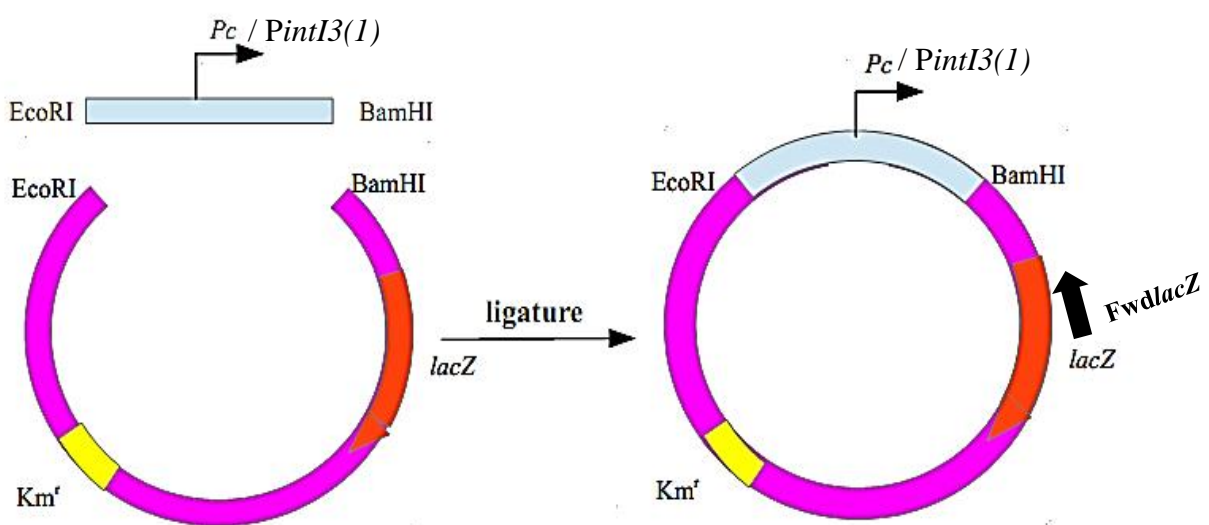


**Figure 14** : Disposition des amorces utilisées au cours de ce travail.

Les amorces utilisées pour l'amplification de la région hébergeant le Pc sont de couleur verte et celles utilisées pour les régions hébergeant le *PintI3(1)* sont de couleur orange. Pour chaque variant de Pc, les mêmes amorces ont été utilisées. Pour les variants de *PintI(3)1*, la séquence de l'amorce ayant la queue *BamHI* est fonction du variant (tableau 10) ; l'amorce *EcoRI* aval *PintI(3)-1* a été utilisée pour les 4 variants. *PintI(3)-1*

## 2.2- Construction des fusions transcriptionnelles

Les plasmides présentés dans le tableau 11 ont été obtenus par fusion transcriptionnelle des séquences d'intérêt renfermant chaque variant des promoteurs Pc ou *PintI3(1)* avec le gène rapporteur *lacZ* (Figures 15 et 16). Ils ont été construits après double digestion avec les enzymes *EcoRI* et *BamHI* (de New England Biolabs, Hitchin ou Invitrogen, Cergy-Pontoise) du vecteur et de l'insert puis clonage des séquences d'intérêt dans le plasmide pSU38 $\Delta$ tot*lacZ* linéarisé utilisant la T4 DNA ligase (Promega). Tous les fragments clonés ont été vérifiés par séquençage en utilisant une amorce qui s'hybride dans le gène *lacZ* (Fwd*lacZ*).



**Figure 15 :** Exemple de fusion transcriptionnelle réalisées au cours de ce travail.

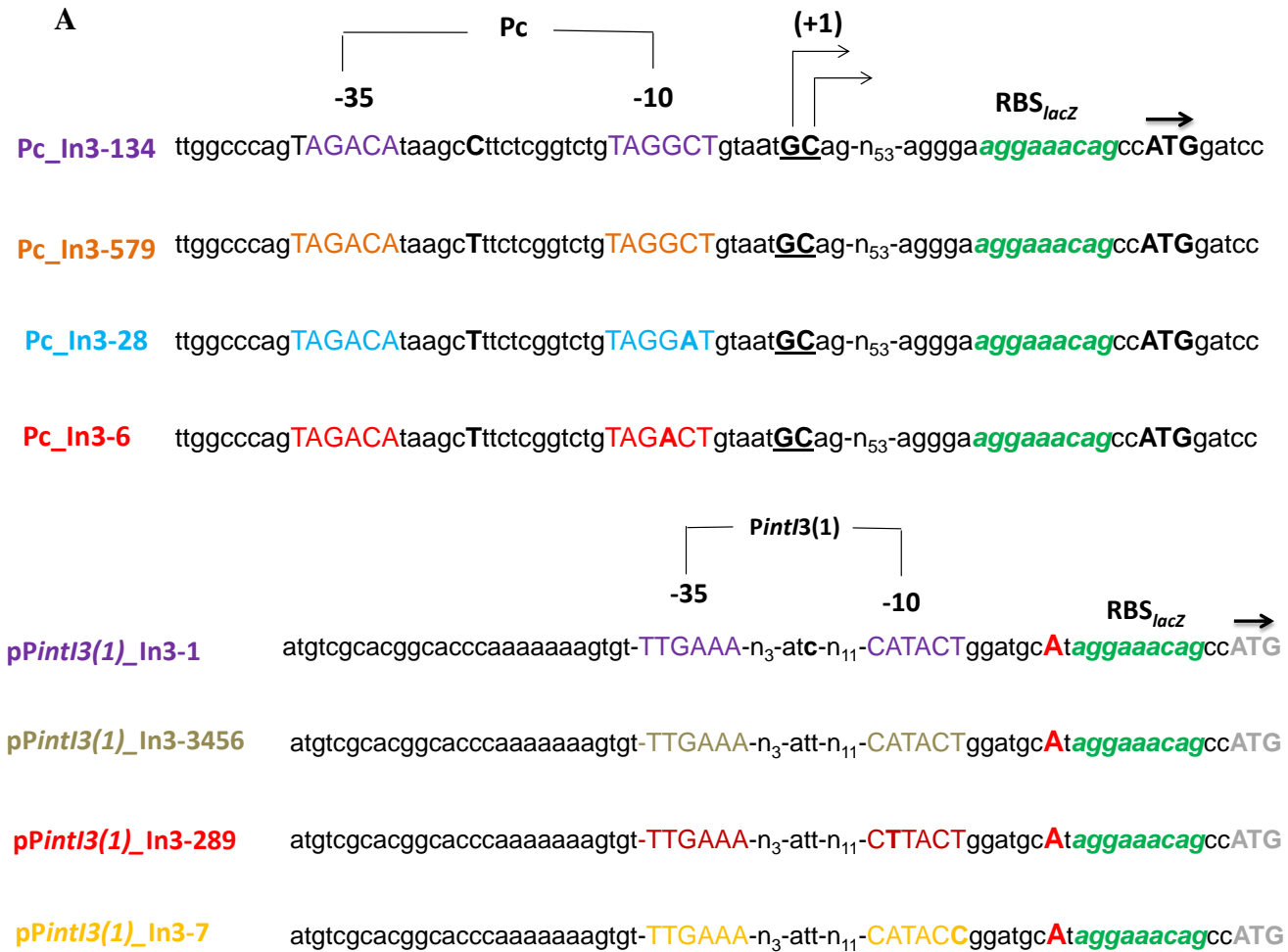
En bleu, la séquence d'intérêt renfermant l'un des variants de promoteur étudié (*Pc* ou *PintI3(1)*). Les extrémités de chaque séquence possèdent des sites de restrictions *EcoRI* et *BamHI* identiques à ceux présents sur le vecteur pSU38Δ*totlacZ* (en rose). Le gène rapporteur *lacZ* est représenté en rouge et le gène de résistance à la kanamycine est représenté en jaune. L'amorce Fwd*lacZ* est représentée par une flèche noire.

Références	Plasmides	Caractéristiques
Jové <i>et al</i> ; 2010	pSU38 $\Delta$ totlacZ	Vecteur d'expression hébergeant la séquence codante du gène <i>lacZ</i> sans promoteur ni signal d'initiation de traduction; [KmR]
Ce travail	pPc_In3-134	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 132 pb hébergeant le variant de Pc des intégrons In3-1, In3-3 et In3-4.
Ce travail	pPc_In3-28	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 132 pb hébergeant le variant de Pc des intégrons In3-2 et In3-8.
Ce travail	pPc_In3-579	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 132 pb hébergeant le variant de Pc des intégrons In3-5, In3-7 et In3-9.
Ce travail	pPc_In3-6	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 132 pb hébergeant le variant de Pc des intégrons In3-6.
Ce travail	pPintI3(1)_In3-1	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 64 pb hébergeant le variant de <i>PintI3(1)</i> de In3-1 amplifiée avec les amorces <b><i>EcoRI</i> aval <i>PintI3(1)</i> et <i>BamHI</i>-RBS-<i>PintI(3)</i> _In3-1</b>
Ce travail	pPintI3(1)_In3-3456	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 64 pb hébergeant le variant de <i>PintI3(1)</i> _ de In3-3, In3-4, In3-5 et In3-6 amplifiée avec les amorces <b><i>EcoRI</i> aval <i>PintI3(1)</i> et <i>BamHI</i>-RBS-<i>PintI(3)</i> _In3-3456.</b>
Ce travail	pPintI3(1)_In3-289	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 64 pb hébergeant le variant de <i>PintI3(1)</i> _ de In3-1, In3-8 et In3-9 amplifiée avec les amorces <b><i>EcoRI</i> aval <i>PintI3(1)</i> et <i>BamHI</i>-RBS-<i>PintI(3)</i> _In3-29.</b>
Ce travail	pPintI3(1)_In3-7	pSU38DtotlacZ renfermant entre <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i> 64 pb hébergeant le variant de <i>PintI3(1)</i> de In3-7 amplifiée avec les amorces <b><i>EcoRI</i> aval <i>PintI3(1)</i> et <i>BamHI</i>-RBS-<i>PintI(3)</i> _In3-7.</b>

**Tableau 11 :** Plasmides utilisés au cours de ce travail.

L'amplification de la séquence de 132pb renfermant les variants de Pc a été réalisée avec les amorces **Amont Pc *EcoRI* et Reverse Pc-RBS-ATG *BamHI***. [KmR] : Kanamycine résistant

La figure 16 ci-dessous présente les différentes constructions utilisées au cours de ce travail



**B**

**Figure 16 :** Constructions transcriptionnelles renfermant les variants des promoteurs Pc (A) et *PintI3(1)* (B).

La figure **A** représente les différents inserts renfermant les variants de Pc clonés dans le vecteur d'expression pSU38Δ*totlacZ*. Chaque variant est représenté par un code couleur : violet, orange, bleu et rouge pour les variants présents chez les intégrons In3-1, In3-3, In3-4 (Pc\_In3-134) ; In3-5, In3-7, In3-9 (Pc\_In3-579) ; In3-2, In3-8, In3-9 (Pc\_In3-289) et In3-6 (Pc\_In3-6) respectivement. Les (+1) de transcription possibles du promoteur (GC) sont représentés en lettre majuscule en gras, soulignés et par les flèches horizontales ; aux différentes constructions, une séquence indispensable pour l'initiation de la traduction du gène *lacZ* en vert (RBS *lacZ* : Ribosome Binding Site du gène *lacZ*) et un codon start ATG (en gras) ont été rajoutés.

