



HAL
open science

Les îlots de résistance de type SGI1 (Salmonella Genomic Island 1) et apparentés dans des souches humaines cliniques de *Porteus mirabilis* et *Salmonella enterica*

Claire Goulard de Curraize

► **To cite this version:**

Claire Goulard de Curraize. Les îlots de résistance de type SGI1 (Salmonella Genomic Island 1) et apparentés dans des souches humaines cliniques de *Porteus mirabilis* et *Salmonella enterica*. Bactériologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCE013 . tel-02495619

HAL Id: tel-02495619

<https://theses.hal.science/tel-02495619>

Submitted on 2 Mar 2020

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.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE**

**Préparée au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon – unité de recherche
chrono-environnement-UMR6249-CNRS**

Ecole doctorale n°554

Environnements- Santé

Doctorat en Médecine, microbiologie et maladies transmissibles

Par

Claire GOULARD de CURRAIZE

**Les îlots de résistance de type SGI1 (*Salmonella* Genomic
Island 1) et apparentés dans des souches humaines
cliniques de *Proteus mirabilis* et *Salmonella enterica***

Thèse présentée et soutenue à Dijon le 1^{er} décembre 2017

Composition du Jury :

Pr ANDREMONT Antoine	Professeur émérite - APHP Bichat	Rapporteur (Président)
Pr de CHAMPS Christophe	PU-PH - CHU de Reims	Rapporteur
Dr BERCOT Béatrice	MCU-PH - APHP St Louis	Examinatrice
Dr HARTMANN Alain	Directeur de recherche - INRA Dijon	Examinateur
Dr PODGLAJEN Isabelle	MCU-PH - APHP Georges Pompidou	Examinatrice
Dr SIEBOR Eliane	Docteur ès Sciences - CHU de Dijon	Examinatrice
Pr NEUWIRTH Catherine	PU-PH - CHU de Dijon	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame **Catherine Neuwirth**, Professeur des Universités – Praticien hospitalier au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon de m'avoir accueillie et recrutée dans son laboratoire de bactériologie malgré mes nombreux défauts : interne parisienne, pharmacienne.... si vous aviez su la suite..... Je vous remercie aussi d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Etre encadrée par vous m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances et m'a ouvert l'esprit. J'espère pouvoir profiter de vos connaissances encore quelques années. Je vous remercie aussi pour votre disponibilité et même pour toutes les fois où vous m'avez déchargé des tâches quotidiennes pour que je puisse me concentrer sur ma thèse, malgré votre emploi du temps bien chargé. Je vous remercie pour votre soutien et toutes les attentions que vous avez su m'apporter au cours des moments difficiles.

Un grand merci à Madame **Eliane Siebor**, Docteur ès Sciences, tu m'as énormément aidé dans les manips et les analyses de séquences des îlots. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as apportées en biologie moléculaire et sur les éléments génétiques support de la résistance, en particulier sur les îlots de résistance. Je peux t'assurer que tu as toute ta place dans ce jury. Merci pour ta disponibilité et les corrections que tu as apportées à cette thèse. Je compte encore sur toi pour la suite, il me reste encore des choses à apprendre avant que tu partes.

Je remercie Monsieur **Antoine Andreumont**, Professeur émérite au laboratoire de bactériologie à l'hôpital Bichat, à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP) de me faire l'honneur d'être rapporteur de ce travail et de m'apporter notamment son expertise sur la résistance bactérienne dans les flores commensales de l'animal et de l'homme et sur sa transmission.

Je remercie Monsieur **Christophe de Champs**, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier en bactériologie au CHU de Reims de me faire aussi l'honneur d'être rapporteur de ce travail et de m'apporter en particulier son expertise sur l'environnement des gènes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones et sur leur dissémination.

Un grand merci à Madame **Béatrice Berçot**, Maître de Conférences – Praticien hospitalier dans le service de microbiologie du GH Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal, à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP) d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et de participer à ce jury. Je te remercie de m'avoir fait confiance pour travailler avec toi sur la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération chez les gonocoques lorsque j'étais interne et de m'avoir permis d'obtenir ma première publication en 1^{er} auteur. Tu m'as permis d'acquérir mes premières connaissances sur la génétique de la résistance aux antibiotiques. Je te remercie pour ta simplicité et ton amitié.

Je tiens à remercier Monsieur **Alain Hartmann**, Directeur de recherche à l'INRA de Dijon pour avoir accepté de me suivre au cours de ma thèse en faisant partie de mon comité de suivi de thèse et pour juger ce travail. Je vous remercie pour tous les conseils que vous m'avez apportés pour réaliser mes essais de survie tout d'abord chez *Gammarus* puis sur *Caenorhabditis elegans*.

Je remercie Madame **Isabelle Podglajen**, Maître de Conférences – Praticien hospitalier, au laboratoire de bactériologie à l'hôpital Européen Georges Pompidou, à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP) d'avoir accepté de juger ce travail. Je te remercie pour toutes les connaissances que tu m'as apportées au cours de mon semestre d'interne à Georges Pompidou et pour ta disponibilité lorsque je te demande ton avis en bactériologie.

Je remercie Monsieur **Serge Aho Glélé**, Praticien hospitalier et chef du service d'épidémiologie et d'hygiène hospitalière au CHU de Dijon, pour m'avoir accordé du temps pour faire les statistiques mais aussi et surtout pour m'avoir accordé la nationalité béninoise !

Je remercie Monsieur **Philip Bastable**, professeur d'anglais à l'UFR des Sciences de Santé, pour avoir corrigé les articles en anglais.

Je remercie **Véronique Varin**, technicienne au laboratoire de bactériologie pour m'avoir aidé pour mes manips (ECP et séquençage et assemblage des îlots) et pour sa disponibilité.

Je remercie tous les **internes, externes et étudiants** que j'ai encadrés et qui ont participé à ce travail de thèse.

Parmi eux, je remercie **Jennifer Tetu** et **Fatma Zouak** pour avoir eu la patience de compter scrupuleusement mes « larves » ...lorsque je n'étais pas là !

Je remercie en particulier **Flora Kaczorowski**, partenaire de musique qui fut la première étudiante que j'ai encadrée pour un mémoire de recherche et qui a mis la barre haute pour les étudiants suivants **Mélanie Grenier, Solène Marty et Alexandre Jay** que je remercie. Et à tous les étudiants et externes **Claire Clément, Hugo Lauriente, Marianne Linot, Coralie Mainier, Juliette Sauge, Antonin Storme, Alexandre, Julien, Arthur, Martin**; et les étudiants d'**Eliane Siebor Adèle, Claire et Camille**.

Je remercie tous mes collègues **biologistes** en particulier :

Angélique Chapuis, avec qui je partage le bureau et qui supporte tous mes états d'âme.... Merci pour ta disponibilité, ton écoute et ton amitié. Je suis convaincue que tu es la meilleure des collègues au monde !

Lucie Amoureux, merci pour les astreintes prolongées que tu as fait pour compter mes larves ! Merci pour tes conseils et les arrangements de planning pour « la garde » des stagiaires, les ED... et surtout, merci d'avoir piqué mon LB, sans quoi nous n'aurions pas autant ri !

Julien Bador, merci pour tes conseils et pour avoir compté mes larves. Merci pour m'avoir laissé du temps pour rédiger ma thèse. Merci pour ta gentillesse et ton aide au quotidien.

Nathalie Sixt, merci pour ton soutien, ton écoute au cours de mes comptages de larves et ton amitié. Merci de m'avoir laissé la loupe disponible pendant de longues heures.

Merci aux aide-laboratoires, **Fabienne, Annabelle et Isabelle**, qui ont stérilisé mes milieux.

Je remercie toutes les **techniciennes du laboratoire**. Vous avez toutes des qualités et chacune de vous permet de faire tourner ce laboratoire. Merci de garder votre bonne humeur.

Je suis désolée pour toutes les fois où je vous ai fait sursauter en venant au laboratoire le week-end pour compter mes larves ou lorsque j'ai dérégulé le microscope...

Merci à ma **famille**,

Tout d'abord, à **mes parents** sans qui je ne serai pas arrivé jusque là. Merci pour votre soutien en particulier dans les moments difficiles. Vous m'avez donné la force de persévérer.

A mes **frères et à ma sœur** : à **Pierre**, pour ses prières, à **Tidie** pour ses encouragements, à **Olivier** pour ses conseils. Votre soutien m'a permis de relativiser et de poursuivre mes efforts.

A mon **beau-frère Jalouli**, pour ses conseils et sa bonne humeur. A ma **belle-soeur Céline** pour son soutien et sa gentillesse.

A mes **neveux et nièces** qui m'ont apporté l'apéro cet été lorsque j'étais astreinte à rédiger ma thèse et à leur amour.

A ma **Mamie**, qui ne comprend pas pourquoi je travaille autant mais qui me soutient malgré tout.

A mon oncle **Henri Guy**, qui a bien voulu relire ma thèse et qui m'a permis d'apporter des corrections pour faciliter la compréhension de cette thèse. A **ma marraine** son épouse.

Merci à mes **amis** de Montbrison, de Lyon, de Paris et de Dijon qui m'ont soutenu et qui ont été compréhensifs lorsque je refusais toutes leurs invitations...pour avancer cette thèse.

Enfin à tous ceux que j'ai oubliés, j'espère qu'ils ne m'en voudront pas !

Mots clés : *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) – *Proteus mirabilis* – résistance aux antibiotiques – mobilisation de SGI1 – virulence – *Caenorhabditis elegans*

Résumé :

Salmonella genomic island 1 (SGI1) est un élément intégratif mobilisable décrit pour la 1^{ère} fois dans un clone penta-résistant de *Salmonella* Typhimurium DT104. Depuis, plusieurs variants et îlots apparentés (*Proteus* genomic island 1 (PGI1)) ont été rapportés dans différents sérotypes de *Salmonella enterica* et chez *Proteus mirabilis*. Ces îlots de résistance sont constitués d'un squelette plutôt stable et d'une région de multirésistance (MDR) variable. L'objectif de cette thèse était d'étudier ces îlots dans des souches cliniques de *P. mirabilis* (CHU de Dijon et Lariboisière à Paris) et de *S. enterica* (CHU de Dijon).

La prévalence de ces îlots variait de 5 à 16% chez *P. mirabilis* ayant acquis au moins une résistance. L'étude génotypique a montré une grande diversité des souches mais également la présence de quelques clones porteurs de SGI1 ou PGI1. Le séquençage de ces îlots a mis en évidence la grande plasticité des régions MDR souvent en lien avec des mouvements d'IS26. Ces dernières permettent à la région MDR de s'enrichir en nouveaux gènes de résistance (ex : *bla*_{CTX-M-15}) présents dans des structures antérieurement décrites sur des plasmides de clones d'entérobactéries répandus. De nombreuses espèces d'entérobactéries porteuses d'un plasmide IncA/C sont capables d'acquérir par conjugaison un îlot provenant d'une autre entérobactérie. Cet îlot s'intègre alors au niveau du site chromosomique spécifique (*trmE*). Sous pression antibiotique et en présence d'un plasmide IncA/C, les souches peuvent être complètement excisées de leur îlot. Ainsi, ces îlots sont des interfaces de résistance à la fois stables mais aussi dynamiques favorisant la dissémination des gènes de résistance.

Une virulence accrue par la présence de ces îlots chez *S. enterica* n'a pas pu être confirmée ni dans le modèle d'infection expérimentale de *C. elegans*, ni dans une étude rétrospective chez l'homme (prévalence de 12%). En revanche, *P. mirabilis* avait tendance à être plus pathogène chez *C. elegans* lorsqu'il était porteur d'un îlot.

Keywords : *Salmonella* Genomic Island 1(SGI1) – *Proteus mirabilis* – antimicrobial resistance – mobilization of SGI1 – virulence – *Caenorhabditis elegans*

Abstract :

Salmonella genomic island (SGI1) is an integrative mobilizable element initially described in an epidemic multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. Since this first report, many variants and related genomic islands (*Proteus* genomic island 1 (PGI1)) have been described among *Salmonella enterica* serovars and in *Proteus mirabilis*. These islands have a stable backbone and a highly variable multidrug-resistant (MDR) region. The objective of this work was to study SGI1 from clinical *P. mirabilis* isolates (University hospitals of Dijon and Lariboisière - Paris) and *S. enterica* (University hospital of Dijon)

The prevalence of these islands ranged from 5% to 16% in *P. mirabilis* with at least one acquired resistance. The genotypic analysis revealed a wide diversity among isolates but also the presence of some clonal isolates harbouring SGI1 or PGI1. Genomic island sequencing revealed the great plasticity of MDR regions, primarily mediated by IS26. Thanks to IS26 movements, the MDR region gains resistance genes (such as *bla*_{CTX-M-15}) present in structures initially detected in plasmids from widely distributed Enterobacteriaceae. Many species of Enterobacteriaceae that harbour IncA/C plasmids are able to acquire islands by conjugation. These islands are then incorporated into specific sites on the chromosome (*trmE*). They could also be completely excised from Enterobacteriaceae under antibiotic pressure in the presence of an IncA/C plasmid. Genomic islands should be regarded on the one hand as a steady interface of resistance and on the other hand as a dynamic interface conveying resistance genes.

Finally, SGI1 of *S. enterica* was not found to increase virulence in a *Caenorhabditis elegans* model or in a retrospective clinical study (12% of prevalence). However, it seems that *P. mirabilis* becomes more virulent when it harbours SGI1 in *Caenorhabditis elegans*.

Table de matières

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES ANNEXES	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
I. INTRODUCTION	10
II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	12
A. <i>Proteus mirabilis</i>	12
1. Généralités	12
2. Résistance aux antibiotiques.....	14
B. <i>Salmonella enterica</i>	17
1. Généralités	17
a. Les salmonelles majeures	17
b. Les salmonelles mineures.....	19
2. Facteurs de risque d'infections invasives à salmonelles non typhiques	20
a. Facteurs de risque liés à l'hôte	20
b. Facteurs de risque liés à la souche de <i>S. enterica</i>	22
3. Résistance aux antibiotiques et traitements.....	28
C. Les éléments génétiques supports de la résistance les plus fréquemment rencontrés chez <i>P. mirabilis</i> et <i>S. enterica</i>	32
1. Le système intégron/cassettes.....	32

a.	Les intégrons de classe 1	34
b.	Les intégrons de classe 2	36
c.	Les intégrons complexes de classe 1	36
2.	Les éléments transposables ou transposons.....	38
a.	Les séquences d'insertion (IS) :	38
b.	Les transposons non composites.....	40
c.	Les transposons composites	40
d.	Les transposons conjugatifs	41
e.	Mouvements des IS26 générant des transposons et des réarrangements dans les régions multirésistantes	43
3.	Les plasmides	47
4.	Les éléments intégratifs et transférables.....	50
a.	Les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs).....	50
b.	Les éléments intégratifs et mobilisables	53
D.	Les îlots de résistance chez les entérobactéries	56
1.	Structure des îlots de résistance de type <i>Salmonella</i> genomic island 1 et des îlots apparentés ..	56
a.	<i>Salmonella</i> genomic island 1 (SGI1).....	56
b.	Variants de SGI1	60
c.	Îlots de résistance chez <i>S. enterica</i> et <i>P. mirabilis</i>	77
2.	<i>Salmonella</i> genomic island : un élément mobilisable et intégratif	83
3.	Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 ou PGI1.....	89
a.	Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi les souches de <i>S. enterica</i> possédant un intégron de classe 1.....	89
b.	Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi les souches de <i>S. enterica</i> ayant acquis au moins une résistance.....	90
c.	Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi les souches de <i>S. Typhimurium</i>	91
d.	Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi d'autres sérotypes de <i>S. enterica</i>	92
e.	Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 et PGI1 parmi les souches de <i>P. mirabilis</i>	92

4.	SGI1 et virulence	93
E.	<i>Caenorhabditis elegans</i> : un modèle vivant pour étudier les interactions hôte pathogène	99
1.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	99
2.	<i>C. elegans</i> : un bon modèle pour étudier les interactions hôte pathogène.....	101
3.	Interactions entre <i>S. Typhimurium</i> et <i>C. elegans</i>	103
III.	OBJECTIFS.....	105
IV.	PREMIERE ETUDE : EPIDEMIOLOGIE ET STRUCTURE DES ILOTS DE RESISTANCE DE TYPE SGI1 ET/OU PGI1 CHEZ <i>P. MIRABILIS</i>.....	106
A.	Introduction.....	106
B.	Matériels et méthodes.....	106
1.	Recrutement des souches de <i>P. mirabilis</i>	106
2.	Techniques de biologie moléculaire.....	107
a.	Extraction de l'ADN bactérien :	107
b.	Quantification de l'ADN bactérien.....	107
c.	Techniques de PCR	108
d.	Migration des produits de PCR par électrophorèse et révélation	110
e.	Purification des produits de PCR	110
f.	Méthodes de séquençage	112
g.	Comparaison des séquences d'acides aminés des ORFs du squelette de l'îlot	115
h.	Génotypage des souches de <i>P. mirabilis</i> par électrophorèse en champ pulsé (ECP)	115
C.	Résultats et discussion	118
1.	Description des souches de <i>P. mirabilis</i> étudiées	118
a.	Prévalence des îlots de résistance SGI1 ou PGI1	118
b.	Sites anatomiques dans lesquels les souches de <i>P. mirabilis</i> ont été isolées.....	120
c.	Phénotype des souches de <i>P. mirabilis</i> avec îlot de résistance.....	122

2.	Structures détectées	124
a.	Etude des squelettes des îlots de résistance	129
b.	Nouveaux variants de la région MDR	132
c.	Etude génotypique des souches de <i>P. mirabilis</i>	144
D.	Conclusion	147
V.	DEUXIEME ETUDE : MOBILISATION DES ILOTS DE RESISTANCE	150
A.	Introduction	150
B.	Matériels et méthodes	150
1.	Souches utilisées	150
a.	Souches porteuses de l'îlot SGI1 ou PGI1	150
b.	Souches porteuses du plasmide IncA/C avec le gène <i>bla</i> _{TEM-24}	153
2.	Insertion des îlots SGI1 (ou PGI1) dans une souche porteuse du plasmide IncA/C	155
3.	Excision des îlots SGI1 (ou PGI1)	155
4.	Caractérisation des transconjugants	156
a.	Recherche de l'îlot SGI1 (ou PGI1) chez les transconjugants	156
b.	Confirmation de la perte de l'îlot SGI1 (ou PGI1) chez les transconjugants	158
C.	Résultats	158
1.	Insertion des îlots SGI1 (ou PGI1) dans des souches d'entérobactéries	158
2.	Excision des îlots de résistance SGI1 (ou PGI1) de souches d'entérobactéries	162
D.	Discussion	163
E.	Conclusion	167
VI.	TROISIEME ETUDE : SGI1 ET VIRULENCE	169