En **B**, les séquences des variants du promoteur *PintI3(1)* ; en violet, gris, rouge et jaune sont les variants décrits chez les intégrons In3-1 ; In3-3, In3-4, In3-5, In3-6 ; In3-2, In3-8, In3-9 et In3-7 respectivement. A chaque construction, une RBS (en vert) et un codon d'initiation de la traduction ATG ont été rajoutés. Dans chaque cas, nous avons regroupé les intégrons ayant le même variant de Pc ou de *PintI3*. C'est ainsi que Pc\_In3-579 est le promoteur décrit chez les intégrons In3-5, In3-7 et In3-9 ; *PintI3(1)*. In3-3456 est le variant du promoteur de l'intégrase décrit chez les intégrons In3-3, In3-4, In3-5 et In3-6. Les bases qui diffèrent dans le -10 et le spacer sont en gras. La base A en rouge représente le +1 de transcription (cf partie 3 de la thèse).

### **2.3- Essais $\beta$ -galactosidase**

L'évaluation des forces des différents variants du promoteur a été réalisée en dosant l'activité de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase produite suite à l'expression du gène *lacZ* placé sous l'expression de chaque variant de promoteur. Elle a été menée dans une souche de *E. coli* MG1656 pour les variants du Pc et dans une souche de *E. coli* MG1656 $\Delta$ *lexA* pour les variants de *PintI3(1)*. Pour chaque construction, les essais ont été réalisés 6 fois selon la technique décrite par Miller (Miller, 1992) suivant le protocole précédemment décrit (Jové *et al.*, 2010).

### **2.4- Analyses statistiques**

Le test t de student a été utilisé pour déterminer s'il existe une différence significative entre les moyennes des essais  $\beta$ galactosidase obtenues pour chacun des variants Pc et *PintI(3)1*.

## Résultats

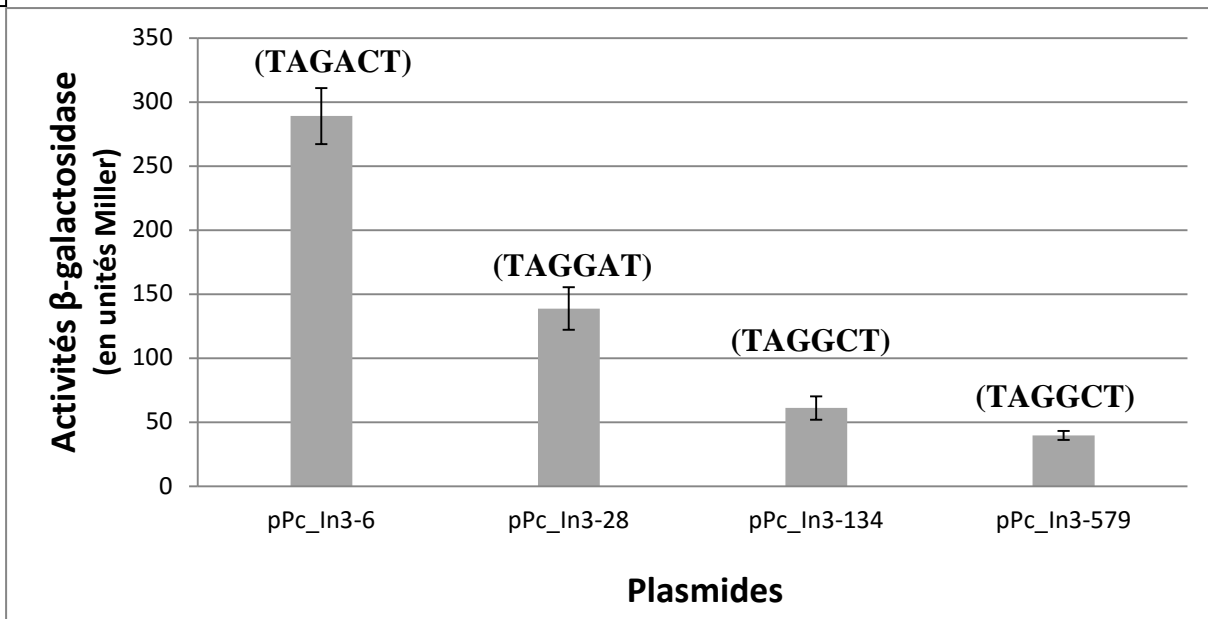
L'objectif des travaux réalisés dans cette partie était d'évaluer la force des différents variants des promoteurs de cassettes Pc et *PintI3(1)* des IR3.

Comme le montre la figure 17A, tous les variants de Pc sont capables d'assurer l'expression du gène *lacZ*. Le promoteur de séquence TAGACA-N<sub>17</sub>-TAGACT décrit chez In3-6 (Pc\_In3-6) présente une activité plus forte que les 3 autres variants ; il est 7,5 fois plus fort que le promoteur le plus faible Pc\_In3-579. Le variant de Pc\_In3-28 est 2 et 3,5 fois plus fort que les promoteurs Pc\_In-134 et Pc\_In3-579 respectivement. Les variants de Pc\_In3-134 (TAGACA-N<sub>3</sub>-GCC-N<sub>11</sub>-TAGGCT) et Pc\_In3-579 (TAGACA-N<sub>3</sub>-GCT-N<sub>11</sub>-TAGGCT) qui ne diffèrent que par une mutation dans la séquence spacer entre les boîtes -35 et -10 présentent les activités  $\beta$ -galactosidase les plus faibles. Le résultat du test t de student a révélé qu'il existe une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les différentes forces obtenues laissant conclure qu'il existe 4 forces de Pc chez les IR3.

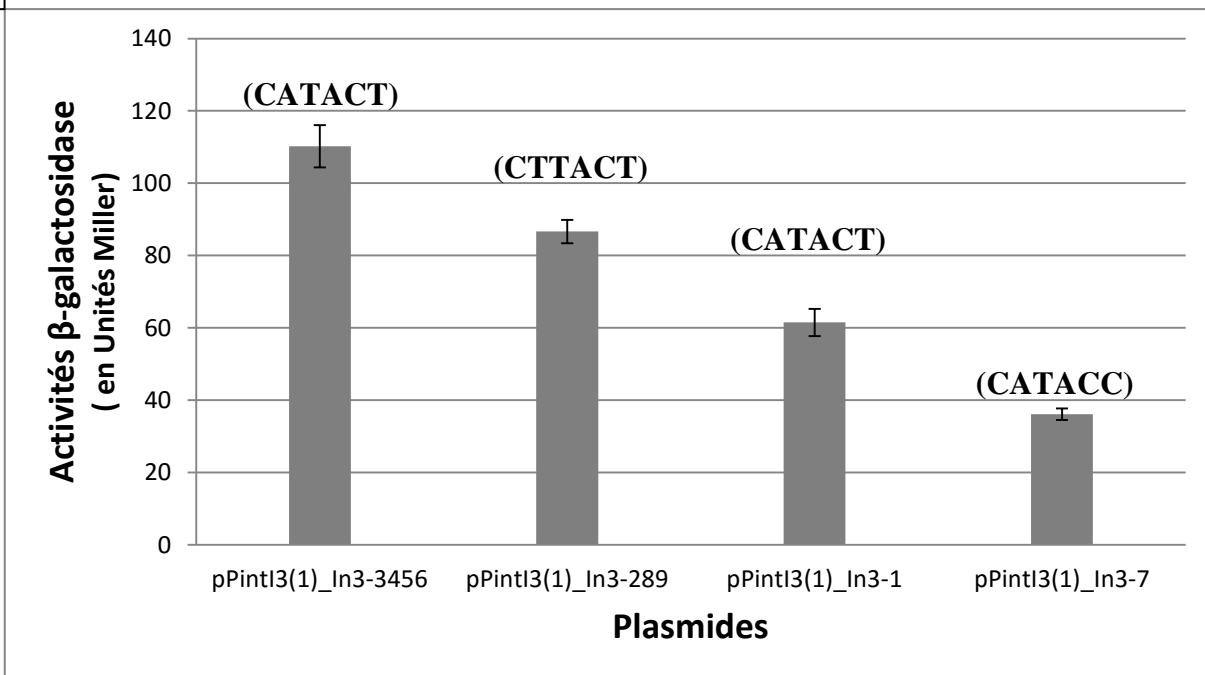
Les essais de galactosidase effectués avec les 4 variants du promoteur *PintI3(1)* de l'intégrase ont révélé que chaque variant a une force qui lui est propre (figure 17B). Le variant le plus fort est le *PintI3(1)* \_In3-3456 (TTGAAA-N<sub>17</sub>-CATACT) décrit chez les intégrons In3-3, In3-4, In3-5 et In3-6 (Figure 17B). La plus faible activité a été enregistrée avec le promoteur *PintI3(1)* \_In3-7 (TTTCAA-N<sub>17</sub>-CATACC) ; cette dernière est 3 fois plus faible que celle du promoteur fort. Les forces des promoteurs *PintI3(1)* \_In3-29 et *PintI3(1)*\_In3-1 des intégrons (In3-2, In3-9) et In3-1 sont 1,3 et 1,8 fois plus faibles que celle du promoteur fort.

Nous avons démontré que les différents variants de Pc et de *PintI3* sont fonctionnels et qu'il existe plusieurs forces relatives différentes.

A



B



**Figure 17 :** Activités β-galactosidases des variants des promoteurs Pc (A) et *PintI(3)* (B).

L'activité des différents variants des promoteurs a été mesurée par des essais β-galactosidase à partir de fusions transcriptionnelles entre les séquences renfermant les différents variants des promoteurs Pc ou *PintI(3)* et le gène *lacZ* dépourvu de promoteur. Les plasmides renfermant ces différentes constructions sont marqués en abscisses. Les intégrons ayant le même variant de Pc ou de *PintI(3)* ont été regroupés. Par exemple, p*PintI(3)*\_In3-3456 est le variant du promoteur de l'intégrase décrit chez les intégrons In3-3, In3-4, In3-5 et In3-6 ; Pc\_In3-28 est le variant de Pc décrit chez les intégrons In3-2 et In3-8.

Les barres d'erreurs indiquent les écarts type d'au moins 6 essais indépendants pour chaque construction plasmidique. Le degré de significativité a été évaluée pour une p-value fixée à 0.05. Les séquences nucléotidiques des boîtes -10 sont représentées entre parenthèse au dessus des barres.

Le tableau 12 ci-dessous récapitule l'intensité des forces relatives différents variants de Pc et *PintI3(1)* étudiés.

**Tableau 12 :** Tableau des intensités des forces des promoteurs Pc et *PintI3(1)*

Le nombre de croix est proportionnel à l'intensité de la force de chaque promoteur.

<b>Intégrons</b>	<b>Force Pc</b>	<b>Force <i>PintI3(1)</i></b>
<b>In3-1</b>	++	++
<b>In3-2, In3-8</b>	+++	+++
<b>In3-3, In3-4</b>	++	++++
<b>In3-5</b>	+	++++
<b>In3-6</b>	++++	++++
<b>In3-7</b>	+	+
<b>In3-9</b>	+	+++



## **Discussion**

L'objectif de ce travail était d'étudier sur le plan épidémiologique et mécanistique les intégrons de classe 3. Les travaux de la partie épidémiologique ont consisté d'une part à (i) caractériser la structure et le support génétique des intégrons de classe 3 qu'hébergeaient des bactéries environnementales isolées en France et au Luxembourg et d'autre part (ii) à rechercher en Afrique (Cameroun) des bactéries hébergeant des intégrons de classe 3 puis à les caractériser.

Les travaux menés ici nous ont conduit à l'isolement de 3 souches environnementales : *Acinetobacter johnsonii* (LIM75), *Aeromonas allosaccharophila* (LIM82) et *Citrobacter freundii* (LIM86) hébergeant chacune un intégron de classe 3 situé sur un plasmide. Ces bactéries ont été isolées d'échantillons d'effluents hospitaliers et de boues activées prélevés en France et au Luxembourg. La présence de ces intégrons dans l'environnement corrobore les résultats des travaux antérieurs. En effet, dans le contexte environnemental, ces supports génétiques ont été détectés chez les bactéries isolées dans les boues activées (Lee *et al* ; 2015) et dans le compartiment aquatique (Xu *et al* ; 2007, Moura *et al* ; 2010, Uyaguari *et al* ; 2013 et Barraud *et al* ; 2013). Une étude conduite récemment à l'UMR Inserm 1092 a mis en évidence une fréquence élevée (~95%) des intégrons de classe 3 dans des effluents urbains et hospitaliers (Stalder *et al* ; 2014). Dans notre étude, les intégrons de classe 3 détectés chez LIM 75, LIM82 et LIM86 ont été nommés In3-6 (LN877969), In3-7 (KT736121) et In3-9 (KT984195) respectivement suivant la nomenclature proposée par Xu (Xu *et al* ; 2007). Les gènes des cassettes portés par ces intégrons codent des résistances aux  $\beta$ -lactamines (*bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-368</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub>) aux aminoglycosides (*aac*(6')-Ib, *aac*(6')-Ib', *aadA1*) et aux ammoniums quaternaires (*qacE2*). Les réseaux de cassettes ***aac*(6')-Ib-*bla*<sub>OXA-10</sub>-*aadA1*-like-*qacE2*-like ; *bla*<sub>OXA-368</sub>-*aac*(6')-Ib' et *bla*<sub>OXA-2</sub>-*bla*<sub>GES-1</sub>-GroupeIIIC-attCintron** ont été décrits respectivement chez In3-6, In3-7 et In3-9.

C'est la première fois que ces réseaux de cassettes sont décrits chez les intégrons de classe 3. La souche *C. freundii* LIM86 hébergeait en plus d'un intégron de classe 3 un intégron de classe 1 contenant le réseau de cassettes *aac(6')-Ib-smr2-GroupIIC-attC*. Les cassettes de résistance aux antibiotiques chez les intégrons de classe 3 ont été majoritairement observées dans le contexte clinique ; les gènes décrits codaient comme dans notre étude, principalement des résistances aux bêtalactamines et aux aminosides (Arakawa *et al*; 1995, Correia *et al* ; 2003, Poirel *et al* ; 2010, Manageiro *et al* ; 2015, Papagianitsis *et al*; 2015). Cependant, dans le contexte environnemental, un seul intégron (In3-5), dont les cassettes (*bla<sub>OXA-256</sub>* et *acc(6')-Ib'*) codent la résistance à ces 2 familles d'antibiotiques, a été décrit chez une souche de *Enterobacter cloacae* isolée d'un effluent hospitalier (Barraud *et al* ; 2013). Les 3 intégrons In3-6, In3-7 et In3-9 portaient aussi chacun une cassette codant une oxacillinase, *bla<sub>OXA-10</sub>* (In3-6), *bla<sub>OXA-368</sub>* (In3-7) et *bla<sub>OXA-2</sub>* (In3-9). Le gène *bla<sub>OXA-368</sub>* présente une substitution (Gly149Asp) par rapport au gène *bla<sub>OXA-74</sub>* qui a été précédemment décrit chez un intégron de classe 1 isolé d'une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* (AJ854182). A ce jour, seules deux cassettes codant une oxacillinase (*bla<sub>OXA-256</sub>* et *bla<sub>OXA-434</sub>*) ont été détectées chez 2 intégrons de classe 3, décrits en France (Barraud *et al* ; 2013) et en Espagne (Castillo *et al* ; 2015- communication affichée Poster 1014 ECCMID 2015). Les cassettes *qacE2*-like (Ala8Val) et *aadA1*-like (Gly78Arg) sont des variants des cassettes *qacE2* (FJ172394) et *aadA1* (KF914302). Ces dernières sont fréquentes chez les intégrons de classe 1 et codent respectivement une résistance aux ammoniums quaternaires et à la streptomycine-spectinomycine (Partridge *et al* ; 2009). Aucune étude n'a précédemment mis en évidence ces 2 cassettes chez des intégrons de classe 3. Les cassettes *bla<sub>OXA</sub>* et *aadA1* sont fréquentes chez les intégrons de classe 1 (Partridge *et al* ; 2009, Cicek *et al* ; 2013, Peymani *et al* ; 2012).

La présence de ces cassettes laisse suggérer que les intégrases IntI3 des IR3 décrits seraient fonctionnelles et pourraient catalyser la recombinaison de cassettes entre les 2 classes d'intégrons (IR1 et IR3). Ce phénomène serait favorisé par la pression de sélection exercée par les composés tels que les antibiotiques, les détergents, les désinfectants et les métaux lourds généralement présents dans les effluents (Baquero *et al* ; 2008, Kummerer *et al* ; 2009, Ahmad *et al* ; 2013).

Dans notre étude, nous avons pour la première fois, mis en évidence la présence d'un intron (GroupeIIC-*attC* intron) au sein d'un IR3. Les GroupeIIC-*attC* introns sont des éléments génétiques mobiles décrits jusqu'à présent uniquement chez des IR1 (au sein de sites *attC*) (Centron et Roy ; 2002 ; Quiroga et Centron ; 2008). L'insertion de ces éléments au niveau du site *attC* des cassettes des intégrons se fait au niveau de la séquence 5'-TTGT-3' localisée dans le brin inférieur de la boîte 1L du site *att C* (Figure4). Comme dans notre cas, les introns du GroupeIIC-*attC* ont été signalés le plus souvent dans le site *attC* de la dernière cassette du réseau et sont orientés dans le sens contraire à celui des cassettes (Leon *et al* ; 2010). Le rôle potentiel de ces introns dans la formation des cassettes a été proposé (Léon *et al* ; 2009). De plus, des promoteurs fonctionnels (P1out et P2out) capables d'assurer l'expression des cassettes situées en aval ont été décrits au sein de ces introns (Léon *et al* ; 2010). Sur la base de cette propriété, seul l'intron de l'intégron de classe 1 de *C. freundii* LIM86 pourrait contribuer à améliorer l'expression des gènes *qacEΔ1* et *sulI* situés dans la région 3'CS. L'expression de ces 2 gènes étant assurée par le promoteur de la cassette *qacE* situé en amont (Hall & Collis ; 1998).

La description ici des IR3 hébergeant des cassettes impliquées dans la résistance à 2 familles d'antibiotiques (bêtalactamines et aminosides) largement utilisées en thérapie humaine (Jury *et al* ; 2010) souligne le rôle potentiel que pourrait avoir les intégrons de classe 3 dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

Au vu de nos résultats, et de ceux présentés dans la littérature, les IR3 ont désormais été isolés en Asie, en Europe et en Amérique à la fois dans le contexte clinique et dans le contexte environnemental (Arakawa *et al*; 1995, Correira *et al* ; 2003, Shibata *et al*; 2003, Poirel *et al*; 2010, Moura *et al* ; 2010, Cao *et al*; 2014, Kagar *et al*; 2014, Pavelkovich *et al*; 2014, Lee *et al*; 2015, Valdezate *et al*; 2015, Manageiro *et al* ; 2015, Papagianitsis *et al*; 2015, Barraud *et al* ; 2013). Ces éléments génétiques ont été rarement recherchés en Afrique et aucune étude ne les a décrits jusqu'à présent sur ce continent (Gassam-Sow *et al* ; 2010, Sambe-Ba *et al* ; 2013, Jacobs and Chenia, 2007, Kiiru *et al* ; 2013, Odumosu *et al* ; 2013). La majorité des travaux menés en Afrique a été effectuée dans le domaine clinique chez des bactéries à Gram négatif et seuls des intégrons de classe 1 et 2 ont été isolés (Dubois *et al* ; 2007, Franck *et al* ; 2007, Gassama-Sow *et al* ; 2007, Kiiru *et al* ; 2013, Odumosu *et al* ; 2013, Touati *et al* ; 2013, Malek *et al* ; 2015, Adesoji *et al* ; 2015). L'évaluation de l'antibiorésistance dans l'environnement en Afrique a été rarement menée (Mahero *et al* ; 2013, Igbinosa *et al*, 2013, Akoachere *et al* ; 2013, 2014). Ce constat nous a motivé à réaliser une étude au Cameroun en 2013 et 2014. Nous avons recherché dans des effluents hospitaliers recueillis à Douala et Yaoundé, les 2 plus grandes villes du Cameroun, des souches bactériennes hébergeant des IR 3. De nos travaux, 3 souches de *Delftia tsuruhatensis* hébergeant un intégron de classe 3 ont été isolées. Celles-ci ont été simultanément étudiées avec 4 autres souches de *Delftia* (2 *D. acidovorans* et 2 *D. tsuruhatensis*) environnementales isolées d'échantillons d'effluents hospitaliers et de boues activées prélevés en Allemagne (2012) et en France (2010, 2011 et 2014).