A. Etude rétrospective de 2011 à 2016 des patients infectés par une salmonelle mineure avec ou sans îlot de résistance	169
1. Objectifs	169
2. Matériels et méthodes	169
a. Méthodologie de l'étude	169
b. Identification des souches de <i>S. enterica</i>	170
c. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	170
d. Détection de l'îlot de résistance :	172
e. Analyse statistique	172
3. Résultats	172
a. Prévalence et caractéristiques des souches de salmonelles mineures porteuses de l'îlot de résistance	172
b. Implication de l'îlot de résistance dans la sévérité de la maladie	176
c. Rôle de l'antibiorésistance sur la sévérité de la maladie	176
d. Facteurs de risque de développer une infection invasive par une salmonelle mineure	178
4. Discussion	181
5. Conclusion	184
B. Comparaison de la survie de <i>C. elegans</i> en présence d'une souche avec îlot et de sa souche isogénique excisée de l'îlot	184
1. Objectifs	184
2. Matériels et méthodes	185
a. Souches utilisées	185
b. Synchronisation de <i>C. elegans</i>	186
c. Essais de survie	187
d. Analyse statistique	188
3. Résultats	190
4. Discussion	191
5. Conclusion	193

VII.	DISCUSSION GENERALE	194
VIII.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	201
IX.	BIBLIOGRAPHIE.....	202
X.	ANNEXES.....	217
XI.	PUBLICATIONS.....	246
	Article n°1 : « Two new <i>Salmonella</i> genomic islands 1 from <i>Proteus mirabilis</i> and first description of <i>bla</i> _{CTX-M-15} on a variant (SGI1-K7) »	
	Article n°2 : « Mobilization of the <i>Salmonella</i> genomic island SGI1 and the <i>Proteus</i> genomic island PGI1 by the A/C ₂ plasmid carrying <i>bla</i> _{TEM-24} harboured by various clinical species of <i>Enterobacteriaceae</i> »	
	Article n°3 : « Does the <i>Salmonella</i> Genomic Island SGI1 confer invasiveness properties to human isolates ? »	

Liste des figures

Figure 1 : Incidence des fièvres typhoïdes en fonction des pays en 2010 (Crump et al. 2015).....	18
Figure 2 : Pourcentage des <i>S. Typhimurium</i> DT104 parmi toutes les <i>S. Typhimurium</i> dans 8 régions du monde entre 1992 et 2001 (Daprès Helms et al. 2005)	21
Figure 3 : Schéma de dissémination de <i>S. Typhimurium</i> DT104 dans le monde (D’après Leekitcharoenphon et al. 2016).....	23
Figure 4 : Distribution de la résistance des souches de salmonelles mineures sensibles ou résistantes à 1 jusqu’à 8 classes d’antibiotique en Europe (Données issues du rapport 2016 de l’European Food Safety Authority 2016).....	27
Figure 5 : Structure d’une cassette (D’après Ploy et al. 2000).....	31
Figure 6 : Mécanisme d’intégration d’une cassette dans un intégron (D’après Gillings et al. 2015).....	31
Figure 7 : Structures des intégrons de classe 1 (D’après Patridge et al. 2009)	33
Figure 8 : Structures des intégrons de type In2, In4 et In5 (D’après Partridge et al. 2001)	33
Figure 9 : Structure des intégrons de classe 2 (D’après Patridge et al., 2009).....	35
Figure 10 : Exemple d’une structure d’un intégron complexe de classe 1 avec <i>ISCR1</i>	35
Figure 11 : Structure d’une séquence d’insertion (D’après Mahillon and Chandler 1998)	37
Figure 12 : Exemple d’une structure d’un transposon non composite : <i>Tn21</i> (D’après Liebert, Hall, and Summers 1999)	39
Figure 13 : Exemple d’un transposon composite contenant un gène de résistance <i>aphA1a</i> codant pour la résistance à la kanamycine : <i>Tn4352</i>	39

Figure 14 : Mécanismes de transposition réplivative par une séquence d'insertion (D'après He et al. 2015). (a) Transposition intermoléculaire. (b) Transposition intramoléculaire. (c) Transposition intermoléculaire d'un transposon composite.....	42
Figure 15 : Les deux modes de formation d'un co-intégrat par transposition d'IS26 (D'après Harmer, Moran, and Hall 2014).	44
Figure 16 : Mécanismes de formation et d'incorporation d'une unité translocable (TU) générant un transposon composite (D'après Harmer and Hall 2016).	46
Figure 17 : Schéma du cycle de vie des éléments intégratifs et conjugatifs (D'après Wozniak and Waldor 2010)	49
Figure 18 : Mécanisme de régulation de l'intégration, de l'excision et du transfert conjugatif des éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs) appartenant à la famille des SXT/R391 (D'après Wozniak and Waldor 2010)	52
Figure 19 : Processus de mobilisation en <i>trans</i> et transfert dans une cellule réceptrice d'un élément mobilisable et intégratif (IME) (en rouge) par l'intermédiaire d'un élément intégratif et conjugatif comme un plasmide conjugatif ou un élément intégratif et conjugatif (ICE) (en bleu) (D'après Wozniak and Waldor 2010).....	52
Figure 20 : Structure de l'îlot de résistance <i>Salmonella</i> genomic island 1 (D'après D. Boyd et al. 2001).....	55
Figure 21 : Région MDR de SGI1 formée par un intégron complexe de classe 1 In104 codant pour la penta-résistance (ACSSuT) (D'après Hall 2010).....	57
Figure 22 : Localisation de <i>Salmonella</i> genomic island 1 et de sa région MDR en fonction des espèces bactériennes.	59
Figure 23 : Variants de la région MDR de SGI1 résultant d'un simple échange de cassettes	61

Figure 24 : Variants de la région MDR de SGI1 résultant de recombinaisons homologues	63
Figure 25 : Variants de la région MDR de SGI1 résultant d'insertion d'IS et/ou de transposons	66
Figure 26 : Variants de la région MDR de SGI1 avec un intégron de type In4 et variants ayant subi des remaniements multiples	70
Figure 27 : Variants de la région MDR de SGI1 avec deux régions MDR.....	72
Figure 28 : Variations du squelette dans les variants de <i>Salmonella</i> genomic island 1	74
Figure 29 : Régions MDR de <i>Salmonella</i> genomic island 2 et de ses variants.....	76
Figure 30 : Comparaison des squelettes SGI1, PGI1 et celui retrouvé chez <i>Salmonella</i> Heidelberg (D'après Siebor and Neuwirth 2014)	78
Figure 31 : Régions MDR de PGI1	80
Figure 32 : Schéma de l'intégration et de l'excision de SGI1 par recombinaison entre le site d'attachement chromosomique (<i>attB</i>) et le site de SGI1 (<i>attP</i>) (D'après Doublet et al. 2005).....	82
Figure 33 : Rôle du complexe AcaCD synthétisé par le plasmide IncA ou IncC dans le transfert de SGI1 (Adapté de Poulin-Laprade, Carraro, and Burrus 2015).....	85
Figure 34 : Anatomie d'un adulte hermaphrodite de <i>C. elegans</i> (D'après Altun et al. 2002)	98
Figure 35 : Cycle de vie de <i>C. elegans</i> (D'après Altun et al. 2002).	100
Figure 36 : PCR longue utilisée pour classer les SGI1 en SGI1 complet ou incomplet ..	109
Figure 37 : Schéma du séquençage à haut débit (D'après Illumina®).....	111
Figure 38 : Comparaison des ORFs du squelette SGI0 (% d'identité en acides aminés) avec les squelettes de SGI1, SGI2, SGI1-V et PGI1.....	128
Figure 39 : Région MDR de SGI1- <i>Pm2CHAMA</i>	131

Figure 40 : Structure de la région MDR de SGI1-K7.	134
Figure 41 : Structure de la région MDR de SGI1-K8	136
Figure 42 : Structure de la région MDR de SGI1-L3.....	136
Figure 43 : Structure de la région MDR de SGI1-L4.....	138
Figure 44 : Nouveaux variants de la région MDR de PGI1	140
Figure 45 : Profils génotypiques en électrophorèse en champ pulsé des souches avec une structure SGI1 complet.....	143
Figure 46 : Profil génotypique en électrophorèse en champ pulsé des souches avec une structure SGI1 incomplet.	143
Figure 47 : Profil génotypique en électrophorèse en champ pulsé des souches avec une structure PGI1	145
Figure 48 : Schéma explicatif des conjugaisons et sélection des transconjugants avec SGI1 (ou PGI1) ou des transconjugants excisés de SGI1 (PGI1).	154
Figure 49 : Courbes de survie de <i>C. elegans</i> avec <i>S. Typhimurium</i> 8STBAZJU avec et sans SGI1 et le témoin <i>E. coli</i> OP50	189
Figure 50: Courbes de survie de <i>C. elegans</i> avec <i>P. mirabilis</i> PmSCO avec et sans SGI1-H et le témoin <i>E. coli</i> OP50	189
Figure 51 : Répartition des ventes de classes d'antibiotiques entre l'homme (en blanc) et l'animal (en gris) en France en 2005 (D'après Moulin et al. 2008).....	198

Liste des tableaux

Tableau 1 : Proportion des souches de salmonelles non typhiques isolées chez l'homme résistantes aux antibiotiques en France et en Europe en 2014 (Données issues du rapport 2016 de l'European Food Safety Authority 2016)	29
Tableau 2 : Prévalence des îlots parmi les souches de <i>P. mirabilis</i> ayant acquis au moins une résistance parmi celles étudiées au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon, entre 2011 et 2015.....	117
Tableau 3 : Sites dans lesquels ont été isolées les souches de <i>P. mirabilis</i> étudiées au CHU de Dijon et à Lariboisière (Paris)	119
Tableau 4 : Phénotype des souches de <i>P. mirabilis</i> avec îlot de résistance	121
Tableau 5 : Souches de <i>P. mirabilis</i> avec îlot de résistance et caractéristiques de leur îlot	123
Tableau 6 : Liste des souches d'entérobactéries porteuses d'un îlot utilisées pour les conjugaisons et leur phénotype de résistance.....	149
Tableau 7 : Liste des souches d'entérobactéries porteuses du plasmide IncA/C utilisées pour les conjugaisons et phénotype de résistance de ces souches.....	152
Tableau 8 : Site <i>attP</i> des îlots de résistance SGI1 (ou PGI1) et sites d'attachement <i>attB</i> au niveau de l'extrémité 3' de leur gène <i>trmE</i> des souches d'entérobactéries porteuses du plasmide IncA/C avec le gène <i>bla</i> _{TEM-24}	157
Tableau 9 : Conjugaisons réalisées, antibiotiques utilisés pour la sélection des transconjugants avec îlot de résistance SGI1 (ou PGI1) et phénotypes des transconjugants obtenus.	159
Tableau 10 : Souches utilisées pour les conjugaisons, méthodes utilisées pour sélectionner les transconjugants sans îlot de résistance SGI1 (ou PGI1) avec le plasmide IncA/C.....	161

Tableau 11 : Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez les 100 souches de salmonelles mineures étudiées ^a	171
Tableau 12 : Caractéristiques des souches isolées des patients infectés par une salmonelle mineure.....	173
Tableau 13 : Implication des îlots de résistance dans la sévérité de la maladie.....	175
Tableau 14 : Implication de l'antibiorésistance dans la sévérité de la maladie ^a	177
Tableau 15 : Implication de l'âge des patients dans la sévérité de la maladie	179
Tableau 16 : Implication de l'immunodépression dans la sévérité de la maladie.....	180

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des gènes de résistance	217
Annexe 2 : Récapitulatif des îlots de résistance SGI1 ou PGI1 décrits	219
Annexe 3 : Récapitulatif des régions MDR des variants de SGI1	223
Annexe 4 : Techniques de biologie moléculaire	230
Annexe 5 : Liste des principales amorces utilisées	238
Annexe 6 : PCR classique (amplification d'un fragment d'ADN ≤ 1 kb)	240
Annexe 7 : PCR longue (amplification d'un fragment d'ADN entre 1 et 5 kb)	241
Annexe 8 : Programme du thermocycleur pour réaliser l'amplification des fragments d'ADN tagmentés et les indexer en vue de préparer la librairie d'ADN pour le séquençage haut débit	242
Annexe 9 : Réaction de séquençage par la méthode de Sanger	243
Annexe 10 : Programme du thermocycleur pour la recherche du lysotype DT104 par PCR	244
Annexe 11 : Milieux utilisés pour la culture de <i>C. elegans</i> (D'après Stiernagle 2006)...	245

Liste des abréviations

ACSSuT : penta-résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfamides et aux tétracyclines

Ag : antigène

BET : bromure d'éthidium

BLSE : β -lactamase à spectre élargi

CASFM : comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CR : « common region »

DR : « direct repeat » (ou duplication de cible)

DT104 : définitive phage type 104 (ou lysotype 104)

EPPI : eau pour préparation injectable

ICE : « integrative and conjugative elements » (ou élément intégratif et conjugatif)

IME : « integrative mobilizable element (ou élément mobilisable intégratif)

IS : « insertion sequence » (ou séquence d'insertion)

IV : intra-veineuse

MDR : multidrug resistance (ou multirésistance)

MH : Mueller-Hinton

MLST : Multilocus Sequence Typing (typage moléculaire)

NGM : « Nematode Growth Media » (ou milieu pour la croissance des nématodes)

nt : nucléotides

OMS : organisation mondiale de la santé

OR : odds ratio

ORF : « open reading forming » (ou cadres de lectures)

pb : paires de bases

PCR : « polymerisation chain reaction » (ou réaction de polymérisation en chaîne)

PGI1 : *Proteus* genomic island 1

PLP : protéine liant à la pénicilline

QNR : quinolone resistance

rpm : rotation par minute

SGI1 : *Salmonella* genomic island 1

TU : unité de translocation

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

I. Introduction

L'émergence de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques (résistance à au moins 3 classes d'antibiotiques) est un problème majeur en santé publique et peut conduire à des impasses thérapeutiques. Cette émergence est notamment due au fait que les bactéries sont capables de s'échanger du matériel génétique supportant des gènes de résistance aux antibiotiques. Deux modes de transfert de matériel génétique sont décrits : les transferts verticaux « mère-fille » et les transferts horizontaux entre les bactéries. Il existe chez certaines entérobactéries, comme les salmonelles mineures (responsables de diarrhées), *Proteus mirabilis* (responsables d'infections urinaires), et plus récemment chez *Morganella morganii* des îlots de résistance, appelés *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) ou *Proteus* Genomic Island 1 (PGI1) (D. A. Boyd et al. 2000 ; Ahmed, Hussein, and Shimamoto 2007 ; Schultz, Barraud, et al. 2017). Ces îlots de résistance sont des éléments mobilisables intégratifs (IMEs). Il a été mis en évidence que ces îlots pouvaient-être transmis en *trans in vitro* à *Escherichia coli* en présence d'un plasmide IncA/C (Doublet et al. 2005). Ces îlots peuvent être transférés par des mécanismes horizontaux qui deviennent par la suite verticaux une fois intégrés dans le chromosome bactérien. Ils sont constitués de deux parties : un squelette et une région portant des gènes de résistance aux antibiotiques, nommée « multidrug resistance region » (région MDR) dont il existe de nombreux variants (SGI1-A à -Z) et des îlots apparentés (SGI2 et PGI1) (R. M. Hall 2010 ; Siebor and Neuwirth 2014). Classiquement, la présence de ces îlots de résistance entraîne une penta-résistance vis-à-vis de l'ampicilline, du chloramphénicol, de la streptomycine, de la spectinomycine, des sulfamides et des tétracyclines (ACSSuT) (R. M. Hall 2010). Ces antibiotiques ne sont pas ou peu employés pour le traitement des infections graves. Néanmoins, d'autres gènes de résistance codant pour des protéines QNR (quinolone resistance), des méthylases ou encore des carbapénémases sont

récemment décrits sur ces îlots et entraînent de véritables impasses thérapeutiques puisqu'ils confèrent la résistance aux antibiotiques utilisés dans le cadre de la prise en charge d'infections graves à bacille à Gram négatif (Siebor and Neuwirth 2011; Girlich et al. 2015; Lei et al. 2014; Wilson and Hall 2010). Par ailleurs, certains auteurs suggèrent que des gènes présents sur SGII confèreraient une virulence accrue aux souches de *Salmonella* porteuses de l'îlot de résistance (Rasmussen et al. 2005 ; Sahu et al. 2013). A ce jour, ces îlots de résistance sont encore peu décrits en particulier chez *P. mirabilis* (nombre de publications : 16). Ainsi, il est donc important d'étudier l'épidémiologie, la structure et la mobilité de ces îlots pour déterminer leur réel impact sur la dissémination des gènes de résistance au sein des entérobactéries. Enfin, il est nécessaire d'étudier leur pouvoir pathogène sur des modèles vivants expérimentaux et par des études cliniques chez l'homme.

II. Synthèse bibliographique

A. *Proteus mirabilis*

1. Généralités

Cette bactérie appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Proteus*. Les espèces principalement retrouvées chez l'homme sont *P. mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* et *Proteus hauseri*. *P. mirabilis* est commensal du tube digestif de l'homme et des animaux et est présent dans l'eau et la terre. Il joue un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique notamment au niveau du tube digestif. Il peut devenir pathogène et être responsable d'infections communautaires en particulier chez les personnes âgées et chez les sujets fragiles comme les patients diabétiques (infection du pied diabétique). Il est également responsable de 3,5% des infections nosocomiales en France en 2012 ("Enquête Nationale de Prévalence Des Infections Nosocomiales et Des Traitements Anti-Infectieux En Établissements de Santé, France, Mai-Juin 2012 / 2013 / Maladies Infectieuses / Rapports et Synthèses / Publications et Outils / Accueil" 2017).

Les infections concernent essentiellement l'appareil urinaire du fait de la proximité du tube digestif et de l'urètre. Les facteurs de risque de développer une infection urinaire sont la présence d'anomalies fonctionnelles ou anatomiques des voies urinaires et le portage de sonde urinaire. *P. mirabilis* est responsable de 1 à 10% des infections urinaires (Schaffer and Pearson 2015). Il possède une uréase qui hydrolyse l'urée en ammonium et alcalinise ainsi les urines.

L'alcalinisation des urines favorise le développement de cristaux d'apatite et des cristaux de struvite. Les cristaux formés peuvent obstruer les voies urinaires (vessie, reins ou au

niveau de la sonde urinaire) et entraîner une urolithiase. Ces cristaux s'associent avec le polysaccharide sécrété par *P. mirabilis* ce qui forme un biofilm cristallin (Jacobsen et al. 2008). Ce biofilm le protège de la réponse immunitaire de l'hôte. *P. mirabilis* possède plusieurs facteurs de virulence. Il est mobile grâce à des flagelles qui lui permettent de se déplacer plus rapidement sur les milieux solides en formant un voile, propriété que l'on appelle le « swarming ». Le « swarming » serait favorisé par la présence de certains acides aminés comme la glutamine et l'histidine qui sont concentrés dans les urines. Cette propriété lui permettrait de coloniser plus rapidement les dispositifs médicaux ou les sites infectés. Il possède aussi des adhésines comme des *fimbriae* qui lui permettent d'adhérer aux cellules épithéliales et des hémolysines qui sont des cytotoxines entraînant la lyse cellulaire. *P. mirabilis* possède plusieurs mécanismes pour échapper au système immunitaire. Tout d'abord, il est capable de varier la composition des antigènes présents au niveau des porines, des *fimbriae* et des flagelles. Il est protégé de la phagocytose par une capsule. Il possède aussi des protéases comme ZapA qui lui permettent de dégrader des protéines immunitaires notamment les IgA. Il peut pénétrer dans les cellules uro-épithéliales pour survivre et persister sous forme intracellulaire (Schaffer and Pearson 2015 ; Armbruster and Mobley 2012).