Les bactéries appartenant au genre *Delftia* sont très répandues dans l'environnement (sol, eau, boue activée) et sont considérées comme pathogènes opportunistes en milieu hospitalier (Shigumatsu *et al* ; 2003, Khan *et al* ; 2014, Shetty *et al* ; 2015, Saccheti *et al* ; 2015). En 2007, l'équipe de Xu a décrit 2 souches environnementales de *Delftia* (*D. acidovorans* et *D. tsuruhatensis*) hébergeant des intégrons de classe 3 (In3-3 et In3-4) en Amérique du Nord (Xu *et al* ; 2007).

Le support génétique des intégrons de classe 3 étudiés ici était chromosomique. L'activité d'une intégrase/recombinase codée par le gène *ial* présent en aval de tous les IR3 décrits chez les souches de *Delftia* suggère une acquisition ancienne des IR3 dans le génome de *Delftia*.

De façon surprenante, les cassettes des 7 intégrons de classe 3 étudiés (*orfA*, *orfB*, *orfC/orfD* et *orfE*) sont identiques à celles des intégrons In3-3 et In3-4 et codent des protéines de fonctions encore inconnues. La présence de réseaux de cassettes identiques chez les intégrons de classe 3 décrits chez des souches de *Delftia* isolées en Amérique, Europe et Afrique pourrait se justifier par l'expansion clonale à l'échelle mondiale de ces bactéries ceci après acquisition du même intégron de classe 3. Cette hypothèse a été proposée récemment par l'équipe de Domingues *et al* ; (2015) pour le cas des IR 1.

Une cassette *orfB* identique à celle décrite ici a été observée au sein d'un intégron de classe 1 isolé d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (Sajjad *et al* ; 2011). Une telle observation laisse suggérer qu'un échange de cassettes aurait eu lieu entre les intégrons de classe 1 et ceux de classe 3. En effet, il a été démontré que les intégrases Int1 et IntI3 sont capables d'assurer l'excision de cassettes puis leur intégration au niveau du site *attI* de recombinaison, sans qu'il y ait de spécificité de cassette pour telle ou telle classe d'intégrons (Collis *et al* ; 1993).

Des 7 souches de *Delftia* étudiées, 5 ont été isolées d'effluents hospitaliers et 2 de boues activées de stations d'épuration. Il est important de noter qu'un IR 1 portant des gènes de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques a été décrit chez les 5 souches de *Delftia* isolées d'effluent hospitalier. Des intégrons de classe 1 avec des cassettes codant des résistances aux antibiotiques avaient déjà été décrits chez une souche clinique de *D. tsuruhatensis* (KC170993) et chez 1 souche environnementale de *D. acidovorans* (KM401410) isolées dans le compartiment aquatique au Japon. Le transfert horizontal de gènes médié par les plasmides ou transposons aurait favorisé la dissémination de ces intégrons de classe 1 entre les bactéries environnementales comme présenté dans plusieurs travaux (Shülter *et al* ; 2007, Baquero *et al* ; 2008, Jury *et al* ; 2010, Rahube *et al* ; 2010). La description d'intégrons de classe 3 chez les souches environnementales de *Delftia* isolées à la fois en Amérique, en Europe et en Afrique laisse supposer que ces bactéries seraient des réservoirs de ces supports génétiques dans l'environnement.

Après description des intégrons de classe 3 comme support génétique de la résistance aux antibiotiques dans la première partie de ce travail, nous avons souhaité comprendre le mécanisme d'expression du gène de l'intégrase *intI3* et de celui des cassettes chez les intégrons de classe 3. Les travaux menés dans la suite font partie du volet fondamental de ce travail de thèse.

Dans une première étape, le travail a consisté en la caractérisation du promoteur du gène de l'intégrase des intégrons de classe 3. La technique 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA End) employée a consisté en la recherche du nucléotide (+1) qui marque le début de la transcription du gène de l'intégrase *intI3* puis, en la caractérisation du promoteur de ce gène.

Dans une première étude menée en 2002, il a été mis en évidence l'existence de 2 promoteurs putatifs, *PintI3(1)* et *PintI3(2)*, capables d'assurer l'expression du gène *intI3* (Collis *et al* ; 2002a). Les travaux de cette équipe ont été réalisés à partir du premier intégron de classe 3 (In3-1) isolé d'une souche clinique de *S. marcescens* par l'équipe d'Arakawa (Arakawa *et al* ; 1995). Un alignement de toutes les séquences d'intégrons de classe 3, a permis de confirmer l'existence de ces 2 promoteurs putatifs. A l'issue des expériences de 5'RACE réalisées, nous avons démontré que c'est le promoteur *Pint3(1)* (Figure 7) qui est celui qui assure l'expression du gène *intI3*. Les transcrits obtenus naissent à partir de l'adénine « A » correspondant au codon START putatif de l'intégrase (Collis *et al* ; 2002a) ; ce (+1) de transcription se situe à 6 pb du promoteur *Pint3(1)* caractérisé. La localisation du (+1) de transcription dans le codon START putatif du gène *intI3*, laisse envisager que le vrai codon START de la protéine IntI3 se situerait plus en aval. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Shultzaberger *et al* ; qui ont montré que la distance moyenne entre un promoteur et le codon start du gène transcrit est de 35 pb (Shultzaberger *et al* ; 2007).

Dans cette région se trouve le nucléotide (+1) de transcription et la zone d'initiation de la traduction encore appelée Séquence Shine-Dalgarno (Chen *et al* ; 1994). Chez les intégrons de classe 3, le codon START putatif majoritairement décrit et codant pour une méthionine est un ATG (Figure 2, partie 1). Toutefois, chez les intégrons In3-5 et In3-10, ce START putatif est un ATA (Isoleusine). Cette observation couplée à nos résultats reconforte l'hypothèse de émise précédemment (le vrai codon START plus en aval dans le gène *intI3*). Le triplet GTG codant pour une valine présente chez tous les intégrons de classe 3 décrits et situé à 55 pb du codon START putatif (ATG) a été proposé comme pouvant servir de START potentiel du gène *intI3* (Barraud *et al* ; 2013).



L'analyse *in silico* des régions promotrices (Figure 10) du gène *intI3* des IR3 présents dans la base de données INTEGRALL (Moura *et al* ; 2009) et nos travaux ont permis de définir 4 variants du promoteur *PintI3(1)* (Tableau 4). Cette analyse a aussi permis de mettre en évidence la présence d'un site de fixation de la protéine LexA (boîte LexA) qui chevauche chaque variant de *PintI3(1)*. Une étude antérieure avait déjà noté l'existence de la boîte LexA dans les régions promotrices des gènes *intI* des autres intégrons (Guérin *et al* ; 2009, Cambray *et al* ; 2011). La protéine Lex A est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS (Walker ; 1984).

Chez les IR3, on distingue 3 séquences de la boîte LexA : 5'- CTGTTCATGTATCCAG-3' (chez In3-5) ; CTGTTCATGCATCCGG-3' (chez In3-7) et 5'-CTGTTCATGCATCCAG-3' (chez les intégrons In3-1, In3-2, In3-3, In3-4, In3-6, In3-8 et In3-9). La séquence d'In3-7 a été décrite au cours de nos travaux. Les bases en gras indiquent les mutations observées et celles qui sont soulignées aux extrémités 5' et 3' sont décrites comme étant très conservées dans les sites de fixation de LexA et essentielles pour la fonctionnalité du site (Joan Riera & Jordi Barbé ; 1993, 1995 ; Wade *et al* ; 2005, Erill *et al* ; 2007 Guérin *et al* ; 2009).

Des essais de retard sur gel précédemment réalisés au laboratoire dans l'objectif d'étudier la fonctionnalité des sites LexA ont montré que, comme chez les intégrons de classe 1 (Guérin *et al* ; 2009, Cambray *et al* ; 2011), les 2 variants du site LexA chez In3-1 et In3-5 sont fonctionnels (Barraud ; 2011). La présence de la mutation (CAG Vs CGG) du site chez In3-7 pourrait empêcher la reconnaissance spécifique de ce site par la protéine LexA. Des essais de retard sur gel avec la séquence d'ADN présente dans In3-7 seront menés au sein du laboratoire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

La réponse SOS est un système global de régulation induite à la suite des dommages à l'ADN (Walker, 1984). Ces dommages peuvent être dûs à divers agents parmi lesquels les antibiotiques (Erill *et al* ; 2007). Les travaux de Guérin ont démontré que chez les IR1, la réponse SOS est induite par les antibiotiques (ciprofloxacine, ampicilline, triméthoprime) ; il s'en suit une surexpression du gène *intI1* qui s'accompagne d'une augmentation de la fréquence de recombinaison (excision) des cassettes (Guérin *et al* ; 2009).

Les IR3 décrits au cours de notre étude ont été isolés au sein des bactéries environnementales (effluents hospitaliers et boues activées). Ces bactéries sont soumises dans ces écosystèmes aux pressions de sélection (liées à la présence d'antibiotiques, de composés chimiques, stress nutritif...) susceptibles d'induire la réponse SOS. (Kümmerer *et al* ; 2003 ; 2004, Stalder *et al* ; 2014). Les antibiotiques (ciprofloxacine et norfloxacine) 'inducteurs de la réponse SOS ont été détectés dans le compartiment aquatique (Ahmad *et al* ; 2013). La présence de ces antibiotiques dans le contexte clinique et environnemental laisse envisager que la transcription d'*intI3* pourrait-être également induite par la réponse SOS d'autant plus que, la fonctionnalité de la boîte LexA chevauchant le promoteur *PintI3(1)* a été démontrée. Ainsi, dans les conditions de stress, une cassette éloignée du réseau d'un IR3 pourra être rapprochée du promoteur *Pc* pour être mieux exprimée comme démontré récemment chez les IR1 (Barraud *et al* ; 2015). Sur la base de ces données, nous pouvons suggérer que les IR3 pourraient jouer un rôle important dans la dissémination des cassettes impliquées dans la résistance aux antibiotiques.

Nous avons dans la première partie du volet fondamental caractérisé le promoteur du gène *intI3*. La présence des différents variants de ce promoteur (*PintI3(1)*) et de celui des cassettes *Pc*, laisse supposer que le niveau d'expression du gène *intI3* et des gènes de cassettes, pourrait varier en fonction du variant du promoteur présent.

Nous avons jugé intéressant de mener une étude visant à évaluer la force des différents variants de ces promoteurs. Cette étude fait l'objet de la deuxième partie de ce volet fondamental.

L'alignement des séquences des IR3 nous a montré qu'il existe 4 variants de Pc chez les IR3. Ces variants ont été nommés ici Pc\_In3-134 (chez In3-1, In3-3 et In3-4) ; Pc\_28 (chez In3-2 et In3-8) ; Pc\_In3-579 (chez In3-5, In3-7 et In3-9) et Pc\_In3-6 (chez In3-6).