Outre les infections urinaires, *P. mirabilis* est aussi responsable d'infections respiratoires (infections associées aux soins), de la sphère otho-rhino-laryngée (ORL) (otites, sinusites). Ces infections sont souvent associées à la présence simultanée de *Pseudomonas aeruginosa*. Il est aussi responsable d'infections oculaires et cutanées, notamment chez les grands brûlés ou chez le patient diabétique (pied diabétique). *P. mirabilis* est rarement responsable de bactériémie : 1 à 3% (Ahn et al. 2017 ; Observatoire National de l'Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA 2015)). Les bactériémies peuvent être graves du fait de la présence d'une endotoxine. Cette endotoxine induit une réponse systémique inflammatoire qui peut causer un décès dans 20 à 50% des cas (Jacobsen et al.

2008). Enfin, quelques cas de septicémies à la suite d'infections du cordon ombilical chez le nouveau-né prématuré ont été décrits. Ces septicémies se sont compliquées de méningo-encéphalites avec la présence d'abcès cérébraux (Chou et al. 1988 ; Grahnquist, Lundberg, and Tullus 1992).

2. Résistance aux antibiotiques

P. mirabilis est naturellement sensible à de nombreux antibiotiques. Il possède quelques résistances naturelles : polymyxines, cyclines et furanes. De façon intrinsèque, comme tous les *Proteae*, la sensibilité à l'imipénème est diminuée par rapport à d'autres entérobactéries comme *Escherichia coli* avec un seuil épidémiologique « epidemiological cut-off (ECOFF) » égal à 4,0 mg/l pour *P. mirabilis* versus 0,5 mg/l pour *E. coli* (EUCAST http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/). Cette sensibilité diminuée peut-être accrue chez des mutants chez lesquels la protéine liant la pénicilline 1A (PLP1A) est faiblement exprimée et la PLP2 présente une affinité diminuée pour l'imipénème (Neuwirth et al. 1995).

P. mirabilis peut acquérir de nombreuses résistances et devenir multirésistant. En France, le pourcentage de souches de *P. mirabilis* sensibles responsables d'infections (infection urinaire ou bactériémie) reste assez stable entre 2001 et 2015. Ainsi, les pourcentages de souches sensibles isolées dans des hémocultures ont évolués de 48,7 à 37,1% pour l'amoxicilline, de 71,8 à 85,7% pour l'association amoxicilline -acide clavulanique, de 100 à 97,1% pour l'amikacine, de 76,9 à 68,6% pour l'acide nalidixique et de 84,6 à 84,8% pour la ciprofloxacine. Toutes les souches de *P. mirabilis* étaient sensibles au céfotaxime entre 2001 et 2015 (Observatoire National de l'Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA 2015)). Cependant, plusieurs études montrent que la prévalence des

souches multirésistantes augmente de façon inquiétante dans le monde (Ahn et al. 2017). Une étude longitudinale réalisée sur 10 ans à Taïwan a observé une baisse du nombre de souches sensibles aux classes d'antibiotiques principales entre le début et la fin de leur étude. Ainsi entre 2002 et 2012, la sensibilité a diminué significativement pour le céfotaxime (de 92,6% à 81,7%), pour la ceftazidime (de 100% à 95,2%) et à la ciprofloxacine (de 80,1% à 53,8%) (Wang et al. 2014). En Amérique du Nord et en Europe, cette résistance varie en fonction des populations étudiées et des sites infectés. Ainsi, la sensibilité varie entre 74 et 94% pour les pénicillines A associées aux inhibiteurs de β -lactamase, entre 90 et 99% pour les céphalosporines de 3^{ème} génération et entre 60 et 90% pour la ciprofloxacine (Wang et al. 2014). La résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération peut être due à l'acquisition d'une céphalosporinase. La principale céphalosporinase retrouvée chez *P. mirabilis* est l'enzyme de type CMY-2. La prévalence des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) chez *P. mirabilis* varie en fonction des études de 0,7% à 57% (Ahn et al. 2017). Cette variabilité est probablement liée à plusieurs facteurs : pays, population, période étudiée et méthode pour détecter les BLSE. En France, une étude régionale sur 2 ans avait montré un taux de *P. mirabilis* producteurs de BLSE isolés chez des patients hospitalisés égal à 1,7% (de Champs et al. 2004). La plupart des BLSE décrites chez *P. mirabilis* sont des β -lactamases de type CTX-M, TEM et SHV mais il existe aussi des β -lactamases de type VEB et PER (Ahn et al. 2017 ; Pagani et al. 2002 ; Siebor and Neuwirth 2011 ; de Champs et al. 2004). A noter que le risque de décéder chez des patients ayant une bactériémie avec *P. mirabilis* producteur d'une BLSE est plus élevé par rapport aux patients infectés par *P. mirabilis* non producteur de BLSE (Odds ratio (OR) = 11,53 [IC_{95%} : 2,11-63,05]) (Ahn et al. 2017). En ce qui concerne la résistance à haut niveau aux carbapénèmes, des carbapénémases sont en train d'émerger chez les souches de *P. mirabilis*. Les principales carbapénémases retrouvées chez *P. mirabilis* sont des carbapénémases de classe A (KPC-2), de classe B (VIM, NDM) ou de classe D (OXA-48-

like) (Girlich et al. 2017). Cependant d'autres carbapénémases de type oxacillinase OXA-23, OXA-58 principalement retrouvées chez *Acinetobacter baumannii* et des carbapénémases IMP-27 ont déjà été décrites (Girlich et al. 2017 ; Dixon et al. 2016). Ainsi la grande diversité des β -lactamases présentes chez *P. mirabilis* montre sa grande plasticité et ainsi sa capacité à intégrer des gènes de résistance. Ces gènes de résistance sont souvent apportés par des plasmides ou des îlots génomiques tels que des éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs ou « integrative and conjugative elements ») ou des IMEs comme SGI1 ou PGI1(cf paragraphe II.C.4) (Aogáin, Rogers, and Crowley 2016 ; Siebor and Neuwirth 2011; Girlich et al. 2015 ; Siebor and Neuwirth 2014; Ahmed, Hussein, and Shimamoto 2007). Ces structures peuvent conférer aux souches de *P. mirabilis* une multirésistance : aux β -lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones, aux sulfamides et au chloramphénicol (Siebor and Neuwirth 2011 ; Girlich et al. 2015 ; Lei et al. 2014 ; Li et al. 2016).

B. *Salmonella enterica*

1. Généralités

Les infections à *S. enterica* sont l'une des 4 causes principales de maladies diarrhéiques dans le monde d'après l'organisation mondiale de la santé (OMS)(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/fr/>). Toutes les régions du monde sont touchées (Havelaar et al. 2015). *S. enterica*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, est un pathogène de l'homme et des animaux. Il peut être commensal du tube digestif de certains animaux, notamment les animaux à sang froid. Ainsi cette maladie est liée au péril fécal (transmission *via* les aliments contaminés, eaux souillées ou les mains sales). Il existe 2 espèces : *Salmonella enterica* (espèce habituelle) et *Salmonella bongori* (espèce rare). L'espèce *S. enterica* est subdivisée en 6 sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica*. La sous-espèce *enterica* est adaptée à l'homme et aux animaux à sang chaud alors que les autres sous-espèces sont principalement associées aux animaux à sang froid. Il existe environ 2500 sérotypes différents selon la classification de Kauffmann-White, basée sur les caractères antigéniques flagellaires (antigène [Ag] H) et somatiques (Ag O). Il est important de distinguer les salmonelles majeures des salmonelles mineures.

a. Les salmonelles majeures

Les salmonelles majeures correspondent aux sérotypes Typhi, Paratyphi A, strictement humaines et aux sérotypes Paratyphi B ou Paratyphi C. Elles sont responsables de formes invasives qui peuvent entraîner des septicémies, appelées fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. L'incubation est de 1 à 2 semaines.

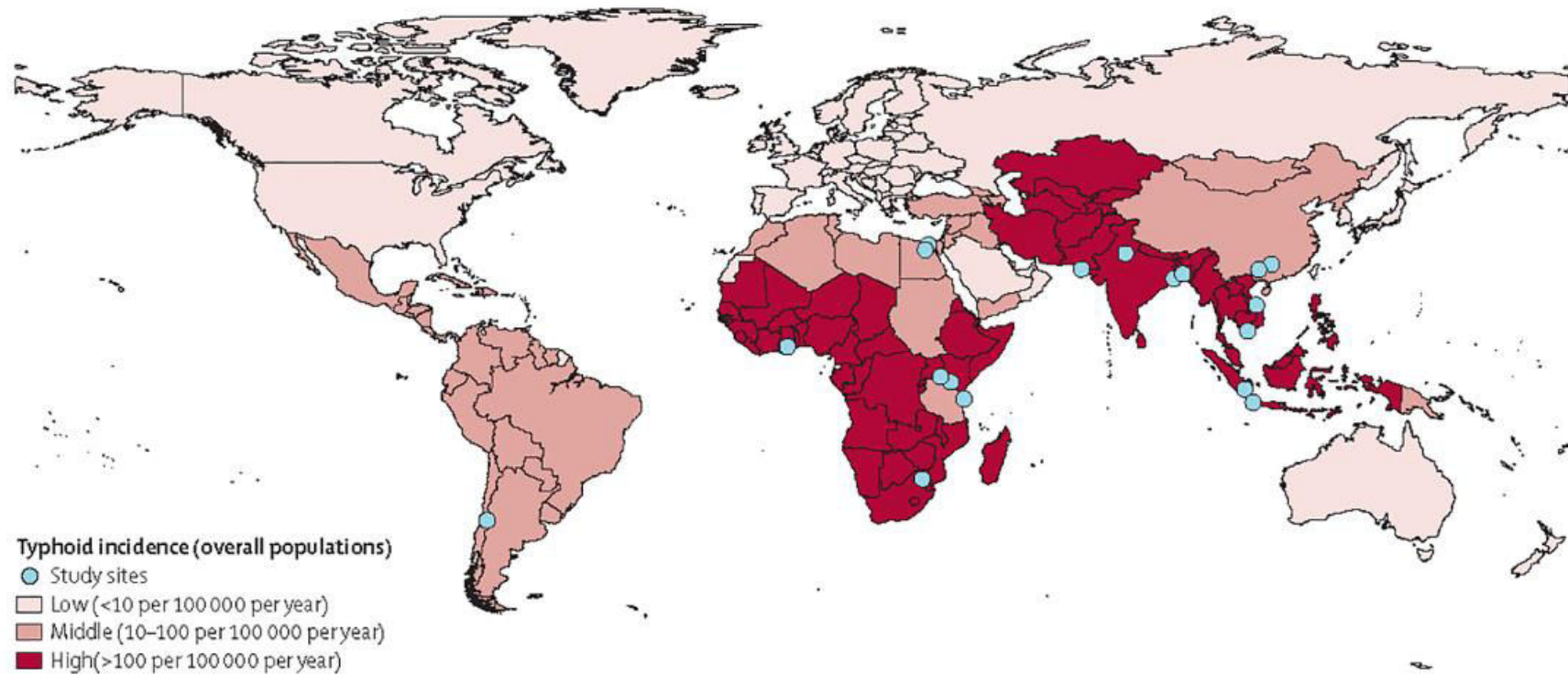


Figure 1 : Incidence des fièvres typhoïdes en fonction des pays en 2010 (Crump et al. 2015)

La fièvre typhoïde se traduit par une fièvre continue avec des céphalées, une anorexie et des douleurs abdominales avec diarrhée « en jus de melon » ou une constipation. Elle peut être associée à des signes cutanés tels que des taches rosées lenticulaires ou à une hépatosplénomégalie ou à des signes neurologiques comme par exemple un état de stupeur et d'abattement (tuphos). Le malade peut devenir porteur sain chronique même après un traitement antibiotique ce qui favoriserait ainsi sa dissémination. En 2010, l'OMS a estimé à 7,6 millions le nombre de cas de fièvre typhoïde causant 52 000 décès (0,68%) et à 1,7 millions ceux de fièvre paratyphoïde responsables de 12 000 décès (0,71%) (Havelaar et al. 2015). Ces fièvres typhoïdes et paratyphoïdes touchent essentiellement les régions d'Afrique et d'Asie. Par contre, l'Amérique du Nord, l'Australie et l'Europe sont essentiellement concernées par des cas d'importation (Figure 1) (Crump et al. 2015).

Il est important de noter qu'il existe dans ces régions des infections à *S. Paratyphi B* variant Java dT+ (fermente le D-tartrate). Ce variant ne provoque pas d'infections invasives mais plutôt des gastro-entérites (Chart 2003). Il doit donc être plutôt considéré comme une salmonelle non typhique même si les caractéristiques biochimiques et sérotypiques sont les mêmes que *S. Paratyphi B*, à l'exception que le variant Java dT+ fermente le D-tartrate. Ce sérotype est souvent isolé chez des propriétaires d'aquarium possédant des poissons tropicaux (Djordjevic et al. 2009).

b. Les salmonelles mineures

Les salmonelles mineures non typhiques sont endémiques dans le monde entier. En 2010, l'OMS a recensé 78,7 millions de cas d'infection à salmonelles non typhiques (salmonellose) dont 59 000 décès (0,07%) (Havelaar et al. 2015). Elles sont pathogènes de l'homme et des animaux, les 2 principaux sérotypes étant Enteritidis et Typhimurium. Il existe aussi des

portages asymptomatiques chez l'homme comme chez les animaux, notamment les animaux domestiques (chiens, chats, reptiles comme la tortue...) qui sont des réservoirs. Les aliments couramment contaminés sont les œufs, la viande, les volailles, le lait et les légumes souillés par le fumier. Cette maladie s'est développée avec l'industrialisation de la production alimentaire (Crump et al. 2015). L'incubation de la maladie est courte de 6 h à 72 h. La salmonellose se manifeste par des diarrhées plus ou moins associées à des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et de la fièvre. La salmonellose est bénigne et spontanément résolutive en 2 à 7 jours. Cependant, il existe des formes invasives qui peuvent dans 6% des cas être associées à des bactériémies (Crump et al. 2015). La gravité de la maladie dépend notamment des facteurs liés à l'hôte et à la souche de Salmonelle.

2. Facteurs de risque d'infections invasives à salmonelles non typhiques

a. Facteurs de risque liés à l'hôte

Il existe des populations plus susceptibles de développer des infections invasives à salmonelles non typhiques. Il s'agit des populations aux âges extrêmes de la vie (les jeunes enfants et les personnes âgées) (Crump et al. 2015 ; Asmar and Abdel-Haq 2016). Dans les pays à faible revenu, la malnutrition, l'anémie et le paludisme sont des facteurs favorisant les infections invasives (Crump et al. 2015). De même les maladies associées à des déficits immunitaires telles que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la drépanocytose, la granulomatose septique chronique, les déficits en cytokines sont des facteurs de risque de développer des infections invasives (Crump et al. 2015 ; Gordon 2008).

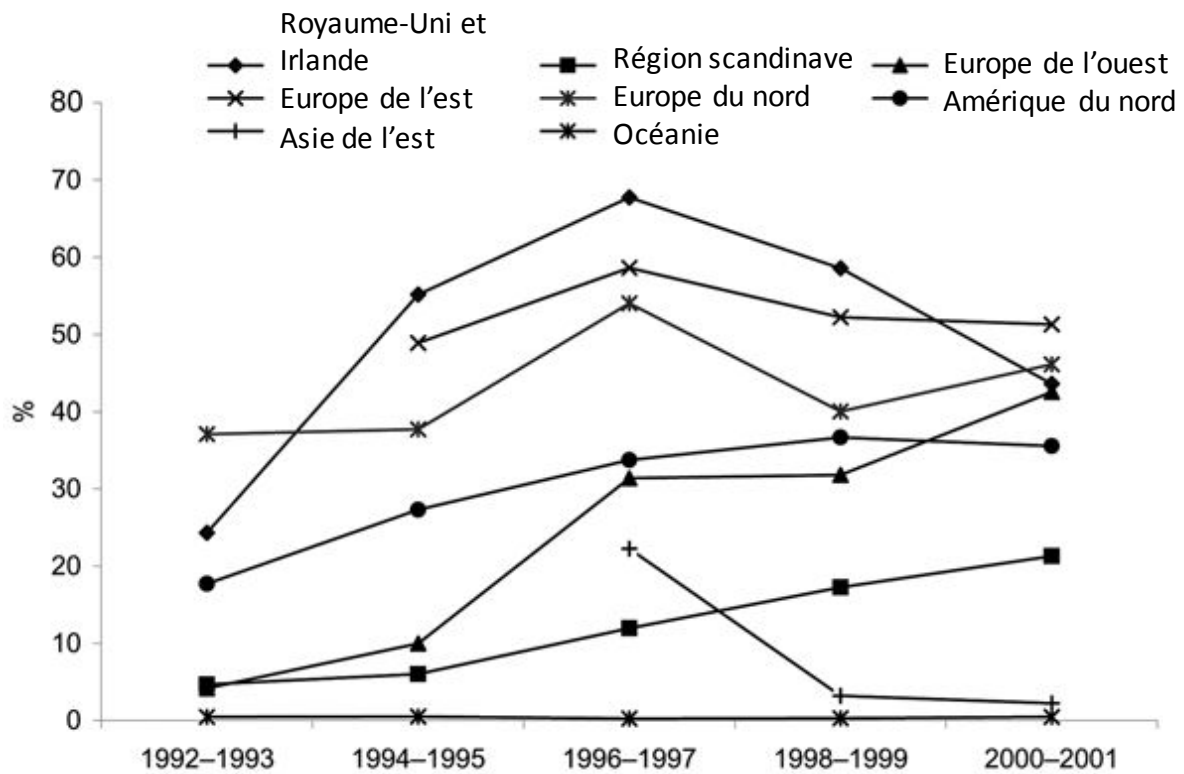


Figure 2 : Pourcentage des *S. Typhimurium* DT104 parmi toutes les *S. Typhimurium* dans 8 régions du monde entre 1992 et 2001 (Daprès Helms et al. 2005)

Les pays représentant les 8 régions du monde sont : la région du Royaume-Uni et de l'Irlande (Angleterre, Ecosse, Pays de Galles et Irlande), la région scandinave (Danemark, Finlande, Norvège, Suède), l'Europe de l'ouest (Autriche, Allemagne et les Pays-Bas), l'Europe de l'Est (la république Tchèque et la Hongrie), l'Europe du sud (Espagne et Israël), l'Amérique du nord (Canada et Etats-Unis), l'Asie de l'est (la Corée) et l'Océanie (Australie et Nouvelle-Zélande).

b. Facteurs de risque liés à la souche de *S. enterica*

i. *Facteurs de risque liés au sérotype de *S. enterica**

Certains sérotypes sont plus souvent associés à des infections invasives. Les sérotypes moins adaptés à l'homme, comme le sérotype Dublin (plutôt retrouvé chez les bovins) et le sérotype Choleraesuis (plutôt spécifique des porcs), sont plus souvent responsables d'infections invasives chez l'homme 64% et 57% respectivement vs 6% pour *S. Typhimurium*. Les sérotypes Heidelberg, Schwarzengrund et Panama sont aussi souvent associés à des infections invasives : 13%, 15% et 18% respectivement. Le sérotype Dublin est aussi responsable d'une plus grande mortalité (3%) (Jones et al. 2008).

ii. *Facteurs de risque liés à certains clones de *S. Typhimurium* multirésistants*

- **S. Typhimurium* DT104 penta-résistant (ACSSuT)*

Dans les années 1980, un clone penta-résistant (ACSSuT) de *S. Typhimurium* de lysotype 104 (DT104) a émergé au Royaume-Uni. Ce clone multirésistant a tout d'abord été isolé dans les années 1980 chez des mouettes et des oiseaux exotiques. Puis il a été retrouvé dans les élevages de bétail (bovins, porcs et moutons) et de volailles du Royaume-Uni. Ce clone a été ensuite responsable d'infections chez l'homme à la suite de transmission *via* la chaîne alimentaire à partir des années 1990 (E. J. Threlfall 2000).