Les résultats présentés dans la figure 17 A, montrent que les 4 variants de Pc présentés ci-dessus sont fonctionnels. Les résultats du test t de Student ont montré qu'il existe une différence significative entre les moyennes des essais de bêtagalactosidase ( $p < 0,05$ ) laissant conclure que les 4 variants de Pc présentent des forces relatives distinctes. Les Pc\_In3-6 et Pc\_In3-28 sont les variants les plus efficaces. Parmi ces variants, l'activité du Pc le plus fort Pc\_In3-6 (TAGACA – N<sub>3</sub>-GCT-N<sub>11</sub>- TAGACT) était 7 fois plus grande que celle du Pc\_In3-579 le plus faible ( $p < 0,001$ ). Chez les IR1, il a été montré que le promoteur le plus fort PcS (Pc Strong) est 25 fois plus fort que le Pc faible ou PcW (Pc Weak) (Jové *et al* ; 2010). Le Pc\_In3-6 a présenté une force relative 2 fois plus importante que celle du variant Pc\_In3-28 (TAGACA – N<sub>3</sub>-GCT-N<sub>11</sub>- TAGGAT). Les promoteurs Pc\_In3-579 (TAGACA – N<sub>3</sub>-GCT-N<sub>11</sub>- TAGGCT) et Pc\_In3-134 (TAGACA – N<sub>3</sub>-GCC-N<sub>11</sub>- TAGGCT) sont les moins actifs.

Nous pouvons ranger les variants de Pc des IR3 par ordre de force relative décroissante : Pc\_In3-6 > Pc\_In3-28 > Pc\_In3-134 > Pc\_In3-579.

L'activité transcriptionnelle plus importante des PcIn3-6 et PcIn3-28 se justifierait par une similarité plus forte des boîtes -10 de ces promoteurs (TAGACT pour Pc\_In3-6 et TAGGAT du Pc\_In3-2) à la séquence consensus (TATAAT) décrite chez *E. coli*. Les séquences TAGGCT et TAGGCT sont les boîtes -10 respectives des promoteurs Pc\_In3-134 et Pc\_In3-579 ; les bases soulignées étant communes.

Notre hypothèse pourrait être soutenue par le fait qu'il a été démontré que les mutations localisées dans les éléments fonctionnels « -35 » et « -10 » (Shulzaberger *et al* ; 2007) affectent la première étape d'initiation de la transcription du promoteur et donc son efficacité. Les mutations qui créent des séquences d'hexamères se rapprochant de la séquence consensus décrite chez *E. coli* (« -35 » : TTGACA et « -10 » : TATAAT) entraînent une amélioration de la force du promoteur et celles qui s'en éloignent diminuent la force de ce dernier (Moyle *et al* ; 1991, McClure ; 1995). A noter que In3-6 a été décrit dans une souche de *Acinetobacter johnsonii* et que la force du variant de Pc\_In3-6 chez cette espèce diffère probablement de celle mesurée dans des conditions expérimentales chez *E. coli*. Les promoteurs les plus faibles Pc\_In3-579 et Pc\_In3-134 se différencient par une mutation dans le spacer. Les moyennes des activités bêtagalactosidase sont significativement différentes ( $p < 0,01$ ) ; le Pc\_In3-134 étant 1,5 fois plus efficace que le Pc\_In-579. Ce résultat serait probablement favorisée par la présence de cette mutation. Notre observation est contraire à celle obtenue par l'équipe de Gaal (Gaal *et al.* 1989). Leurs expériences ont montré que la mutation de la base située à la même position que la nôtre dans le spacer a entraîné une légère diminution de l'activité du promoteur *rrnBP1* du gène de l'ARN ribosomal chez *E. coli*.

Des résultats présentés ci-dessus nous pouvons observer que des 9 IR3 caractérisés, 6 hébergent un variant de Pc faible (Pc\_In3-134 présent chez In3-1, In3-3, In3-4 et le Pc\_In3-579 décrit chez In3-5, In3-7 et In3-9). De plus, la séquence du Pc présent chez les intégrons de classe 3 décrits chez les 7 souches de *Delftia sp.* isolées au cours de notre étude est identique à celle du Pc\_In3-134. La prédominance de promoteurs faibles a aussi été mise en évidence chez les IR1 isolés des bactéries cliniques (Jové ; 2010) et environnementales (Moura *et al* ; 2012). La rareté des promoteurs forts laisse supposer que, chez la majorité d'IR3, les gènes des cassettes présents dans la région variable seraient faiblement exprimés.

Chez les intégrons de classe 1, il a été démontré que le polymorphisme du Pc crée 3 allèles d'intégrases IntI1 et l'activité de recombinaison des cassettes (excision des cassettes) est inversement proportionnelle à la force du promoteur présent (Jové *et al* ; 2010). Chez les intégrons de classe 3, la mutation dans la boîte « -10 » du Pc des IR3 In3-2 et In3-8 entraîne un changement d'acide aminé (S34→I) dans l'intégrase. En plus de cette mutation, celles observées dans la région N-terminale des intégrases IntI3 des intégrons In3-1 (AF416297), In3-5(HE616889) et In3-7 (KT736121) n'affectent ni le site catalytique ni les domaines impliqués dans la fonctionnalité des intégrases (Messier et Roy ; 2001). Ces mutations n'auraient donc pas un impact sur l'activité de recombinaison des cassettes.

Nous avons montré dans la partie 3 que l'expression d'*intI3* est sous la dépendance du promoteur *PintI3(1)*. Il existe 4 variants de ce promoteur (*PintI3(1)* \_In3-29, *PintI3(1)* \_In3-3456, *PintI3(1)* \_In3-7 et *PintI3(1)* \_In3-1) et chacun possède une force qui lui est propre (Figure17 B). A l'issue de nos essais, il en ressort que le variant de *PintI3(1)* le plus fort est celui des intégrons In3-3, In3-4, In3-5 et In3-6 (*PintI3(1)*\_In3-3456 : TTGACA-N<sub>17</sub> - **CATACT**). La différence entre les moyennes des 4 variants de promoteurs *PintI3(1)* testés est significative (p<0,05). Le promoteur *PintI3(1)*\_In3-3456 est 3 fois plus fort que les promoteurs *PintI3(1)*\_In3-29 (TTGACA-N<sub>17</sub>-**CTTACT** d'In3-2 et In3-9) et 1,3 fois plus efficace que *PintI3(1)*\_In3-7 (TTGACA-N<sub>17</sub> -**CATACC** de l'intégron In3-7). L'activité plus forte de *PintI3(1)*-In3-3456 serait comme proposé précédemment liée à la forte similarité de son hexamère (« -10 » **CATACT**) à la séquence consensus de la boîte -10 TATAAT décrite chez *E. coli*. De plus, la conservation à la fois des bases -7T et -11A (en gras) de la boîte -10 qui jouent un rôle crucial dans l'initiation de la transcription (Schroeder *et al* ; 2007) pourrait aussi justifier l'efficacité plus importante de ce promoteur par rapport aux 3 autres variants.

La mutation de la base -11 en violet (-11A → T) observée dans la boîte -10 du *PintI3(1)*-In3-29 aurait contribué à la baisse de l'efficacité de ce promoteur par rapport au promoteur le plus fort *PintI3(1)*\_In3-3456. Le promoteur le plus faible *PintI3(1)*-In3-7 se différencie des promoteurs les plus actifs *PintI3(1)*\_In3-3456 et *PintI3(1)*\_In3-29 par les mutations des bases respectives -7 (-7T → C) et -11 (-11 → A). L'effet de ces mutations sur l'activité de ce promoteur laisse conclure que la mutation affectant le T à la position -7 aurait un effet délétère plus important sur l'activité du promoteur de l'intégrase. Malgré la présence de séquences identiques des 2 boîtes « -35 » et « -10 », les promoteurs *PintI3(1)*\_In3-1 et *PintI3(1)*\_In3-3456 ont des forces relatives significativement différentes ( $p < 0,01$ ); le premier promoteur étant 1,8 fois plus faible que le second (Figure 17B). La différence de force serait due à la présence de la mutation dans le spacer (en aval du -35) comme cela a été démontré expérimentalement au cours des travaux effectués par l'équipe de Gaal (Gaal *et al* ; 1989).

Les promoteurs Pc et *PintI3(1)* sont physiquement proches et les (+1) de transcription sont distant de moins de 200 pb. Une telle organisation structurale et la variabilité des intensités des forces de ces 2 promoteurs (Tableau 12), nous amène à se poser la question d'une possible interférence transcriptionnelle entre Pc et *PintI3(1)* comme décrit chez les intégrons de classe 1 (Guérin *et al* ; 2011).

L'interférence transcriptionnelle est définie comme l'influence d'un flux transcriptionnel sur un autre en *cis*, c'est-à-dire sur la même molécule d'ADN (Shearwin, Callen et Egan, 2005). Chez les intégrons In3-5 et In3-9 par exemple, nous pouvons envisager l'existence d'un tel phénomène du fait de l'existence des forces relatives différentes entre les promoteurs Pc et *PintI3(1)*. Des essais complémentaires seront réalisés dans les mêmes conditions biologiques afin de vérifier l'hypothèse émise précédemment

## Conclusion et perspectives

Les intégrons constituent des systèmes ingénieux de capture et de dissémination des gènes de résistance sous forme de cassettes. Bien qu'ayant été décrits seulement à la fin des années 1980, le rôle de ces supports génétiques dans l'acquisition de la résistance bactérienne a été très bien établi. Parmi les intégrons impliqués dans la résistance, ceux appartenant à la classe 3 (IR3) demeurent encore peu étudiés par rapport aux intégrons de classe 1 et 2. Nos travaux de thèse ont porté sur l'étude épidémiologique et fondamentale des IR3 dans le contexte environnemental. Les analyses effectuées dans le volet épidémiologique ont permis d'une part de décrire 3 nouveaux IR3 isolés en Europe (France et Luxembourg) et d'autre part de mettre en évidence pour la première fois la présence d'intégrons de classe 3 en Afrique (Cameroun). Au Cameroun, les travaux ont été menés uniquement dans les 2 plus grandes villes Douala et Yaoundé. Il serait intéressant pour la suite d'étendre les travaux dans d'autres zones géographiques et de diversifier les sites d'échantillonnage afin de réaliser une étude épidémiologique plus approfondie des IR3 dans ce pays.