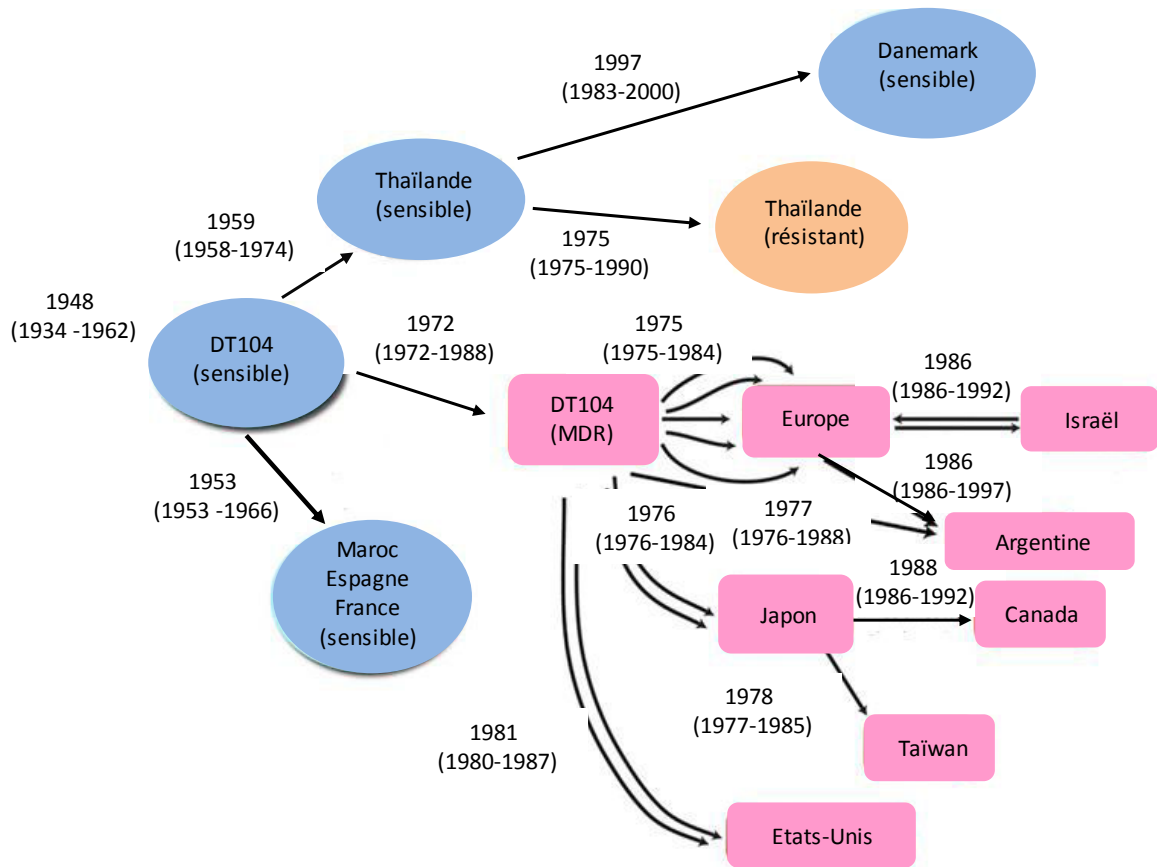


Figure 3 : Schéma de dissémination de *S. Typhimurium* DT104 dans le monde (D'après Leekitcharoenphon et al. 2016)

Il s'est répandu dans le monde *via* l'importation des aliments et du bétail, tout d'abord en Europe puis en Amérique du Nord et enfin dans le monde entier (Glynn et al. 1998 ; Helms et al. 2005). L'Australie et la Nouvelle-Zélande ont été les derniers touchés par cette épidémie probablement du fait de leur isolement géographique et des restrictions d'importation du bétail et de l'alimentation. Depuis les années 2000, le nombre de cas d'infections à *S. Typhimurium* DT104 semble s'être stabilisé (Figure 2) (Helms et al. 2005).

Une étude récente a séquencé le génome entier de 315 souches de *S. Typhimurium* DT104 isolées entre 1969 et 2012 dans 21 pays de 6 continents différents. Après identification et analyse des polymorphismes (SNPs), les auteurs ont pu établir un arbre phylogénétique et mettre en évidence que la première souche de *S. Typhimurium* DT104 sensible a émergé en 1948 (IC_{95%} 1934 – 1962). Cette souche aurait acquis sa région MDR *via* SGI1 en 1972 (IC_{95%} 1972– 1988) et se serait répandue en Europe, puis aux Etats-Unis et enfin au Canada. D'un autre côté les souches européennes se seraient répandues au Japon puis à Taïwan. Ces résultats suggèrent une origine européenne plutôt qu'une origine asiatique *via* les mouettes et les oiseaux exotiques d'Indonésie ou de Hong Kong. L'acquisition de la région MDR des souches de *S. Typhimurium* DT104 en Asie se serait produite indépendamment de celle qui a eu lieu en Europe et aurait eu lieu en 1975 (IC_{95%} 1975– 1990) à Taïwan (Figure 3) (Leekitcharoenphon et al. 2016). En 2001, 84% des souches de *S. Typhimurium* DT104 étaient considérées multirésistantes, dont 94% avaient le phénotype ACSSuT (Helms et al. 2005). La plupart de ces souches contiennent un îlot de résistance de type SGI1 (Mulvey et al. 2006). Certains auteurs suggèrent que cette multirésistance et la présence de l'îlot de résistance pourraient être responsables d'une virulence accrue chez ce clone (cf paragraphe II.D.4).

- *S. Typhimurium de multilocus sequence typing (MLST) ST313*

Depuis quelques années, une épidémie d'infections invasives à *S. Typhimurium* de ST313 sévit en Afrique sub-saharienne (Kingsley et al. 2009). Ces infections sont associées à des signes digestifs dans uniquement 50% des cas mais sont responsables de bactériémies, de méningites et d'infections ostéo-articulaires. La proportion de décès est élevée : de 20 à 25% chez l'enfant et peut atteindre 50% chez l'adulte dans des régions où la prévalence des sujets VIH est élevée (10-20%) (Feasey et al. 2015 ; Mahon and Fields 2016). *S. Typhimurium* devient dans certains pays d'Afrique la 1^{ère} cause de mortalité au cours d'une bactériémie à la place de *Streptococcus pneumoniae* (Mahon and Fields 2016). L'analyse du génome entier a mis en évidence la présence de pseudogènes et de délétions partielles du génome qui sont similaires à ceux retrouvés chez *S. Typhi*. Son génome possède aussi un répertoire de prophages spécifiques à *S. Typhi* et la présence d'un élément composite Tn21-like supportant des gènes de résistance associés au plasmide de virulence pSLT (Kingsley et al. 2009). Le gène *st313-td* détecté dans le génome des *S. Typhimurium* ST313 favoriserait le développement d'une infection invasive notamment en permettant la survie de *S. Typhimurium* au niveau des macrophages (Herrero-Fresno et al. 2014). Il a été détecté sur 76 (92.5%) souches de *S. Typhimurium* isolées dans des hémocultures de patients en Afrique Sub-Saharienne mais aussi dans 25 (100%) souches de *S. Dublin* isolées chez des patients au Danemark (la nature du prélèvement n'a pas été renseignée). Il est important de préciser que cette souche de *S. Typhimurium* ST313 est multirésistante. Elle est résistante en général aux amino-pénicillines, à la kanamycine, à la streptomycine, aux sulfamides et au triméthoprime. La résistance au chloramphénicol émerge du fait d'une pression de sélection au chloramphénicol puisque c'était l'antibiothérapie de 1^{ère} intention notamment dans le cadre du traitement des méningites en Afrique (Kingsley et al. 2009).

- *S. Kentucky de MLST ST198 résistant à la ciprofloxacine*

Enfin, un nouveau clone, *S. Kentucky* de MLST ST198 résistant à la ciprofloxacine, émerge depuis les années 2000. Ce clone est répandu en Afrique du nord et de l'est et est souvent isolé chez des volailles. La majorité des infections en Europe sont des cas d'importation. Cependant, des cas autochtones ont été reportés ce qui laisse suggérer que ce clone se répand en Europe. En 2008, en France, 99 (71,2%) souches de *S. Kentucky* étaient résistantes à la ciprofloxacine parmi les 139 isolées chez l'homme (Le Hello et al. 2011). Les patients infectés par ces souches résistantes à la ciprofloxacine étaient plus souvent hospitalisés (39%) que les patients infectés par *S. Kentucky* sensible à la ciprofloxacine (29%) ($p = 0,009$). La résistance à la ciprofloxacine est due à la présence d'une double mutation dans la gyrase GyrA (Ser83 et Asp87) et d'une substitution dans la topoisomérase ParC (S80I). Ce clone est très souvent porteur de SGI1-K, -P ou -Q. Ce clone de *S. Kentucky* ST198 est aussi présent en Asie du sud-est et porte souvent le dérivé SGI2 (ex- SGI1-J). Ce clone appartient à deux groupes différents X1 (un africain) et X2 (un asiatique) (Le Hello et al. 2011 ; Doublet et al. 2008a ; Le Hello et al. 2013 ; Le Hello et al. 2012).

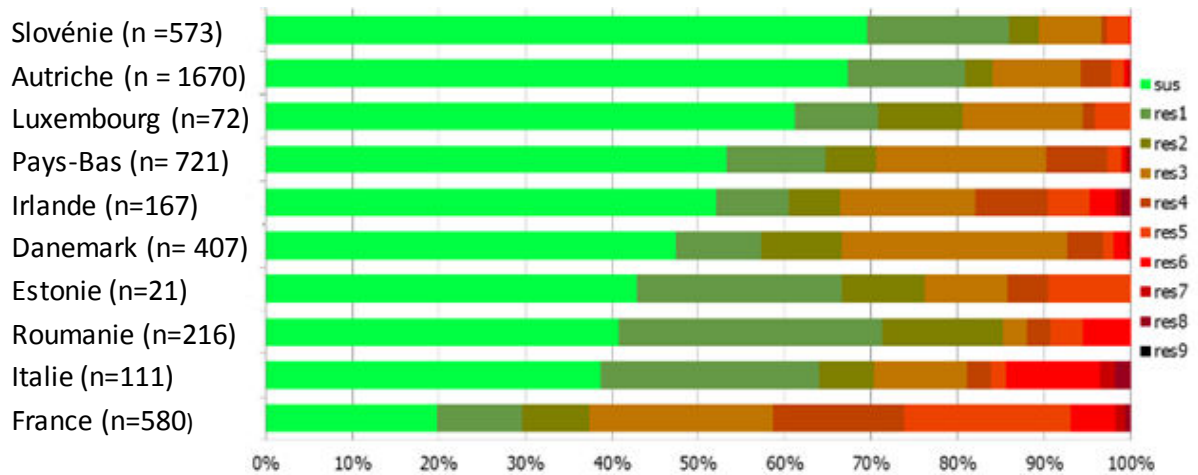


Figure 4 : Distribution de la résistance des souches de salmonelles mineures sensibles ou résistantes à 1 jusqu'à 8 classes d'antibiotique en Europe (Données issues du rapport 2016 de l'European Food Safety Authority 2016).

N= nombre total des souches de *S. enterica* isolées dont le phénotype de résistance a été étudié. sus = sensibilité à toutes les classes d'antibiotique testées, res = résistance de 1 à 9 classes d'antibiotiques les plus utilisées.

3. Résistance aux antibiotiques et traitements

S. enterica est naturellement sensible à de nombreux antibiotiques. Cependant, la résistance évolue ce qui conduit à des changements de stratégie thérapeutique. Dans les années 1970, le traitement de 1^{ère} intention pour les fièvres typhoïdes était le chloramphénicol. Depuis par pression de sélection, des mutants résistants aux antibiotiques sont apparus chez *S. enterica*. Tout d'abord, des mutants résistants au chloramphénicol ont été sélectionnés. Puis des souches multi-résistantes (résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques) ont émergé (Crump et al. 2015). Parmi celles-ci, le clone de *S. Typhimurium* DT104 penta-résistant ACSSuT a diffusé dans les années 1980, au Royaume-Uni puis s'est répandu dans le monde (Helms et al. 2005). Depuis, par pression de sélection d'autres clones MDR sont apparus notamment le clone *S. Kentucky* ST198 résistant à la ciprofloxacine (Le Hello et al. 2011). La résistance aux fluoroquinolones touche aujourd'hui surtout les pays à revenu faible. Selon un rapport de l'OMS publié en 2014 sur la résistance aux fluoroquinolones, la résistance à la ciprofloxacine chez *S. enterica* non typhique se situe entre 30 et 35% en Afrique, entre 46 et 49% dans la région méditerranéenne de l'est et jusqu'à 96% au Pérou (Prestinaci, Pezzotti, and Pantosti 2015). La prévalence des souches à sensibilité diminuée à la ciprofloxacine est aussi élevée en Asie du sud-est : 15% aux Philippines, 25% à Singapour et 46,2% en Thaïlande (Crump et al. 2015). Alors que la résistance à la ciprofloxacine aux Etats-Unis était égale à 0,2% entre 1996 et 2007, celle en Europe atteignait 8,8% en 2014 chez l'homme (Crump et al. 2011). En Europe, la multirésistance chez les salmonelles non typhiques est en moyenne de 26% avec un taux maximal égal à 62,6% en France (Figure 4) (Tableau 1).

Tableau 1 : Proportion des souches de salmonelles non typhiques isolées chez l'homme résistantes aux antibiotiques en France et en Europe en 2014 (Données issues du rapport 2016 de l'European Food Safety Authority 2016)

	France		Europe	
	N	%	N	%
Ampicilline	1255	29,1	11763	28,2
Céfotaxime	-	-	9900	1,1
Ceftazidime	581	2,6	5203	1,2
Acide nalidixique	1256	30%	8882	20,1
Ciprofloxacine	1255	12,7	10530	8,8
Azithromycine	-	-	1299	1,0
Gentamicine	1255	8,8	10352	2,7
Sulfaméthoxazole	1255	38,5	6086	28,6
Triméthoprim	1254	14,4	7623	7,3
Cotrimoxazole	532	17,5	6835	9,2
Tétracycline	1256	40	10767	30,3
Chloramphénicol	1254	9,3	10457	6,0

Certains sérotypes sont beaucoup plus associés à la multirésistance : *S. Kentucky* (74,6%), *S. Typhimurium* monophasique 1,4 [5], 12 :i- (69,4%) et *S. Infantis* (61,9%) (European Food Safety Authority 2016). Aux Etats-Unis, le pourcentage des souches multirésistantes est de 9,8% avec notamment 3,4% de souches exprimant un phénotype de penta-résistance (ACSSuT). Ces souches penta-résistantes appartiennent principalement aux sérotypes *S. Typhimurium*, *S. Dublin* et *S. Newport* (Michael and Schwarz 2016). La résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE ou par acquisition d'une céphalosporinase de type CMY (*S. Newport*) est de plus en plus rapportée dans le monde entier (Arlet et al. 2006). Aux Etats-Unis, elle reste faible (2,5%) (Michael and Schwarz 2016). De même en Europe, où elle est égale à 1,1%, elle est surtout liée au sérotype *S. Kentucky* et à l'émergence d'un clone multirésistant de *S. Infantis* producteur de BLSE en Italie (European Food Safety Authority 2016 ; Franco et al. 2015). A ce jour, quelques cas de salmonelles non typhiques multirésistantes et productrices de carbapénémase de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase) et NDM-1 (New Delhi métallo-β-lactamase) ont été décrits dans différents pays (Chine, Colombie, Pakistan et Etats-Unis) (Crump et al. 2015).

Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont traitées par des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) administrées par voie intra-veineuse (IV) pendant environ 5 jours. Il est possible de réadapter par un traitement *per os* par fluoroquinolones ou azithromycine.

Le traitement des diarrhées à salmonelles mineures est en général symptomatique (réhydratation). Lors de diarrhées sévères, en particulier chez les sujets fragiles, un traitement oral par azithromycine est prescrit pendant 3 à 5 jours en 1^{ère} intention. Il est important de souligner que la résistance à l'azithromycine commence aussi à émerger notamment en Inde (Crump et al. 2015).

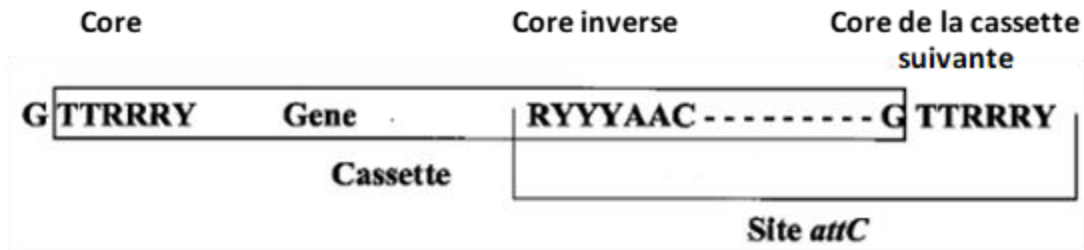


Figure 5 : Structure d'une cassette (D'après Ploy et al. 2000).

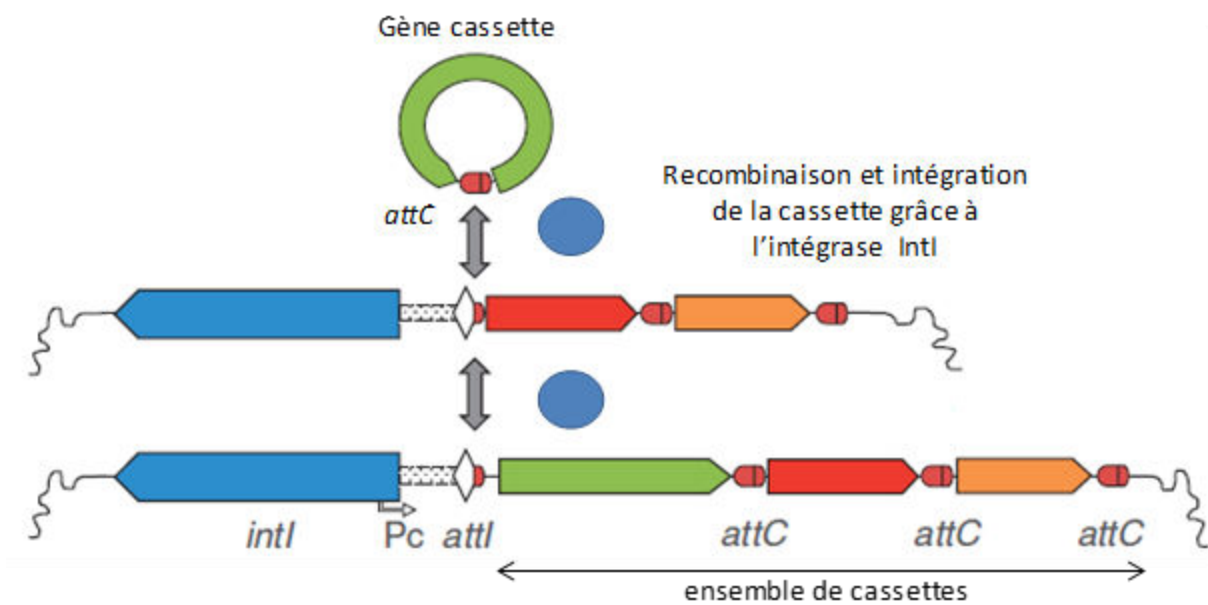


Figure 6 : Mécanisme d'intégration d'une cassette dans un intégron (D'après Gillings et al. 2015).