Depuis la découverte du premier IR3, quelques travaux ont été menés afin de comprendre le fonctionnement de ces intégrons. Nous avons complété ces données grâce aux travaux réalisés dans le volet mécanistique. Nous avons caractérisé le promoteur *PintI3* du gène de l'intégrase des IR3 et avons montré que les différents variants de ce promoteur et de celui des cassettes (Pc) sont fonctionnels. La caractérisation du *PintI3* nous a laissé supposer que le codon START précédemment proposé par Collis (Collis *et al* ; 2002a) serait situé plus en aval dans le gène *intI3*. Il serait donc important d'approfondir les travaux afin de vérifier cette hypothèse.

De plus, la localisation des régions promotrices des IR3 étant similaire à celle des IR1, nous avons suggéré qu'il pourrait exister des interférences lors des activités transcriptionnelles de ces promoteurs. Des travaux futurs sont envisagés dans le but de voir quel pourrait être l'effet de la transcription des gènes de cassettes sur l'expression du gène de l'intégrase chez les IR3.

Bien qu'étant les moins prévalents dans le contexte clinique, les IR3 seraient, comme signalés dans les travaux antérieurs, abondants dans l'environnement. Leur rôle dans la dissémination de la résistance dans cet écosystème serait donc important.



## Références bibliographiques

- Adesoji, A. T., Ogunjobi, A. A., & Olatoye, I. O. (2015). Molecular characterization of selected multidrug resistant *Pseudomonas* from water distribution systems in southwestern Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *14*(1).
- Ahmad, M., Khan, U. A., Wahid, A., Ali, S. A., & Ahmad, F. (2013). Role Of Untreated Waste Water In Spread Of Antibiotics And antibiotic Resistant Bacteria In River. *Pakistan journal of Science*, *65*(1), 10–14.
- Akoachere, J.-F. T. K., Masalla, T. N., & Njom, H. A. (2013). Multi-drug resistant toxigenic *Vibrio cholerae* O1 is persistent in water sources in New Bell-Douala, Cameroon. *BMC infectious diseases*, *13*(1), 366.
- Akoachere, J.-F. T., & Mbuntcha, C. K. (2014). Water sources as reservoirs of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 strains in Bepanda, Douala (Cameroon): relationship between isolation and physico-chemical factors. *BMC infectious diseases*, *14*(1), 421.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Nobuo, K., & Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(7), 1612–1615.
- Baltazar, M., Ngandjio, A., Holt, K. E., Lepillet, E., Pardos de la Gandara, M., Collard, J.-M., Bercion, R., Nzouankeu, A., Le Hello, S., Dougan, G., Fonkoua, M.-C., & Weill, F.-X. (2014). Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serotype Typhi Gulf of Guinea Region Africa. *Emerging Infectious Diseases*; *21* (4): 655-59.
- Barkovskii, A. L., Green, C., & Hurley, D. (2010). The occurrence, spatial and temporal distribution, and environmental routes of tetracycline resistance and integrase genes in *Crassostrea virginica* beds. *Marine Pollution Bulletin*, *60*(12), 2215–2224.
- Barlow, R. S., & Gobius, K. S. (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(6), 1133–1138.
- Barraud, O., (2011). Intégrons de résistance et pression de sélection antibiotiques. Thèse de Doctorat, 163p.
- Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M.-C. (2013). An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(7).

- Barraud, O., & Ploy, M.-C. (2015). Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *Journal of Bacteriology*, 197(13), 2171–2178.
- Bastista Rensede, A. C., dos Santos, D. B., do Carmo Filho, J. R., de Bastos Ascenso Soares, R., & Montalvao E. R., (2009). Detection of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia, Brazil. 33(4):385-391.
- Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265.
- Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(6969), 72–74.
- Bennett, P. M. (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(1), 1–4.
- Biskri, L., & Mazel, D. (2003). Erythromycin Esterase Gene *ere(A)* Is Located in a Functional Gene Cassette in an Unusual Class 2 Integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3326–3331.
- Bouvier, M., Demarre, G., & Mazel, D. (2005). Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *The EMBO journal*, 24(24), 4356–4367.
- Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, É., Da Re, S., González-Zorn, B., Ploy, M.-C., Babé, J., Mazel, D., & Erill, I., (2011). Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mobile DNA*, 2(6), 2–15.
- Cao, X., Xu, X., Zhang, Z., Shen, H., Chen, J., & Zhang, K. (2014). Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 13, 16.
- Centron, D., & Roy, P. H. (2002). Presence of a Group II Intron in a Multiresistant *Serratia marcescens* Strain That Harbors Three Integrons and a Novel Gene Fusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1402–1409.

- Chen, H., Bjercknes, M., Kumar, R., & Jay, E. (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine–Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic acids research*, 22(23), 4953–4957.
- Cicek, A. C., Saral, A., Duzgun, A. O., Cizmeci, Z., Kayman, T., Balci, P. O., Dal, T., Firat, M., Yazici, Y., Sancaktar, M., Ozgumus B. O., & Sandalli, C. (2013). Screening of Class 1 and Class 2 Integrons in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Collected from Seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. *Open Journal of Medical Microbiology*, 03(04), 227-233.
- Clark, C. A., Purins, L., Kaewrakon, P., Focareta, T., & Manning, P. A. (2000). The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology*, 146(10), 2605–2612.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*; 1(2):581-85.
- Collis, C. M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Molecular microbiology*, 9(1), 41–52.
- Collis, C. M., & Hall, R. M. (1992). Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *Journal of Bacteriology*, 174(5), 1574–1585.
- Collis, C. M., & Hall, R. M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(1), 155–162.
- Collis, C. M., & Hall, R. M., (2004). Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. *Microbiology*, 150(5), 1591-1601.
- Collis, C. M., Kim, M.-J., Stokes, H. W., & Hall, R. M., (1998). Binding of purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Molecular Microbiology*, (29)2: 477-490.
- Collis, C. M., Recchia, G. D., Kim, M.-J., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2001). Efficiency of Recombination Reactions Catalyzed by Class 1 Integron Integrase IntI1. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2535–2542.

- Collis, C. M., Kim, M.-J., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2002b). Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-bp site. *Molecular microbiology*, 46(5), 1415–1427.
- Collis, C. M., Kim, M.-J., Partridge, S. R., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2002a). Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines. *Journal of Bacteriology*, 184(11), 3017–3026.
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M. J., Lito, L. M., Cristino, J. M., Mendo, S., & Duarte, A. (2003). Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2838–2843.
- Da van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K., & Mevius, D., (2007). Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter spp.* in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 59, 746–750.
- Da Fonseca, E., L., dos Santos Freitas, F., & Paulo Vicente, A. C., (2011). Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 66:797-801.
- Del Castillo, D. R., Bou, G., Pascual, A., Martinez-Martinez, L (2015). Detection of a clinical class 3 integron in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* containing OXA-434.. Poster 1014, ECCMID 2015.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Biang, W., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1).
- Domingues, S., da Silva, G., J., & Nielsen K. M. Global dissemination patterns of common gene cassette array in class 1 integrons. *Microbiology*; 161:1313-1361.
- Dubois, V., Parizano, M.-P., Arpin, C., Coulange, L., Beziau, M.-C., & Quentin, C. (2007). High Genetic Stability of Integrons in Clinical Isolates of *Shigella spp.* of Worldwide Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1333–1340.
- Erill, I., Campoy, S., & Barbé, J. (2007). Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(6), 637–656.

- Fluit, A. C., & Schmitz, F.-J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4), 272–288.
- Frank, T., Gautier, V., Talarmin, A., Bercion, R., & Arlet, G. (2007). Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 742-745.
- Francia, M. V., Avila, P., De la Cruz, F., & Lobo, J. G. (1997). A hot spot in plasmid F for site-specific recombination mediated by Tn21 integron integrase. *Journal of bacteriology*, 179(13), 4419–4425.
- Gaal, T., Barkei, J., Dickson, R. R., Alavi, H., Gourse, R. L., & others. (1989). Saturation mutagenesis of an Escherichia coli rRNA promoter and initial characterization of promoter variants. *Journal of bacteriology*, 171(9), 4852–4861.
- Gassama-Sow, A., Aïdara-Kane, A., Barraud, O., Gatet, M., Denis, F., & Ploy, M.-C., 2010. High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. *Journal of Infection in Developing Countries*; 4(4):207-212.
- Gassama Sow, A., Diallo, M. H., Gatet, M., Denis, F., Aidara-Kane, A., & Ploy, M.-C. (2008). Description of an unusual class 2 integron in *Shigella sonnei* isolates in Senegal (sub-Saharan Africa). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(4), 843–844.
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., & Stokes, H. W. (2008a). The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(14), 5095–5100.
- Gillings, M. R., Krishnan, S., Worden, P. J., & Hardwick, S. A. (2008b). Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS Microbiology Letters*, 287(1), 56–62.
- Goldstein, C., Lee, M. D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Summers A. O., Sanchez, S., Grady, M., White, A. G., Hudson, C., Liebet, C., & Maurer, J. J. (2001). Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 723–726.

- Guerin E, Cambray G, Da Re S Gonzalez-Zorn, B., Jordy, B., Ploy, M.-C., & Mazel, D (2010). The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons. *Medecine Sciences, Paris*, 26:28-30.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Jordy, B., Ploy, M.-C., & Mazel, D. (2009). The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science*, 324(5930), 1034–1034.
- Guerin, E., Jove, T., Tabesse, A., Mazel, D., & Ploy, M.-C. (2011). High-Level Gene Cassette Transcription Prevents Integrase Expression in Class 1 Integrons. *Journal of Bacteriology*, 193(20), 5675–5682.
- Guney A. K., Yildirim, T., & Durupinar, B., (2014). A Study on Class I Integrons and Antimicrobial Resistance among Clinical Staphylococci Isolates from a Turkish Hospital. *Clinical Microbiology*; 3:6.
- Guo, S., Li, Y., Chu, J., Wang, L., Zhao, X., Zhong, N., Qui1, S., Chen, J., & Li, Y., J. (2013). First observation of excision and integration in Class 1 integron in staphylococci. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12847–12851.
- Hall, R. M., Brookes, D. E., & Stokes, H. W. (1991). Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Molecular microbiology*, 5(8), 1941–1959.
- Hall, R. M. & Collis, C. M. (1998). Antibiotic resistance in gram- negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates*; (1): 109-119.
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular microbiology*, 15(4), 593–600.
- Hall, R. M.,(1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria. *Novartis Foundation Symposium*. P 192-205.
- Hall, R. M., Collis, C. M., Kim, M.-J., Partridge, S. R., Recchia, G. D., Stokes, H. W. (1999). Mobile Gene Cassette and Integrons in Evolution. *Annals New York Academy of Sciences*; p 68-80
- Hansson, K., Sundstrom, L., Pelletier, A., & Roy, P. H. (2002). IntI2 Integron Integrase in Tn7. *Journal of Bacteriology*, 184(6), 1712-1721.