C. Les éléments génétiques supports de la résistance les plus fréquemment rencontrés chez *P. mirabilis* et *S. enterica*

1. Le système intégron/cassettes

Les intégrons sont formés d'une région 5' conservée (5'CS) et 3' conservée (3'CS) entre lesquelles se trouvent des gènes sous forme de cassette. Ils possèdent des séquences inversées et répétées de 25 paires de bases (pb) IRi et IRt au niveau de leurs extrémités 5' et 3'. La région 5'CS est constituée d'une intégrase (IntI), d'un promoteur actif (P1), d'un promoteur inactif (P2), et d'un site d'attachement *attI*. La région 3'CS varie en fonction du type d'intégron. Les gènes cassettes sont insérés en aval de ce site *attI*. Ces cassettes sont des petites structures d'ADN mobiles qui sont dépourvues de région promotrice. Elles sont constituées d'un site spécifique de recombinaison *attC* et d'un gène qui code en général pour la résistance aux antibiotiques ou aux antiseptiques. Le site est formé de séquences de 7 paires de bases inversées et répétées palindromiques aux extrémités 5' et 3', appelés « core » (GTTRRRY) et « core inverse » (RYYYAAC) (R = purine et Y = pyrimidine) (Figure 5). Ces cassettes existent transitoirement sous forme circulaire et sont intégrées en aval du promoteur de l'intégron par recombinaison entre le site *attC* et le site *attI* de l'intégron grâce à l'intégrase. Elles sont toutes orientées dans le même sens (Figure 6). La transcription des cassettes est régulée par la région promotrice située dans la région 5'CS. Il existe différents variants du promoteur de l'intégron P1 avec une activité variable selon les combinaisons de séquences entre les motifs -35 et -10 (R. M. Hall and Collis 1998).

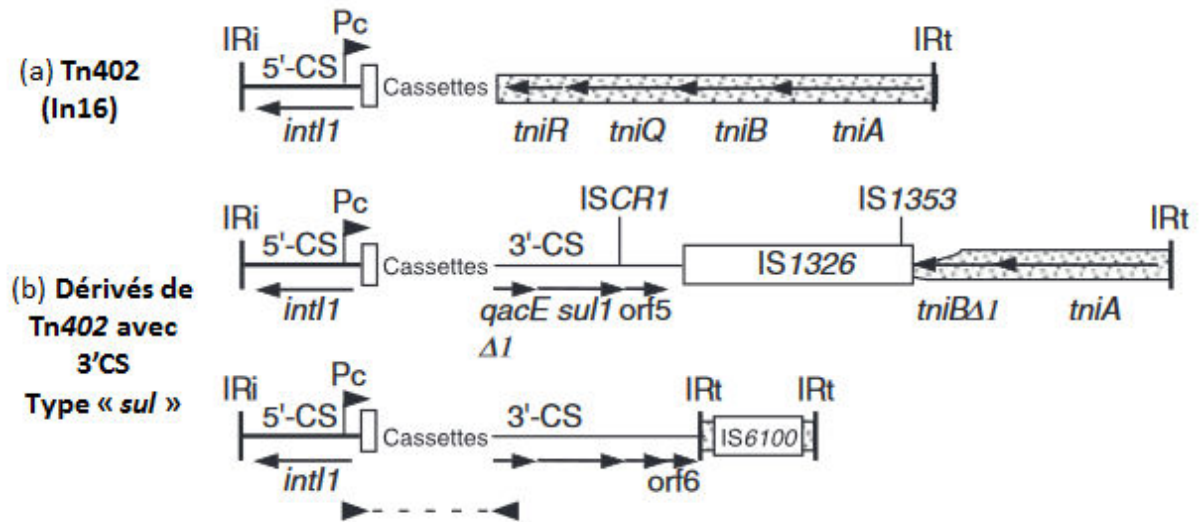


Figure 7 : Structures des intégrons de classe 1 (D'après Patridge et al. 2009)

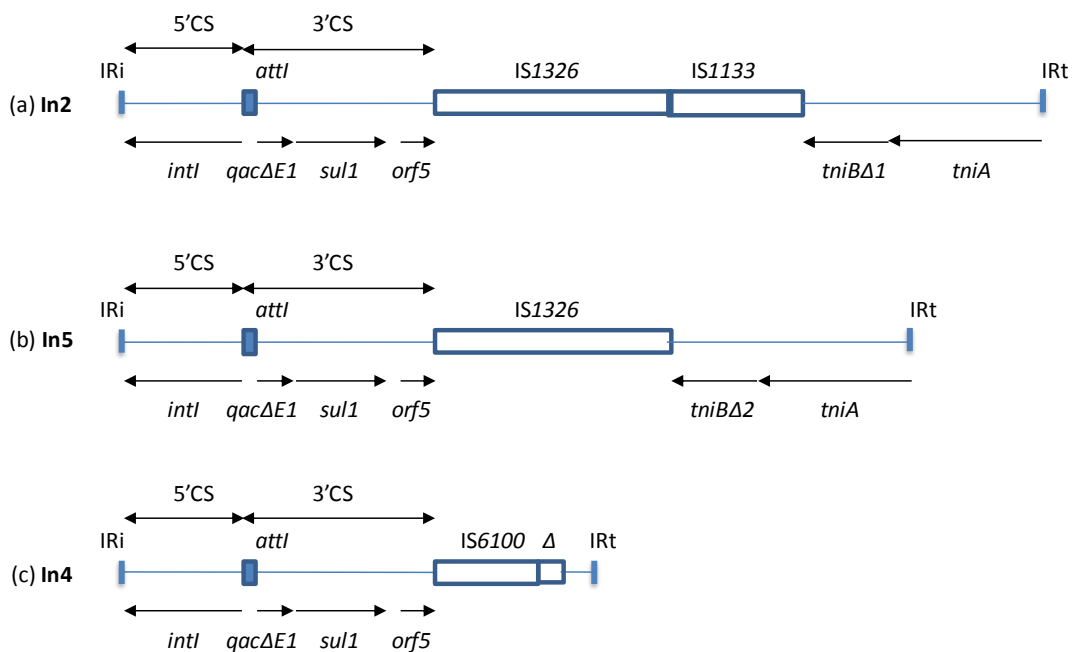


Figure 8 : Structures des intégrons de type In2, In4 et In5 (D'après Partridge et al. 2001)

Ces cassettes sont alors plus ou moins exprimées en fonction de leur éloignement par rapport au promoteur. La dernière intégrée se situe à côté du promoteur et est donc la plus exprimée. Cependant, elles peuvent se mouvoir au sein de l'intégron en fonction de la pression de sélection dans l'environnement ou être excisées. Ainsi, les intégrons sont des systèmes de capture de gènes sous forme de cassettes. Il existe plusieurs classes d'intégrons en fonction de l'intégrase portée (ex : *intI1* pour les classes 1, *intI2* pour les classes 2). Les intégrons de classe 1 et 2 sont les plus fréquents et portent principalement des gènes de résistance. Ils peuvent échanger ces cassettes entre-eux (Partridge et al. 2009 ; Ploy et al. 2000).

a. Les intégrons de classe 1

Les intégrons de classe 1 sont les plus répandus et dérivent du transposon Tn402 (cf paragraphe II.C.2.b). On peut les classer en 2 types : Tn402-like et *sul* type.

Les intégrons de classe 1 de type « Tn402-like » possèdent le module Tni complet de Tn402 dans leur partie 3'. Ainsi, les intégrons de type Tn402 sont à la fois des transposons et des intégrons (Figure 7a).

Les intégrons de classe 1 de type « *sul* » ont une région 3'CS qui contient le gène *qacEΔ1* et le gène *sulI*. Cette région peut contenir les cadres de lecture ouverts orf5 et orf6 (« open reading frame ») de fonction inconnue. Après la région 3'CS, des séquences d'insertion (IS) et une partie du module Tni sont souvent retrouvées (Figure 7b). Par exemple, l'intégron de type In2 possède une IS1326 et une IS1353, l'intégron de type In5 contient seulement une IS1326 et l'intégron de type In4, une IS6100 (Figure 8). Les intégrons de classe 1 de type « *sul* » ne sont pas capables de se mobiliser seuls du fait de l'absence d'une région Tni complète (Partridge et al. 2009 ; Partridge, Brown, and Hall 2002; Partridge et al. 2001).



Figure 9 : Structure des intégrons de classe 2 (D'après Patridge et al., 2009)

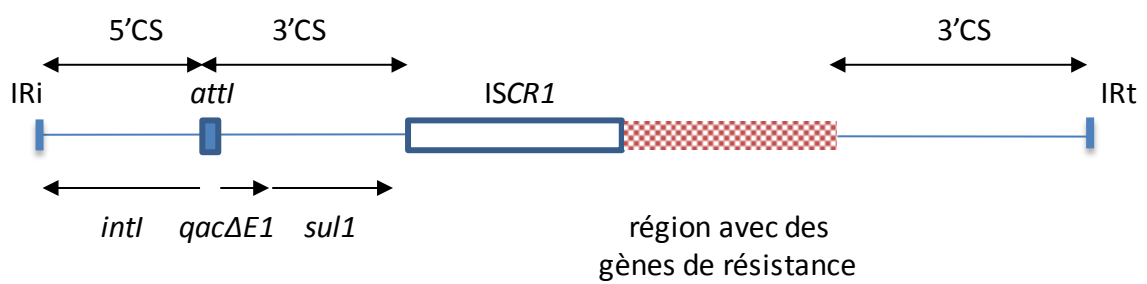


Figure 10 : Exemple d'une structure d'un intégron complexe de classe 1 avec ISCR1.

b. Les intégrons de classe 2

Les intégrons de classe 2 sont moins répandus. Ils sont portés par le transposon Tn7. Le gène *intI2* possède un codon stop. L'intégrase n'est donc pas fonctionnelle. Néanmoins après substitution de ce codon stop, elle devient active. En général, le transposon Tn7 s'insère dans un site spécifique au niveau du chromosome bactérien (Figure 9) (Partridge et al. 2009 ; Peters and Craig 2001).

c. Les intégrons complexes de classe 1

Les intégrons complexes de classe 1 sont constitués d'un intégron de classe 1 de type « *sul* » avec une région 3'CS supplémentaire. Stokes *et al.* ont décrit entre ces 2 régions 3'CS, une région appelée « common region (CR) » et possédant une ORF513 (anciennement appelé ORF341) (Stokes et al. 1993). Cette région a été renommée « insertion sequence common region 1 » (ISCR1) car elle possède un unique cadre de lecture ORF513 qui code pour une transposase. Les ISCR catalyseraient des recombinaisons et permettraient le remaniement des gènes de résistance. Ces gènes de résistance présents entre les 2 régions 3'CS ne sont pas des gènes cassettes puisqu'ils n'ont pas de site *attC* (Figure 10) (Partridge and Hall 2003). Il existe aussi des intégrons complexes avec deux régions 5'CS et deux régions 3'CS voire trois régions 3'CS comme l'intégron In104 et son variant présent dans SGI1 et SGI1-A (cf paragraphe II.D.1) (D. Boyd et al. 2001 ; D. Boyd et al. 2002).

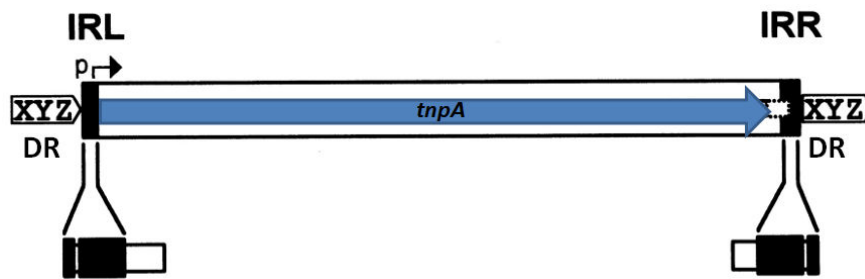


Figure 11 : Structure d'une séquence d'insertion (D'après Mahillon and Chandler 1998)

DR : séquences répétées directes ; IRL et IRR : séquences inversées et répétées gauche et droite ; *tnpA* : gène codant pour la transposase

2. Les éléments transposables ou transposons

Les transposons sont des séquences d'ADN mobiles capables de se déplacer au sein d'une même molécule d'ADN ou entre deux molécules d'ADN présentes dans la cellule (exemple : du chromosome à un plasmide). Ce phénomène de transposition s'effectue par recombinaison aléatoire grâce à la présence d'une transposase et peut aboutir à de grands remaniements génétiques : insertion, délétion ou inversion de l'ADN. Les transposons ne sont en général pas capables de se répliquer. Il existe de nombreux types de transposons et ils peuvent être classés en fonction de leur structure.

a. Les séquences d'insertion (IS) :

Les séquences d'insertion sont les éléments transposables les plus simples avec une taille qui varie entre 1 et 2 kb. Elles possèdent un gène codant pour une transposase encadrée par des séquences inversées et répétées (IRs). Les séquences IRs sont des sites de reconnaissance et de fixation de la transposase qui lui permettent d'initier et de terminer la transposition. Cette transposition génère des duplications de cible (DR) au niveau de l'ADN cible de chaque côté de l'IS. La taille des DRs varie en fonction des IS (Figure 11) (Mahillon and Chandler 1998).

Les ISCR présentes dans les intégrons complexes de classe 1 appartiennent à la famille IS91. Dans cette famille, les séquences IRs sont remplacées par des séquences *oriIS* (origine de répllication) et *terIS* (terminaison de répllication) (Toleman, Bennett, and Walsh 2006). A la différence des autres IS, leur transposition se déroule selon un mécanisme de répllication par cercle roulant comme les plasmides et les phages.

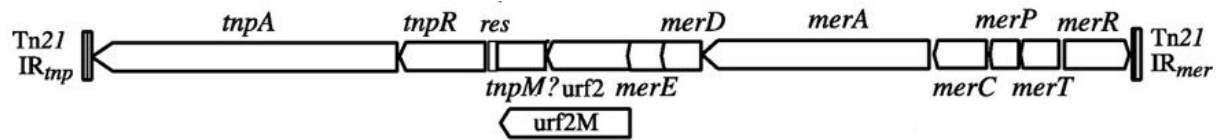


Figure 12 : Exemple d'une structure d'un transposon non composite : Tn21 (D'après Liebert, Hall, and Summers 1999)

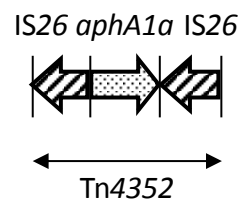


Figure 13 : Exemple d'un transposon composite contenant un gène de résistance *aphA1a* codant pour la résistance à la kanamycine : Tn4352

Parfois au cours de cette réplication, la séquence *terIS* n'est pas reconnue par la transposase qui continue sa réplication et ainsi intègre des séquences d'ADN en aval de la séquence *terIS*. Ce mécanisme pourrait expliquer la formation des intégrons complexes de classe 1 (Toleman, Bennett, and Walsh 2006).

b. Les transposons non composites

Les transposons non composites sont composés d'un gène codant pour une transposase (*tnpA*) et d'un gène codant pour une résolvasse (*tnpR*) qui sont encadrés par 2 séquences inversées et répétées de 35 à 48 pb en orientation inverse. Ils contiennent aussi d'autres gènes qui sont notamment des gènes codant pour la résistance comme dans les transposons Tn3, Tn1721, Tn21, Tn5393, Tn1696 par exemple (Figure 12) (Lett 1988 ; Liebert, Hall, and Summers 1999). Ils peuvent être de grande taille (jusqu'à 70 kb).

c. Les transposons composites

Les transposons composites résultent de l'association de 2 séquences d'insertion identiques qui peuvent encadrer des gènes aux fonctions diverses et ainsi les mobiliser. Ces gènes peuvent coder pour la résistance aux antibiotiques (exemple : Tn4352) (Figure 13). Les transposons composites ont une taille en général inférieure à 10 kb.

d. Les transposons conjugatifs

Ces transposons non composites sont capables de se mobiliser entre 2 cellules et s'apparentent ainsi aux éléments intégrés conjugatifs. Ils seront abordés plus en détail avec les éléments intégrés conjugatifs dans le paragraphe II.C.4.a.

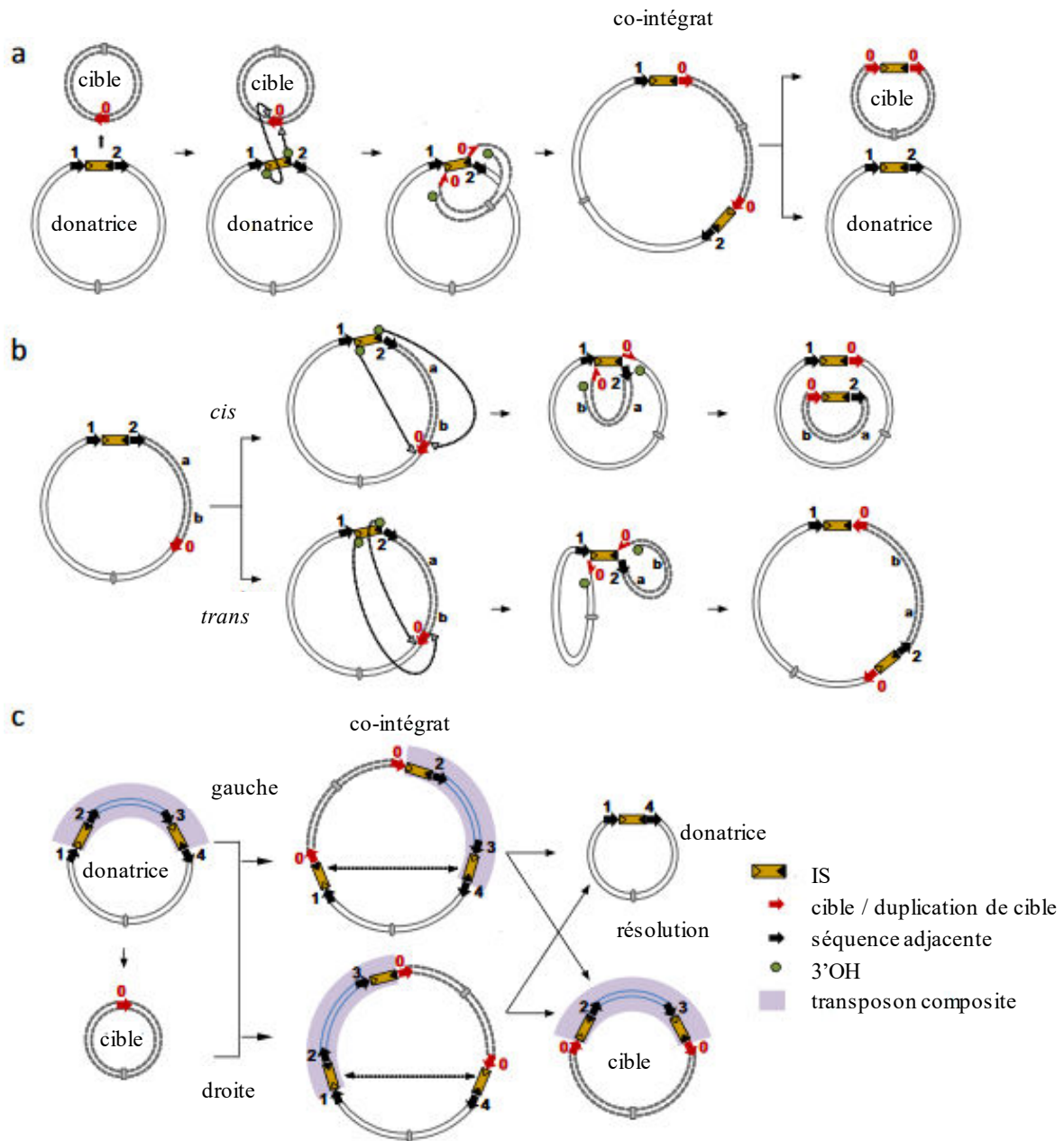


Figure 14 : Mécanismes de transposition répliquative par une séquence d'insertion (D'après He et al. 2015). (a) Transposition intermoléculaire. (b) Transposition intramoléculaire. (c) Transposition intermoléculaire d'un transposon composite.

e. Mouvements des IS26 générant des transposons et des réarrangements dans les régions multirésistantes

Les séquences d'insertion IS26 peuvent se mobiliser par transposition répllicative. Cette transposition est répllicative car l'IS26 est dupliquée et des DR sont générées. Elle peut être intermoléculaire ou intramoléculaire (Figures 14 a et b). Elles peuvent être responsables de la perte de la fonction d'un gène dans la molécule cible. Au cours du mécanisme de transposition intermoléculaire (2 molécules d'ADN distinctes), la transposase de l'IS clive l'ADN au niveau des 2 séquences répétées et inversées et génère ainsi des groupes 3'-OH qui vont attaquer l'ADN cible appartenant à l'autre molécule. Les deux molécules d'ADN sont alors fusionnées. La répllication de l'ADN génère la formation d'un co-intégrat contenant deux IS26 et des DR (Figure 14 a). De la même façon, l'IS26 peut transposer au sein de la même molécule d'ADN, c'est ce que l'on appelle la transposition intramoléculaire. Il existe deux voies possibles de transposition intramoléculaire : la transposition en *cis* ou la transposition en *trans*. La transposition en *cis* se produit lorsque les groupes 3'OH générés après le clivage des séquences inversées répétées, attaquent le même brin d'ADN. Cette transposition en *cis* provoque alors une délétion d'un segment d'ADN associé à une IS26. La transposition *en trans* est induite lorsque la transposition s'effectue sur le brin opposé ce qui provoque une inversion du segment d'ADN avec deux IS26 en sens opposé (Figure 14 b).

Les transposons composites encadrées par des IS26 peuvent aussi transposer dans une autre molécule d'ADN ne possédant pas d'IS26 comme un plasmide par exemple. Cette transposition peut être induite par chacune des deux IS26. De la même façon que pour la transposition répllicative intermoléculaire, un co-intégrat intermédiaire est formé et une copie d'IS26 est générée ainsi qu'une duplication de cible.

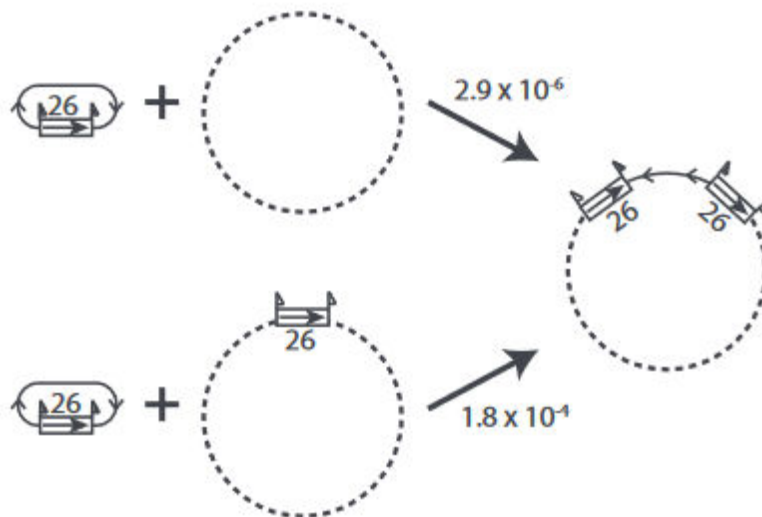


Figure 15 : Les deux modes de formation d'un co-intégrat par transposition d'IS26 (D'après Harmer, Moran, and Hall 2014).

Un mode de transposition répllicative intermoléculaire (cible aléatoire, duplication d'IS26 et génération de DR) et un mode de transposition conservative (cible est une IS26, absence de duplication d'IS26 et de génération de DR). Dans les deux cas les IS26 sont dans la même orientation.

Ce co-intégrat est résolu par recombinaison homologue qui génère deux structures : la molécule cible qui a acquis le transposon composite et la molécule donneuse du transposon composite qui perd le transposon composite et ne conserve alors qu'une IS26. Des DR sont générées de chaque côté du transposon composite dans la molécule cible (Figure 14 c) (He et al. 2015).

Il a été observé que la formation d'un co-intégrat intermoléculaire est stimulée en présence d'une IS26 dans la molécule cible. Cette réaction est catalysée par la transposase et est conservative puisqu'il n'est pas retrouvé de nouvelle copie d'IS26 ni de DR (Figure 15). Contrairement au mécanisme de recombinaison homologue, cette réaction se produit en absence de recombinaison RecA (Harmer, Moran, and Hall 2014). Cette réaction est plus fréquente que la transposition répliquative ou que la recombinaison homologue. Les IS26 sont alors toujours dans la même orientation (Harmer and Hall 2016).

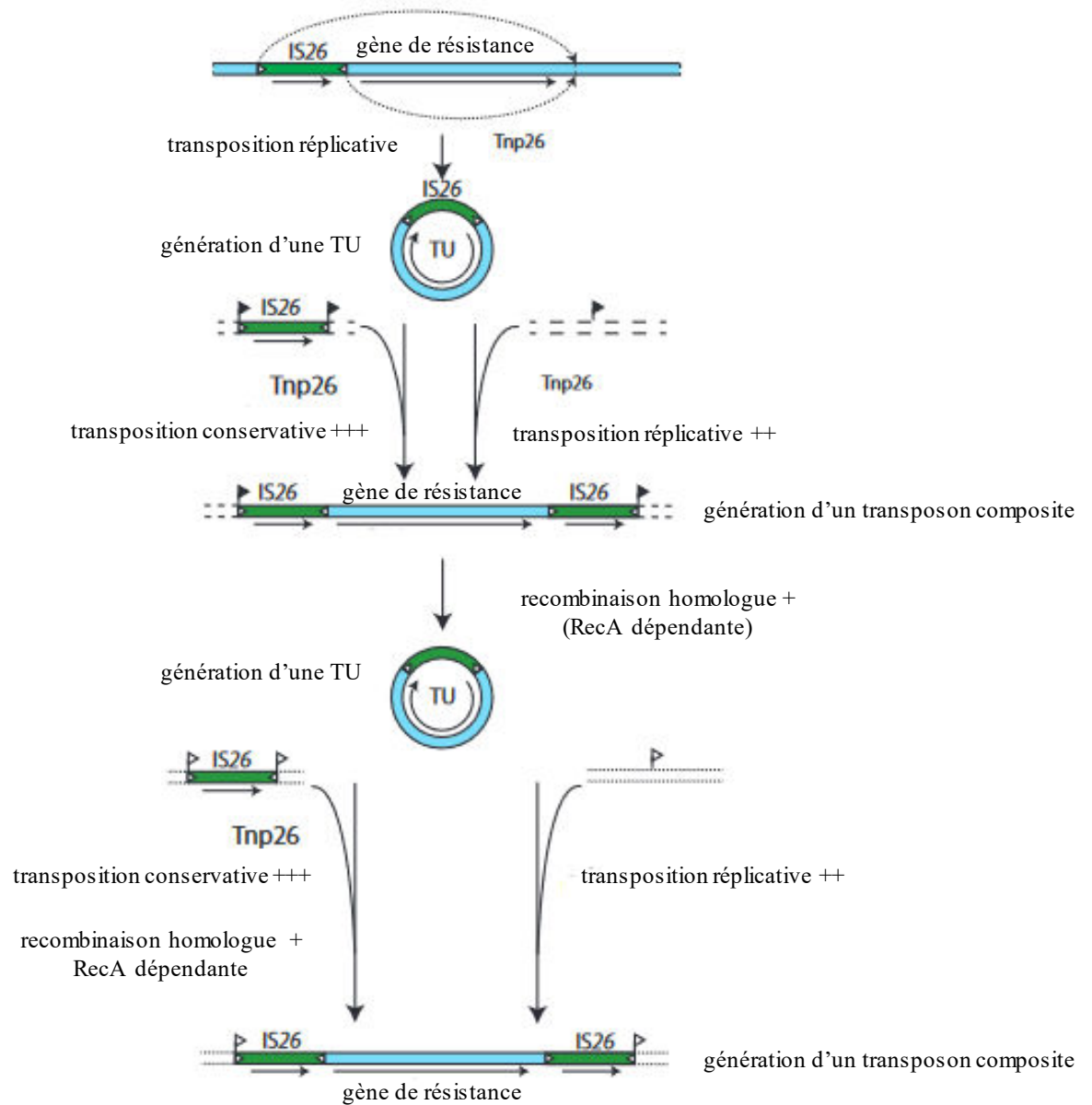


Figure 16 : Mécanismes de formation et d'incorporation d'une unité translocable (TU) générant un transposon composite (D'après Harmer and Hall 2016).

Les mécanismes de recombinaisons homologues ou de transpositions répliquatives intermoléculaire et intramoléculaire en *cis* peuvent générer des unités translocables (TU) constituées d'une IS26 associée à un segment d'ADN adjacent qui peut être un gène de résistance. Ces TU peuvent alors s'incorporer dans un nouveau site soit par transposition répliquative, soit par recombinaison homologue ou par réaction conservative catalysée par une transposase (Figure 16) (Harmer and Hall 2016).

3. Les plasmides

Les plasmides se présentent sous la forme d'ADN double brin circulaire de taille variable (quelques kb à plusieurs centaines de kb) et sont présents dans le cytoplasme de certaines bactéries. Ils sont capables de se répliquer de façon autonome grâce à la présence d'une origine de réplication. Ils sont présents dans la cellule bactérienne en une à plusieurs copies en fonction du type de plasmide. Ils possèdent un ensemble de gènes codant pour le système de réplication et le système de partition qui permettent leur réplication, la régulation du nombre de copies dans la cellule et assurent la transmission verticale « mère-fille » du plasmide. Ils disposent aussi parfois de systèmes toxine/ antitoxine qui permettent d'assurer la stabilité de ces plasmides dans le temps. Ces systèmes toxine/ antitoxine sont constitués d'une toxine intracellulaire stable dont l'activité est délétère pour la cellule et d'une antitoxine instable (hydrolysée par les protéases ou RNases) qui neutralise la toxine en interagissant directement avec elle. Ainsi, dès l'entrée du plasmide dans la cellule, seules les cellules filles qui possèdent ce système peuvent survivre alors que celles qui ne les possèdent pas sont tuées par la toxine qui est plus stable. Ce phénomène est appelé la mort programmée ou « post-segregational killing » (Carattoli 2009). Les plasmides présentant de fortes homologies au

niveau des gènes de réplication et de partition sont incompatibles et ne peuvent donc pas cohabiter dans la même cellule. Cette incompatibilité a permis de classer les plasmides en fonction de leur groupe d'incompatibilité (Inc) (Novick 1987). Le spectre d'hôte peut être étroit comme par exemple celui des plasmides de type IncF ou large comme celui des plasmides de type IncP, IncA/C et IncQ (Carattoli 2009). Ces plasmides non essentiels à la bactérie portent des gènes codant pour des fonctions diverses et variées qui peuvent lui apporter un avantage pour vivre dans son milieu. Ainsi, il existe des plasmides de virulence comme le plasmide pSLT présent chez *S. enterica* ou des plasmides de résistance comme les plasmides du groupe IncA/C conférant une multirésistance chez les entérobactéries notamment chez *S. enterica* (Kingsley et al. 2009 ; Lindsey et al. 2009). Les plasmides sont des éléments qui peuvent permettre de transférer horizontalement, c'est-à-dire d'une cellule à l'autre un grand nombre de gènes. Ce transfert de gènes s'effectue par mécanisme de conjugaison et est le principal mécanisme de transfert horizontal. C'est un mécanisme répliatif qui s'effectue grâce à un *pilus* sexuel sécrété par la cellule donatrice qui permet d'établir un contact avec la cellule réceptrice et former un pore qui servira de tunnel pour transférer l'ADN. Seuls les plasmides conjugatifs sont dotés des gènes *tra* (*tra* +) qui permettent la synthèse du *pilus*, la stabilisation et l'agrégation de l'ADN simple brin lors du transfert. Les plasmides non conjugatifs nécessitent la présence d'un autre plasmide conjugatif dans la cellule pour pouvoir transférer leur ADN. Les plasmides de résistance sont en général des plasmides conjugatifs (exemple : le plasmide IncA/C) (Bennett 2008).

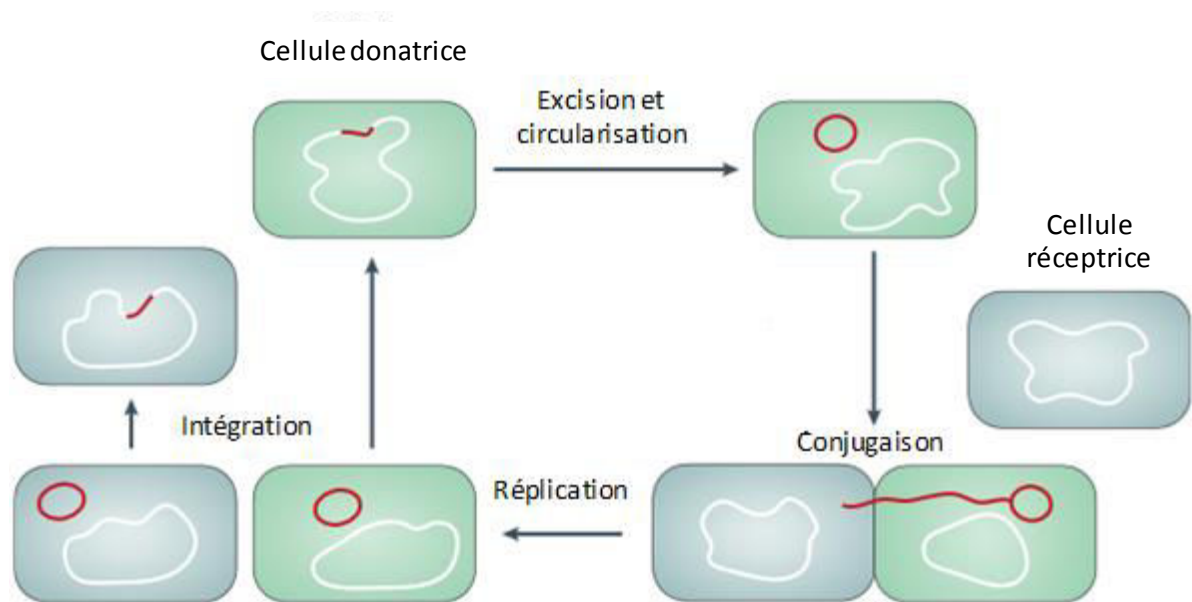


Figure 17 : Schéma du cycle de vie des éléments intégratifs et conjugatifs (D'après Wozniak and Waldor 2010)

Les ICEs s'excisent du chromosome, se circularisent, se répliquent et sont transférés dans l'autre cellule grâce à leur module de transfert conjugatif.

4. Les éléments intégratifs et transférables

a. Les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs)

Les ICEs sont définis comme des éléments intégrés au chromosome au niveau d'un site de recombinaison spécifique et capables de s'exciser sous forme circulaire, de s'auto-transférer dans une autre cellule et de s'intégrer dans le génome de leur hôte quel que soit le mécanisme d'intégration (site spécifique ou non) et de conjugaison (Figure 17) (Burrus et al. 2002 ; Wozniak and Waldor 2010). Cette définition rassemble plusieurs groupes d'éléments intégratifs et conjugatifs anciennement appelés : les transposons conjugatifs, les plasmides IncJ et les « constins » (ou « conjugal self transmissible integrating element »). Dans les années 1970, les plasmides IncJ, comme R391, isolé de *Providencia rettgeri*, ont été caractérisés comme plasmide d'un nouveau groupe d'incompatibilité IncJ car ils ne génèrent pas d'incompatibilité avec les autres plasmides, étaient retrouvés sous forme circulaire et étaient capables de s'auto-transférer dans une autre cellule. De même, dans les années 1980, les transposons conjugatifs comme Tn916, décrits pour la première fois chez *Enterococcus faecalis*, ont été définis comme des transposons capables de se mobiliser entre cellules et de s'intégrer dans différents sites. Enfin, les co-intégrats ou « constins » comme SXT, ont été caractérisés comme des éléments intégratifs et conjugatifs qui s'insèrent en général au niveau d'un même site dans le chromosome (Burrus et al. 2002 ; Toleman and Walsh 2011). Au cours d'une épidémie de choléra en Inde et au Bangladesh en 1993, l'élément SXT, codant pour la résistance au sulfaméthoxazole, triméthoprime et streptomycine, a été retrouvé pour la première fois chez *Vibrio cholerae* 0139. Depuis, SXT et R391 ont été classés dans la famille des ICEs de type SXT/R391 (Carraro and Burrus 2014).