- Hardwick, S. A., Stokes, H. W., Findlay, S., Taylor, M., & Gillings, M. R. (2008). Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 278(2), 207–212.
- Harms, K., Starikova, I., & Johnsen, P. J. (2013). Costly Class-1 integrons and the domestication of the the functional integrase. *Mobile Genetic Elements*, 3(2), e24774.
- Igbinosa, I. H., Chigor, V. N., Igbinosa, E. O., Obi, L. C., & Okoh, A. I. (2013). Antibiogram, Adhesive Characteristics, and Incidence of Class 1 Integron in *Aeromonas* Species Isolated from Two South African Rivers. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
- Islam, M. J., Uddin, M. S., Hakim, M. A., Das, K. K., & Hasan, M. N., (2008). Role of untreated liquid hospital waste to the development of antibiotic resistant bacteria. *Journal of Innovation and Development Strategy*; 2(2):17-21.
- Jacobs, L. and Chenia, HY. (2007). Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas spp.* isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*; 114(3): 295-306.
- Jechalke, S., Broszat, M., Lang, F., Siebe, C., Smalla, K., & Grohmann, E. (2015). Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Jové, T., (2010). Régulation de l'expression des gènes de cassettes et de l'intégrase des intégrons de multirésistance aux antibiotiques. Thèse de doctorat, 195p.
- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.C. (2010). Inverse Correlation Between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 integrons. *PLoS Genetics*, 6(1).
- Jury, K. L., Vancov, T., Stuetz, R. M., & Khan, S. J. (2010). Antibiotic resistance dissemination and sewage treatment plants. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2, 509–510.
- Kargar, M., Mohammadalipour, Z., Doosti, A., Lorzadeh, S., & Japoni-Nejad, A. (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheogenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5(4), 193–198.

- Khan, S. F., & Krishnan, T. (2015). *Delftia acidovorans* Skin Infection Occurring in a Diabetic with Peripheral Edema. *Journal of Case Reports*, 4(1), 127–131.
- Kiiru, J., Butaye, P., Goddeeris, B. M., & Kariuki, S. (2013). Analysis for prevalence and physical linkages amongst integrons, *ISEcp1*, *ISCR1*, *Tn21* and *Tn7* encountered in *Escherichia coli* strains from hospitalized and non-hospitalized patients in Kenya during a 19-year period (1992–2011). *BMC microbiology*, 13(1), 109.
- Koczura, R., Przyszlakowska, B., Mokracka, J., & Kaznowski, A. (2014). Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance of Clinical *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* Complex in Poznań, Poland. *Current Microbiology*, 69(3), 258–262.
- Kummerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 5–7.
- Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 311–320.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., & Petit, F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France): Antibiotic-resistant *E. coli* from an estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 118–130.
- Larouche, A., & Roy, P. H. (2011). Effect of *attC* structure on cassette excision by integron integrases. *Mobile DNA*, 2(3).
- Lee, H. J., Jin, H. M., Park, M. S., Park, W., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. (2015). Recovery of Plasmid pEMB1, Whose Toxin-Antitoxin System Stabilizes an Ampicillin Resistance-Confering  $\beta$ -Lactamase Gene in *Escherichia coli*, from Natural Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 40–47.
- Leon, G., Quiroga, C., Centron, D., & Roy, P. H. (2010). Diversity and strength of internal outward-oriented promoters in Group IIC-*attC* introns. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 8196–8207.



- Leon, G., & Roy, P. H. (2009). Potential Role of Group IIC-*attC* Introns in Integron Cassette Formation. *Journal of Bacteriology*, 191(19), 6040–6051.
- Loot, C., Ducos-Galand, M., Escudero, J. A., Bouvier, M., & Mazel, D. (2012). Replicative resolution of integron cassette insertion. *Nucleic Acids Research*, 40(17), 8361–8370.
- Mahero, M., Byarugaba, D.K., Doetkott D.K., Olet, S. & Khaitisa, M.L., (2013). Antimicrobial Resistance and Presence of Class 1 Integrons in *Salmonella* Serovars Isolated from Clinical Cases of Animals and Humans in North Dakota and Uganda. *Clinical Microbiology*; 2:6
- Malek, M. M., Amer, F. A., Allam, A. A., El-Sokkary, R. H., Gheith, T., & Arafa, M. A. (2015). Occurrence of classes I and II integrons in Enterobacteriaceae collected from Zagazig University Hospitals, Egypt. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Almeida, J., Barbosa, S., & Simoes, C. (2015). Predominance of KPC-3 in a Survey for Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Portugal. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56 (9). 3588-3592.
- Marti ,C., Timm, J., Rauzier, J., Gomes-Lus, R., Davies, J., & Gicquel, B., (1990). Transposition of an antibiotic resistance element in *Mycobacteria*. *Nature*, 21:345 (6277):739-43.
- Marquez, C., Labbate, M., Ingold, A. J., Chowdhury, P. R., Ramirez, M. S., Centron, D., Ingold A. J., Borthagaray, G., Chowdhury, P. R., & Stokes, H. W. (2008). Recovery of a Functional Class 2 Integron from an *Escherichia coli* Strain Mediating a Urinary Tract Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 4153–4154.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 608–620.
- Mazel, D. (2010). “Integrons: agents of bacterial evolution”. *Nature Revue Microbiology*, 4(08), 608-620.
- Mazel, O., Dychinco, B., Webb, V. A., Davies, J. (1998). A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio cholerae* Genome. *Science*, 280.
- McClure ; 1995). McClure, W.R.1995. Mechanisms and control of transcription initiation in procaryotes. *Annuals Review of Biochemistry*.54: 171-204.

- Messier, M. & Roy, P. H. (2001). Integron Integrases Possess a Unique Additional Domain Necessary for Activity. *Journal of Bacteriology*, 183(22);6699-6706
- Mostafa, M., Siadat, S. D., Shahcheraghi, F., Vaziri, F., Japoni-Nejad, A., Vand Yousefi, J., Rajaei, B., Mood, H. E., Zadeh, N. E., Moshiri, M., Seyed Siamdoust, S. A., Rahbar, M. (2015). Variability in gene cassette patterns of class 1 and 2 integrons associated with multi drug resistance patterns in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Tehran-Iran. *BMC Microbiology*, 15(1).
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., & Correia, A. (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Research in Microbiology*, 161(1), 58–66.
- Moyle, H., Waldburger, C., & Susskind, M. M. (1991). Hierarchies of base pair preferences in the P22 ant promoter. *Journal of bacteriology*, 173(6), 1944–1950.
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2001). Characterization of In53, a Class 1 Plasmid- and Composite Transposon-Located Integron of *Escherichia coli* Which Carries an Unusual Array of Gene Cassettes. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 235–249.
- Nagy, I., Schoofs, G., Vanderleyden, J., & De Mot, R. (1997). Transposition of the IS21-related element IS1415 in *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of bacteriology*, 179(14), 4635–4638.
- Namvar, A. E., Khodaei, F., Bijari, A., & Lari, A. R. (2015). Detection of integrons and Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec) types in *Staphylococcus aureus* isolated from burn and non-burn patients. *International journal of health sciences*, 9(4), 440.
- Nandi, S., Maurer, J. J., Hofacre, C., & Summers, A. O. (2004). Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7118–7122.
- Nesvera, J., Hochmannova, J., & Patek, M. (1998). An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letter*; 169: 391-395.

- Nunes-Düby, S. E., Kwon, H. J., Tirumalai, R. S., Ellenberger, T., & Landy, A. (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic acids research*, 26(2), 391–406.
- OMS, (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. Disponible sur le site [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)
- Odumosu, B. T., Adeniyi, B. A., & Chandra, R. (2013). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Annual of Clinical Microbiology Antimicrobials* 12, 29.
- Paiva, M. C., Ávila, M. P., Reis, M. P., Costa, P. S., Nardi, R. M. D., & Nascimento, A. M. A. (2015). The Microbiota and Abundance of the Class 1 Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge. *PLOS ONE*, 10(6).
- Pan, J.-C. Ye, R., Meng, D.-M., Zhang, W., Wang, H.-Q., & Liu K.-Z. (2006). Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 288–296.
- Partridge, S. R., Recchia, G. D., Scaramuzzi, C., Collis, C. M., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2000). Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology*, 146(11), 2855–2864.
- Papagiannitsis, C. C., Dolejska, M., Izdebski, R., Dobiasova, H., Studentova, V., Esteves, F., Lennie, P., Derde, G., Bonten, M.J.N., Hrabak, J., & Gniadkowski, M. (2015). Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1  $\beta$ -Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 5065–5068.
- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 757–784.
- Pavelkovich, A., Balode, A., Edquist, P., Egorova, S., Ivanova, M., Kaftyreva, L., Iyanova, M., Lipskaya, L., Rööp, T., Kaftyreva, L., Miciuleviciene, J., Sepp, E., Konovalenko, I., Stsepetova, J., Pai, K., Koljalg, S., Pary, K. & Naaber, P. (2014). Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in the Baltic Countries and St. Petersburg Area. *BioMed Research International*, 2014, 1–7.

- Peymani, A., Farajnia S., Nahaei, M. R., Sohrabi, N., Abbasi, L., Ansarin, K., & Azrari, F., (2012). Prevalence of Class 1 Integron Among Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. in Tabriz, Northwest of Iran. *Polish Journal of Microbiology*; 61(1): 57-60.
- Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R., & Nordmann, P. (2010). A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1594-1598.
- Quiroga, C., Roy, P. H., & Centron, D. (2008). The S.ma.I2 class C Group II intron inserts at integron *attC* sites. *Microbiology*, 154(5), 1341-1353.
- Rahube, T. O., & Yost C. K., (2010). Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *African Journal of Biotechnology*; 9 (54), 9183-9190.
- Ramirez, M. S., Quiroga, C., & Centron, D. (2005a). Novel Rearrangement of a Class 2 Integron in Two Non-Epidemiologically Related Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 5179-5181.
- Ramirez, M. S., Vargas, L. J., Cagnoni, V., Tokumoto, M., & Centron, D. (2005b). Class 2 Integron with a Novel Cassette Array in a *Burkholderia cenocepacia* Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4418-4420.
- Recchia, G. D. & Hall, R. M. (1995). Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in IncQ plasmid RSF1010. *Molecular Microbiology*, 15(1), 179-187.
- Recchia G. D., & Hall, R. M. Hall. (1997).Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Reviews Trends of Microbiology*, 5(10), 389-394.
- Recchia, G. D., Stokes, H. W., & Hall, R. M., (1994). Characterization of specific and secondary recombination sites recognized by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Research* 22(11):2071-2078.
- Riera, J., & Barbé, J., (1995).Cloning, sequence and regulation of expression of the *lexA* gene of *Aeromonas hydrophila* Gene, 154:71-75.
- Riera, J., & Barbé, J., (1993).Sequence of the *Providencia rettgeri lexA* gene and its control region. *Nucleic Acids Research*; 21(9).

- Roe, M. T., Vega, E., & Pillai, S.D. (2003). Antimicrobial Resistance Markers of Class 1 and Class 2 Integron- bearing *Escherichia coli* from Irrigation Water and Sediments. *Emerging Infectious Diseases*; 9(7).
- Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M. Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., & Mazel, D. (2001). “The evolutionnary history of super-integrans provides an ancestry for multiresistance integrans”. *Proceedings of The National Academy of Sciences.*, 98, 652-657
- Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. (2002). The role of integrans in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medecine Microbiology*, 292, 115-125.
- Sacchetti, R., De Luca, G., Guberti, E., & Zanetti, F. (2015). Quality of Drinking Water Treated at Point of Use in Residential Healthcare Facilities for the Elderly. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 11163–11177.
- Sajjad, A., Holley, P. M., Labbade, M. Stokes, H., W., & Guillings, M. R. (2011). Preclinical Class 1 integron with a Complete Tn 402-Like Transposition Module. *Applied and Environmental and Microbiology*; 77(2): 335-337.
- Sambe-Ba, B., Seck, A., Wane, A. A., Fall-Niang, N. K., Gassama-Sow, A. (2013). Sensibilité aux antibiotiques et supports de la résistance des souches de *Shigella flexneri* isolées à Dakar de 2001 à 2010. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 106 (2), 89-94.
- Schroeder, L. A., Choi, A.-J., & deHaseh, P. L. (2007). The -11A of promoter DNA and two conserved amino acids in the melting region of 70 both directly affect the rate limiting step in formation of the stable RNA polymerase-promoter complex, but they do not necessarily interact. *Nucleic Acids Research*, 35(12), 4141–4153.
- Shearwin, K., Callen, B., & Egan, J. (2005). Transcriptional interference – a crash course. *Trends in Genetics*, 21(6), 339-345.
- Shetty, A. R., de Gannes, V., Obi, C. C., Lucas, S., Lapidus, A., Cheng, J.-F., Goodwin, L. A. Pitluck, S., Peters, L., Mikhailova, N., Teshima, H., Tapia, R., Land, M., Hauser, L. J., Kyrpides, N., Ivanova, N., Chain, P. S. G., Deneff, V. J., Woyke, T., & Hickey, W. J. (2015). Complete genome sequence of the phenanthrene-degrading soil bacterium *Delftia acidovorans* Cs1-4. *Standards in Genomic Sciences*, 10(1).

- Shigematsu, T. (2003). *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1479–1483.
- Shultzaberger, R. K., Chen, Z., Lewis, K. A., & Schneider, T. D. (2007). Anatomy of *Escherichia coli* 70 promoters. *Nucleic Acids Research*, 35(3), 771–788.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.-H., Gutzkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*, 155(7), 2306–2319.
- Sajjad, A., Holley, M. P., Labbate, M., Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). Preclinical Class 1 Integron with a Complete Tn402-Like Transposition Module. *Applied of Environmental Microbiology*, 77(1), 335–337.
- Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., & Top, E. M. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 449–477.
- Senda, K., Ito, Y., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N., Nakashima, K., & Ohta, M., (1996). PCR Detection of Metallo-beta-lactamase Gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in Gram-Negative Rods Resistant to Broad-Spectrum b-Lactams. *Journal of Clinical, Microbiology*; 34(12): 29009:2913.
- Shibata, N., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., & Arakawa, Y. (2003). CR Typing of Genetic Determinants for Metallo- $\beta$ -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5407–5413.
- Stalder, T., Alrhoun, M., Louvet, J.N., Cassellas, M., Maftah, C., Carrion, C., Pons, M. N., Pahl, O., Ploy, M. C. & Dagot, C. (2013). Dynamic Assessment of the Floc Morphology, Bacterial Diversity, and Integron Content of an Activated Sludge Reactor Processing Hospital Effluent. *Environmental Science & Technology* doi/abs/10.1021/es4008646.

- Stalder, T., Barraud, O., Jove, T., Casellas, M., Gaschet, M., & Dagot, C. (2014). Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *The ISME*, 8, 768-777.
- Stokes, H.W., Hall, R.M (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*,3, 1669-1683.
- Stokes, H. W., O’Gorman D. B., Recchia, G. D., Parsekhian M., & Hall, R.M., (1997). Structure and function of 59-base element recombination site associated with mobile gene cassettes. *Molecular Microbiology*, 26(6), 731-745.
- Tauch, A., Götker, S., Pühler, A., Kalinowski, J., & Thierbach, G., (2002). The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid*, 48 (2) 117-29.
- Uyaguari, M. I., Scott, G. I., & Norman, R. S. (2013). Abundance of class 1–3 integrons in South Carolina estuarine ecosystems under high and low levels of anthropogenic influence. *Marine Pollution Bulletin*, 76(1-2), 77–84.
- Valdezate, S., Garrido, N., Carrasco, G., Villalón, P., Medina-Pascual, M. J., & Saéz-Nieto, J. A. (2015). Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Wade, J. T., Reppas, N.B., Church, G. M., & Struhl, K. (2005). Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes & Development*; 19: 2619-2630.
- Walker, G. C., (1984). Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribonucleic Acid Damage in *Escherichia coli*. *Microbiology Reviews*; 48(1): 60-93.
- Wan, M., & Chou, C. (2015). Class 1 Integrons and the Antiseptic Resistance Gene (*qacEΔ1*) in Municipal and Swine Slaughterhouse Wastewater Treatment Plants and Wastewater-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(6), 6249–6260.

- Wei, Q., Hu, Q., Li, S., Lu, H., Chen, G., Shen, B., Chen, B., Zang, P., & Zhou, Y. (2014). A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 973–976.
- Xu, H., Davies, J. & Miao, V. (2007). Molecular Characterization of Class 3 Integrons from *Delftia* spp. *Journal of Bacteriology* 189(17), 6276–6283.
- Xu, H., Su, Z., Wang, S., Dai, X., Chen, J., Kong, F., Li, Y., Peng, S., Shao, Q., & Ezaki, T. (2009). Four Novel Resistance Integron Gene-Cassette Occurrences in Bacterial Isolates from Zhenjiang, China. *Current Microbiology*, 59(2), 113–117.
- Xu, Z., Li, L., Shi, L., & Shirliff, M. E. (2011b). Class 1 integron in staphylococci. *Molecular Biology Reports*, 38(8), 5261–5279.
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M. E., Peters, B. M., Li, B., Peng, Y., Alam, M. J., Yamazaki, S. & Shi, L., (2011a). Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001–2006. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(5), 714–718.
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M. E., Peters, B. M., Peng, Y., Alam, M. J., Yamazaki, Y., & Shi, L. (2010). First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(3), 315–317.
- Yahaghi, E., Imani Fooladi, A. A., Amin, M., Mirnejad, R., Nezamzade, R., & Amani, J. (2014). Detection of Class I Integrons in *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Samples. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(11).
- Yamamoto, M., Matsumura, Y., Nagao, M., Ito, Y., Tanaka, M. Takakura, S., & Ichiyama, S., (2014), Poster 1124, ECCMID.
- Yu, G. Li, Y., Liu, X., Zhao, X., Li, Y. (2013). Role of integrons in antimicrobial resistance: Review. *African Journal of Microbiology Research*, 7(15), 1301-1310.



### **Intégrons de classe 3 : aspects mécanistiques et épidémiologiques**

Les intégrons sont des supports génétiques bactériens de capture, d'expression et de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques sous forme de cassettes. Ils sont majoritairement décrits chez les bactéries à Gram négatif chez qui ils confèrent généralement un phénotype de multirésistance. Les intégrons de résistance (IR) jouent un rôle majeur dans l'acquisition de la résistance dans le monde bactérien. Il existe 3 principales classes d'IR ; les IR de classe 1, les IR de classe 2 et les IR de classe 3 (IR3). Contrairement aux 2 premières classes, les IR3 représentent la classe d'intégrons de résistance la moins étudiée. Très peu de travaux s'intéressent à leur étude et on dénombre actuellement moins de 10 IR3 entièrement caractérisés. Les objectifs de ce travail de thèse étaient (i) d'effectuer une étude épidémiologique des IR3 en France et au Cameroun et (ii) d'étudier les modalités d'expression de l'intégrase et des cassettes de ces intégrons. Nos travaux ont permis d'isoler puis de décrire 3 nouveaux IR3 présents au sein de bactéries environnementales appartenant aux genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Citrobacter*. Les cassettes de ces IR3 codent des résistances aux bêtalactamines, aminosides et ammoniums quaternaires. De plus, nous avons caractérisé des intégrons de classe 3 dans 3 souches de *Delftia* spp. (2 *D.acidovorans* et 1 *D. tsuruhatensis*) isolées en Afrique ; les cassettes de ces intégrons ne codent pas de résistance aux antibiotiques. L'axe plus fondamental de ce travail de thèse a permis de montrer que le *PintI3*(1) est le promoteur impliqué dans l'expression du gène *intI3*. De plus, nous avons montré que les variants du promoteur Pc, ainsi que les variants du promoteur *PintI3*(1) sont fonctionnels et de force différente. Il ressort de nos travaux que l'environnement constituerait un réservoir d'intégrons de classe 3 et que ces supports génétiques pourraient jouer un rôle important dans la dissémination de la résistance au sein de cet écosystème.

**Mots clés :** integrons de classe 3, résistance aux antibiotiques, effluents, *Delftia*

### **Class 3 integrons: mechanistic and epidemiological aspects**

Integrons are bacterial genetic elements able to capture and express genes embedded within gene cassettes. They are widely described among Gram-negative bacteria and generally confer a multidrug resistance phenotype. Resistance integrons (RI) play an important role in the acquisition of antibiotic resistance. There are 3 main classes of RI. Class 3 RI has been poorly studied class with less than ten fully IR3 characterized. Objectives of this thesis were (i) to conduct an epidemiological study of class 3 RI in France and Cameroon and (ii) to better understand the modes of expression of the integrase and cassettes of IR3. We described 3 new class 3 RI isolated from environmental bacteria belonging to genus *Aeromonas*, *Acinetobacter* and *Citrobacter*. Gene cassettes encoded resistance to betalactams, aminoglycosides and quaternary ammonium compounds. We also described class 3 integrons from three *Delftia* strains (2 *D.acidovorans* and 1 *D.tsuruhatensis*) in Africa containing cassettes that do not encode antibiotic resistance. The fundamental part of the work showed that the *PintI3*(1) promoter is involved in the expression of the *intI3* gene. Furthermore, we demonstrated that variants of the Pc promoter and variants of the *PintI3*(1) promoter are functional with different strengths. These results showed that the environment may constitute a reservoir of class 3 integrons and that these genetic elements could play an important role in the spread of the resistance in this ecosystem.

**Key words:** class 3 integrons, antibiotic resistance, effluents, *Delftia*.