Les ICEs intégrés dans le chromosome sont répliqués et sont ainsi transmis de façon verticale aux cellules filles. Pour ce qui est de la transmission horizontale, les ICEs disposent

de 3 modules différents : un module de transposition, un module de transfert conjugatif et un module de régulation. Le module de transposition est constitué d'une intégrase (*int*) et d'une excisionnase (*xis*). L'intégrase appartient en général à la famille des tyrosines recombinases et permet l'intégration et l'excision des ICEs. En fonction du type d'ICEs, l'excisionnase est indispensable à l'action de l'intégrase ou alors joue un rôle accessoire. Ces deux enzymes agissent au niveau des jonctions *attR* et *attL* de l'ICE intégré au chromosome et permettent l'excision de l'ICE. Par recombinaison au niveau de ces deux jonctions, l'ICE se circularise et forme le site de recombinaison *attP*. Une fois l'ICE excisé, le site de recombinaison du chromosome *attB* reste intact ce qui permettra la ré-intégration de l'ICE au niveau de ce site. L'ICE circularisé peut se répliquer et s'auto-transférer grâce à son module de transfert conjugatif (Figure 17). Ce module de transfert conjugatif est constitué d'une origine de transfert (*oriT*) comme pour les plasmides, d'une relaxase (ex : *traI* pour SXT) et d'un système de sécrétion d'ADN. Pour les bactéries à Gram négatif, ces systèmes de sécrétion sont apparentés aux systèmes de sécrétion de type IV qui sont encodés par exemple par des gènes *tra* pour SXT.

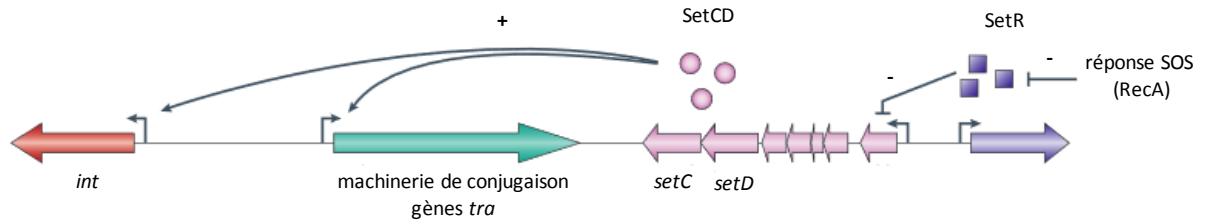


Figure 18 : Mécanisme de régulation de l'intégration, de l'excision et du transfert conjugatif des éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs) appartenant à la famille des SXT/R391 (D'après Wozniak and Waldor 2010)

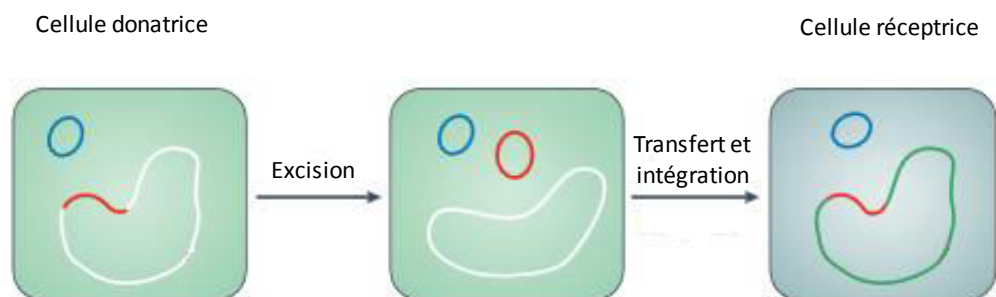


Figure 19 : Processus de mobilisation en *trans* et transfert dans une cellule réceptrice d'un élément mobilisable et intégratif (IME) (en rouge) par l'intermédiaire d'un élément intégratif et conjugatif (ICE) (en bleu) (D'après Wozniak and Waldor 2010)

L'excision et la conjugaison des ICEs sont régulées en fonction des signaux environnementaux. Par exemple, le transfert des ICEs de type SXT/R391 est régulé par le répresseur SetR. Cette protéine inhibe l'expression des gènes *setC* et *setD* sous forme d'un complexe setCD qui est un activateur transcriptionnel des gènes requis pour le transfert de SXT (gènes *int* et *tra*) et des gènes nécessaires pour le maintien de l'ICE dans la cellule (gènes codant pour le système toxine/antitoxine de SXT). Cette répression est notamment levée suite à l'exposition à des molécules comme les fluoroquinolones ou la mitomycine C qui provoquent des altérations de l'ADN et déclenchent alors la réponse SOS. Cette réponse SOS induit l'activation de la recombinaison RecA qui elle-même active l'auto-clivage de SetR et diminue ainsi la répression sur l'expression des gènes *setC* et *setD* (Figure 18) (Wozniak and Waldor 2010). Les ICEs possèdent des gènes codant pour des protéines aux fonctions connues qui apportent un avantage à la bactérie comme des gènes de résistance ou de virulence et des gènes codant pour des fonctions inconnues. Chez *P. mirabilis*, au moins 5 ICEs, appartenant à la famille des ICEs de type SXT/R391 ont été décrits dont l'ICE*PmiJpn1* qui porte un gène *bla_{CMY-2}* codant pour une céphalosporinase (Harada et al. 2010 ; Li et al. 2016; Aogáin, Rogers, and Crowley 2016).

b. Les éléments intégratifs et mobilisables

Les éléments intégratifs et mobilisables (IMEs) dérivent des ICEs et ont probablement perdu certaines de leurs fonctions. En effet, ils ne sont pas auto-transférables. Les IMEs sont des éléments intégrés au chromosome qui peuvent s'intégrer et s'exciser du chromosome sous forme circulaire grâce à leur intégrase mais nécessitent la présence d'éléments conjugatifs pour être mobilisés et transférés dans une autre cellule (Figure 19) (Bellanger et al. 2014 ; Wozniak and Waldor 2010). Les IMEs sont retrouvés chez les bactéries à Gram positif

comme chez les bactéries à Gram négatif. Les îlots de résistance SGI1 sont des IMEs (Doublet et al. 2005).

D. Les îlots de résistance chez les entérobactéries

1. Structure des îlots de résistance de type *Salmonella* genomic island 1 et des îlots apparentés

a. *Salmonella* genomic island 1 (SGI1)

SGI1 a été caractérisé pour la première fois dans une souche de *S. Typhimurium* DT104 isolée au Canada appartenant au clone épidémique penta-résistant (ACSSuT) (cf paragraphe II.B.2.b.ii) (D. A. Boyd et al. 2000).

SGI1 est constitué de deux parties : un squelette de 27,4 kb et une région MDR de 15 kb. SGI1 est situé à l'extrémité 3' du gène chromosomique *trmE* et en amont de l'intégrase *int2* d'un rétron inséré entre *trmE* et le gène chromosomique *gidY* de *Salmonella* Typhimurium (Figure 20). Ce rétron possède une transcriptase inverse et un ARN qui sert d'opéron et de substrat pour la synthèse de l'ADN complémentaire et ressemble ainsi à un rétron-phage. Le pourcentage de G+C de ce rétron est égal à 32%. L'origine et la fonction de ce rétron est à ce jour encore inconnue (Ahmed and Shimamoto 2003; Matiasovicova et al. 2003). Aux extrémités 5' et 3' de cet îlot, des séquences répétées imparfaites (DR-L et DR-R) sont présentes. DR-L se situe au niveau des 18 dernières paires de bases du gène chromosomique *trmE* et est apporté par SGI1 et DR-R correspond aux 18 dernières paires de bases de *trmE*. SGI1 a un GC% égal à 49,2%. Ce GC% est variable en fonction des régions. Ainsi le squelette a un GC% égal à 44% alors que la région MDR a un GC% égal à 58,7%. Ce GC% diffère de celui de *S. enterica* (52%) évoquant une origine différente de SGI1 (D. Boyd et al. 2001).

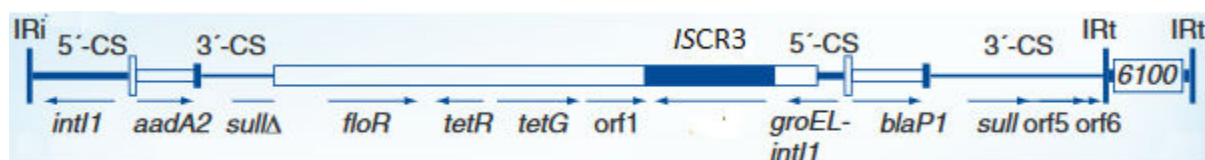


Figure 21: Région MDR de SGI1 formée par un intégron complexe de classe 1 In104 codant pour la penta-résistance (ACSSuT) (D'après Hall 2010)

Le squelette de cet îlot est constitué de 28 ORFs numérotées : S001 à S027 et S044 (Figure 20). A ce jour, la fonction des ORFs n'est connue que pour certaines. S001 code pour une intégrase appartenant à la famille des tyrosine-recombinases et s'exprime de manière constitutive. S027 code pour une recombinase qui appartient à la famille des résolvas. S002 code pour une excisionnase. Les ORFs S006 [*sgaC* (ex-*flhC*_{SGH1})] et S007 [*sgaD* (ex-*flhD*_{SGH1})] codent pour des protéines de régulation qui sont des activateurs transcriptionnels qui appartiennent à la famille des *flhDC* tout comme les systèmes *acaCD* chez les plasmides IncA/C et les systèmes *setCD* chez les ICEs de la famille SXT/R391 (Kiss et al. 2015). Les ORFs S005 (*traN*), S011 (*traG*) et S012 (*traH*) présentent des homologies avec des gènes codant pour des protéines qui ressemblent aux protéines de transfert mais seraient non fonctionnelles (Carraro et al. 2015). Les ORFs S025 (*sgiT*) et S026 (*sgiA*) codent pour un système toxine/antitoxine (Huguet et al. 2016).

La région MDR de cet îlot est adjacente à la résolvas (S027) site spécifique d'intégration des intégrons de classe 1 et est encadrée par des DR de 5 paires de bases formées au moment de la transposition de cette région. Cette région codant pour la penta-résistance (ACSSuT) est constituée d'un intégron complexe de classe 1 de type In4 (présence d'une IS6100) appelé In104 et possédant 16 ORFs (S028 à S043). Il possède deux régions 5'CS et 3'CS qui contiennent chacune un site *attI* avec des gènes cassettes et encadrent une ISCR3 (ex-orf2). La première région 3'CS possède un gène *sull* partiel et dans la 2^{ème} région 5'CS, le gène de l'intégrase est fusionné avec le gène *groEL*. Les gènes cassettes présents au niveau des deux sites *attI* sont : *aadA2* et *bla*_{PSE-1} (Annexe 1). D'autres gènes *tetA(G)* et *floR* sont situés en aval de ISCR3 (Figure 21) (Annexe 1). Ces gènes ont été retrouvés dans des plasmides portés par des bactéries de l'environnement comme *Photobacterium damsela* ou *Pseudomonas spp.* ou chez des entérobactéries comme *K. pneumoniae* et *E. coli*. (D. Boyd et al. 2001 ; D. Boyd et al. 2002 ; R. M. Hall 2010).

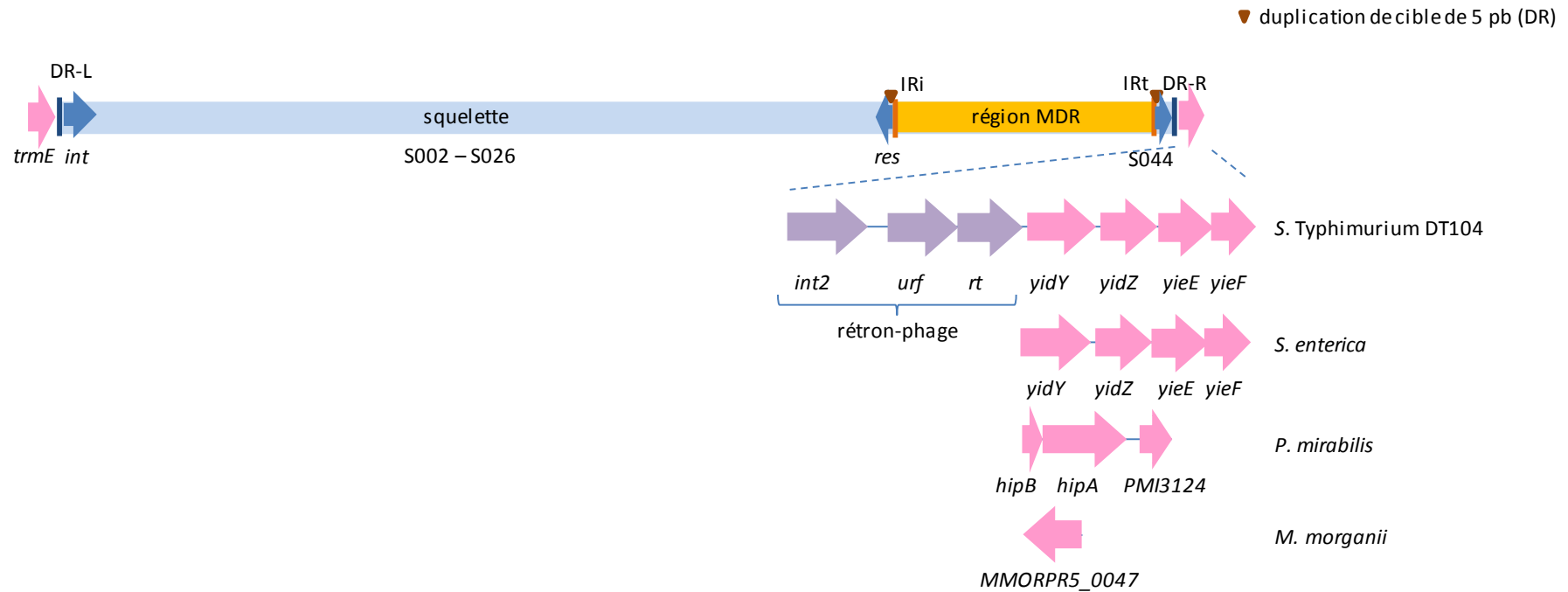


Figure 22 : Localisation de *Salmonella* genomic island 1 et de sa région MDR en fonction des espèces bactériennes.

b. Variants de SGI1

Depuis la description de SGI1 de nombreux variants ont été rapportés de SGI1-A à SGI1-Z (Annexes 2 et 3) (D. A. Boyd et al. 2000; D. A. Boyd et al. 2002; Doublet et al. 2003; Doublet et al. 2004b; Doublet et al. 2004a; Levings et al. 2005; Cloeckart et al. 2006; Levings et al. 2007; Vo et al. 2007; D. A. Boyd et al. 2008; Doublet et al. 2009b; Djordjevic et al. 2009; Wilson and Hall 2010; Targant et al. 2010a ; Bi et al. 2011; Siebor and Neuwirth 2011; Lei et al. 2014, Lei et al. 2015; Qin et al. 2015).

SGI1 et ses variants ont été identifiés dans différents lysotypes de *S. Typhimurium* (DT1, DT12, DT120, U302) mais aussi dans différents sérotypes comme Agona, Albany, Anatum, Cerro, Derby, Düsseldorf, Emek, Grampian, Haifa, Heidelberg, Infantis, Kedougou, Kentucky, Kiambu, Kiel, Kingston, Kottbus, Larose, Meleagridis, Newport, Paratyphi B, Rissen, Schleissheim, Tallahassee et Texas (R. M. Hall 2010; Kim et al. 2011; Anjum et al. 2011; Bolton, Ivory, and McDowell 2013; Osman, Hassan, and Mohamed 2014; Lei et al. 2015; Sinwat, Angkittitrakul, and Chuanchuen 2015). SGI1 et ses variants sont insérés entre les gènes chromosomiques *trmE* et le gène *yidY*. Enfin, certains variants de SGI1 ont été décrits chez deux autres espèces bactériennes : *P. mirabilis* et *M. morgani* chez lesquelles ils sont localisés entre les gènes chromosomiques *trmE* et les gènes du module *hipB/hipA* suivi du gène codant pour la protéine membranaire PMI3124 chez *P. mirabilis* ou du gène codant pour une perméase (MMORPR5_0047) (Figure 22) (Ahmed, Hussein, and Shimamoto 2007; Schultz et al. 2017a).

Certains variants isolés chez des souches de *P. mirabilis* chinoises comme SGI1-U et SGI1-Y sont localisés entre le gène *trmE* et le gène de la protéine membranaire PMI3124 de *P. mirabilis* du fait de la délétion du module *hipB/hipA* (Qin et al. 2015 ; Lei et al. 2014).

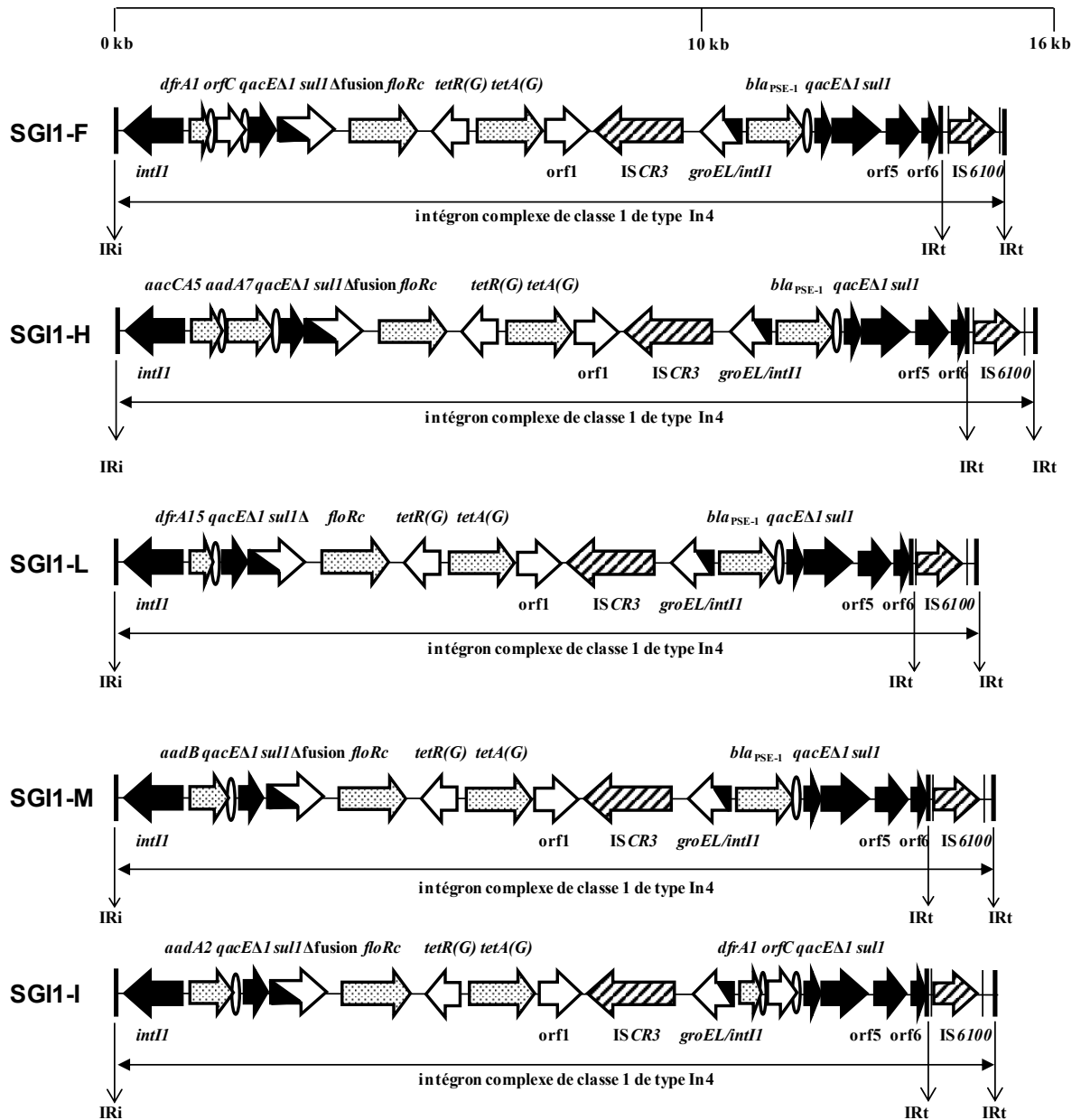


Figure 23 : Variants de la région MDR de SGI1 résultant d'un simple échange de cassettes

*Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes et des ORFs. Les flèches noires représentent les régions conservées 5'-CS et 3'-CS des intégrons. Les séquences inversées et répétées (IR) des intégrons et des transposons sont indiquées par les barres fines verticales. Les gènes de résistance sont illustrés par les flèches avec des points et les formes ovales représentent les sites *attC*. Les séquences d'insertion sont figurées par les flèches hachurées en biais. Les flèches hachurées verticalement représentent les ORFs du squelette.

i. Variations de la région MDR

Ces variants résultent de simples échanges de cassettes, de recombinaisons homologues ou d'acquisition de séquences d'insertion qui ont entraîné des délétions, des inversions ou des insertions dans l'intégron complexe de classe 1 de SGI1 (Annexe 3).

- *Echanges de cassettes*

L'acquisition de nouvelles cassettes confèrent de nouvelles résistances à la souche porteuse d'un îlot. Au niveau du 1^{er} site *attI*, le gène *aadA2* peut-être remplacé par *dfrA1-orfC* (ex : SGI1-F), par *aacCA5-aadA7* (ex : SGI1-H), par *dfrA15* (SGI1-L) ou par *aadB* (SGI1-M) (Annexe 1) (Doublet et al. 2003 ; Cloeckart et al. 2006 ; Ahmed, Hussein, and Shimamoto 2007; Vo et al. 2007 ; Levings, Djordjevic, and Hall 2008; Doublet et al. 2009b). L'ensemble de cassettes *dfrA1-orfC* a déjà été décrit sur des intégrons de classe 1 présents chez *Vibrio cholerae* isolé en Thaïlande (Doublet et al. 2003). L'ensemble de cassettes *aacA5-aadA7* a déjà été décrit chez *V. fluvialis* en Inde. (Doublet et al. 2004c).

Chez le variant SGI1-I, la cassette *bla_{PSE-1}* a été remplacée par les cassettes *dfrA1-orfC* au niveau du deuxième site *attI* (Levings et al. 2005) (Figure 23).

- *Recombinaisons homologues*

Certains variants résultent d'une recombinaison homologue entre les régions 5'CS conduisant à une délétion du premier ensemble de cassettes et de la partie centrale contenant l'ISCR3. C'est le cas des variants SGI1-B et SGI1-G dérivés respectivement de SGI1 et SGI1-A ou des variants SGI1-O et SGI1-Y dérivés respectivement de SGI1-F et de SGI1-H (D. Boyd et al. 2002; Doublet et al. 2004b; Lei et al. 2014; D.A. Boyd et al. 2008).

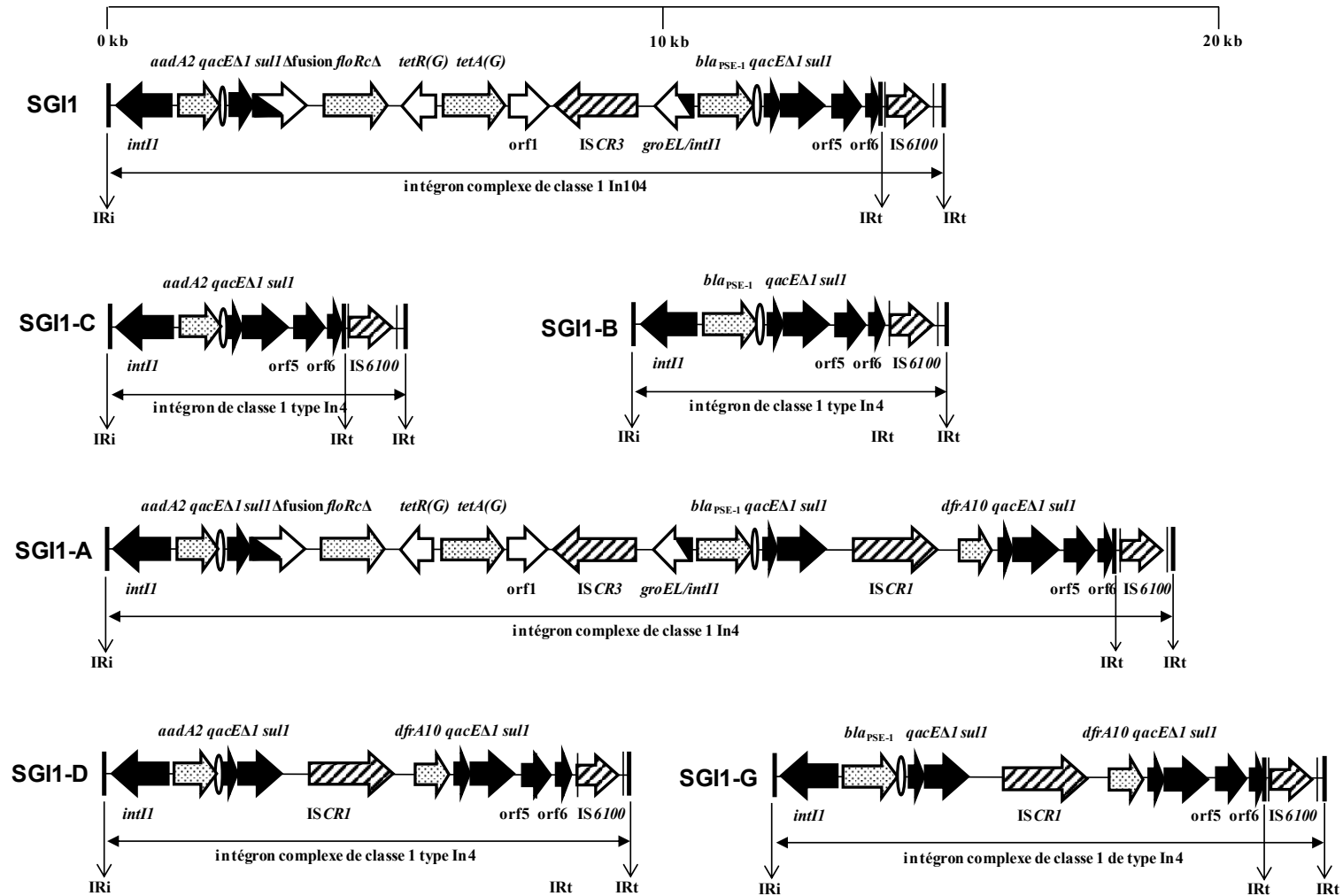


Figure 24 : Variants de la région MDR de SGI1 résultant de recombinaisons homologues*

Chez d'autres variants une recombinaison homologue entre les régions 3'CS a entraîné la délétion de la partie centrale contenant l'ISCR3 et du deuxième ensemble de cassettes. C'est le cas de SGI1-C dérivé de SGI1 et de SGI-D dérivé de SGI1-A (Figure 24) (D.A. Boyd et al. 2002).

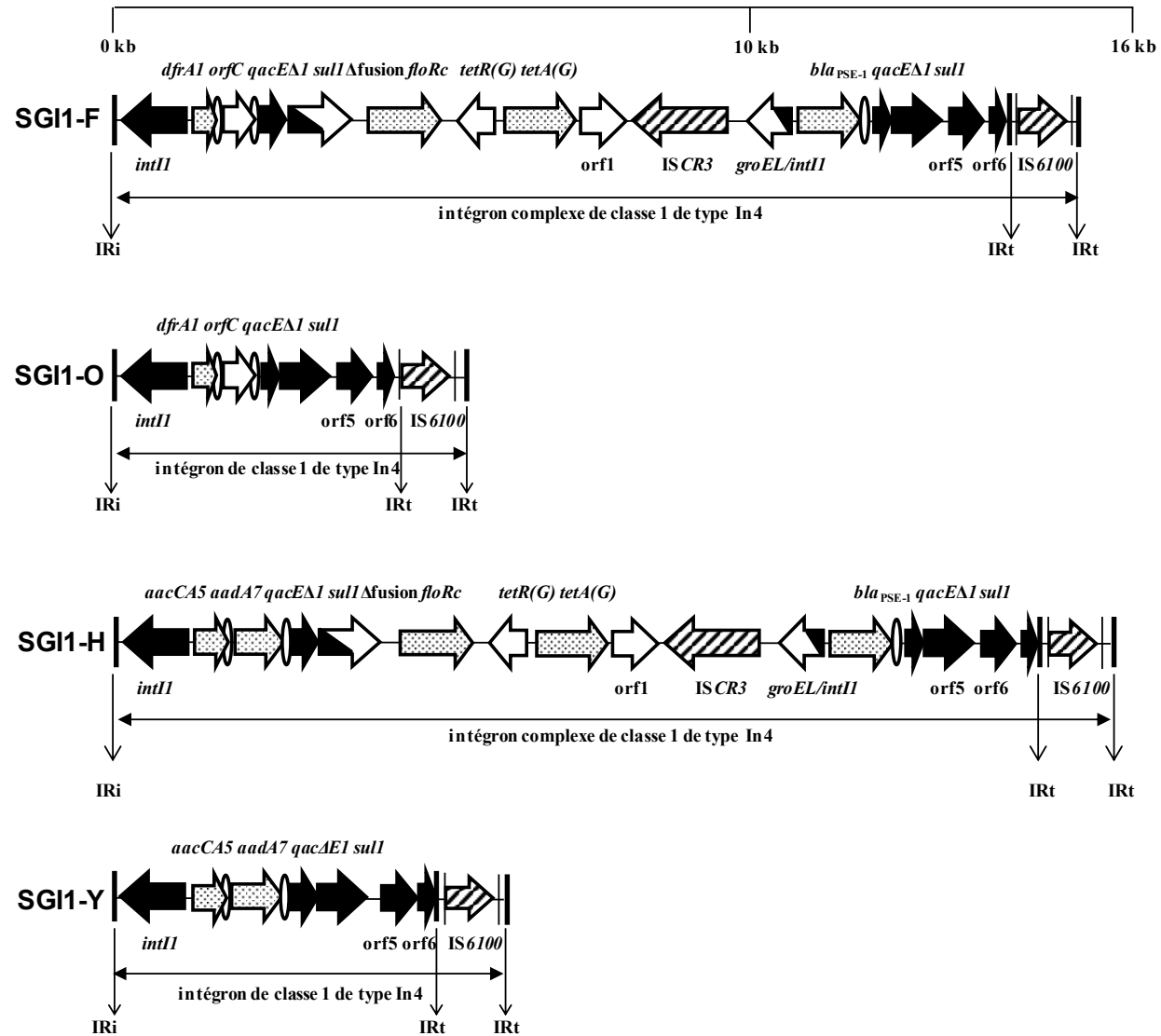


Figure 24 (suite) : Variants de la région MDR de SGI1 résultant de recombinaisons homologues*

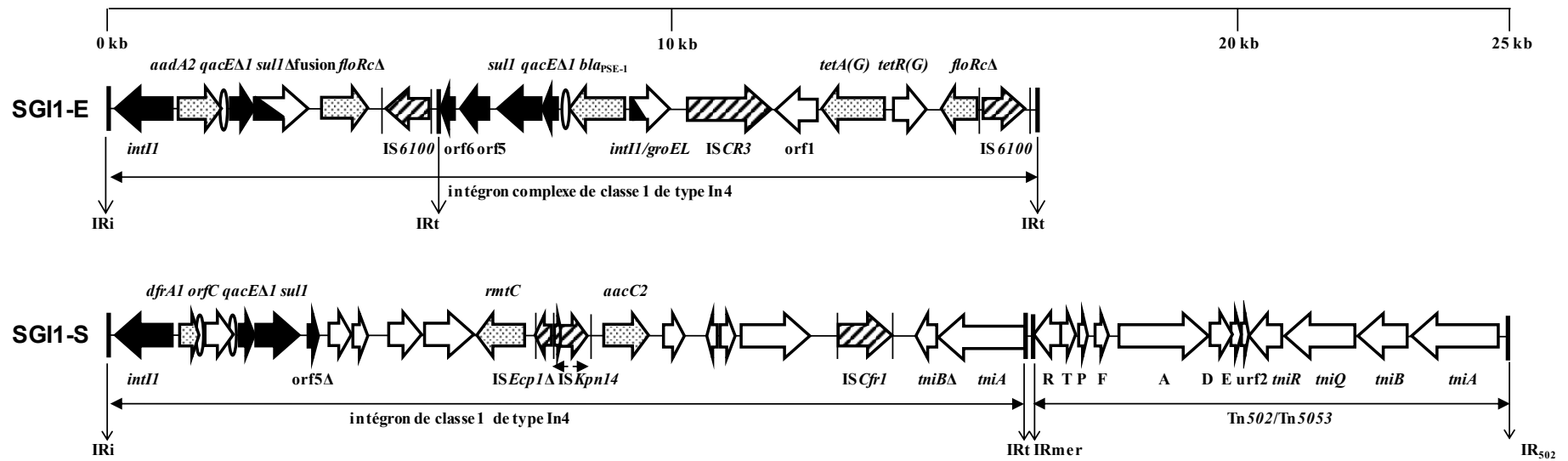


Figure 25 : Variants de la région MDR de SGI1 résultant d'insertion d'IS et/ou de transposons*

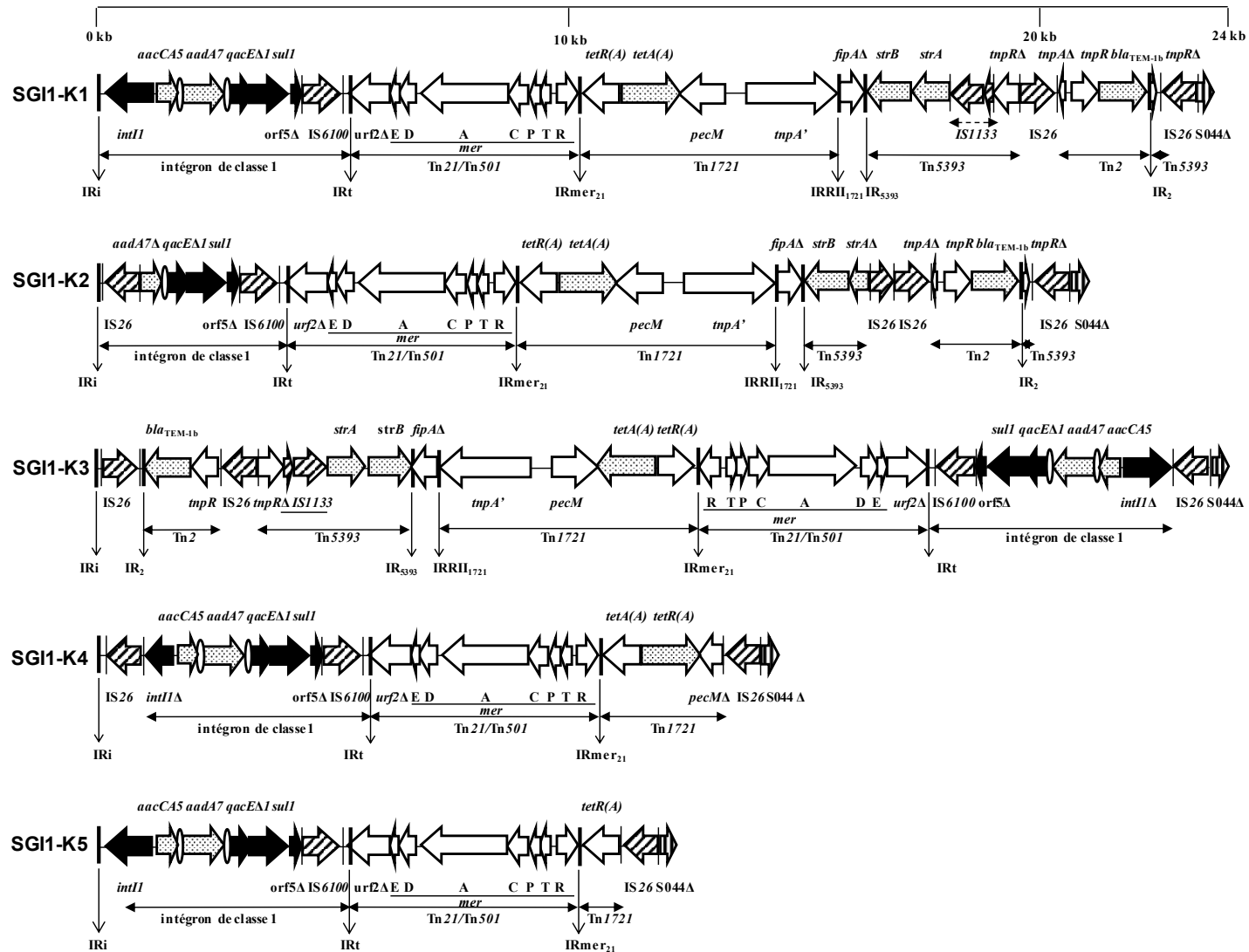


Figure 25 (suite) : Variants de la région MDR de SGI1 résultant d'insertion d'IS et/ou de transposons*

- *Insertion d'IS et/ou de transposons*

L'insertion de *ISCR1* associée au gène *dfrA10* a été rapportée chez SGI1-A, -D et -G. Cette insertion est peu stable chez SGI1-A : « retour » à la structure SGI1 (Figure 24). (D. A. Boyd et al. 2002 ; Doublet et al. 2004b).

Le variant SGI1-E dérivé de SGI1 se serait formé à la suite d'une insertion de *IS6100* dans le gène *floR* puis d'une inversion par recombinaison intramoléculaire entre les deux *IS6100* (Figure 25) (D. A. Boyd et al. 2002). De nombreux variants possèdent une à plusieurs copies de *IS26* insérées dans la région MDR : SGI1-K1 à -K6, -P1 et -P2, -Q1 à -Q3 (Figure 25). La présence de plusieurs copies d'*IS26* dans la région MDR peut-être responsable d'inversion par transposition répliquative intramoléculaire en *trans* (genèse SGI1-K3 à partir de SGI1-K1) (Doublet et al. 2008a). Elles peuvent également provoquer des délétions partielles de l'intégron (SGI1-P1 et P2 et SGI1-Q1 et Q2) voire sa délétion complète (SGI1-Q3) (Levings et al. 2007 ; Doublet et al. 2008a; Doublet et al. 2009a). Enfin le variant SGI1-S a une structure à part puisque l'intégron de classe 1 a subi beaucoup de remaniements du fait de l'insertion de trois IS : *ISEcp1Δ*, *ISKpn14* et *ISCfr1* (Figure 25). Cette région MDR est le support de nouveaux gènes de résistance non retrouvés à ce jour : *rmtC*, *aacC2* ; et de transposons partiels comme une partie du module Tni de Tn402 et Tn512 avec son module *mer* (Annexe 1) (Wilson and Hall 2010). Dans les structures SGI1-K (1 à 6), un module *mer* hybride de Tn501 et Tn21 remplace la partie centrale de l'intégron complexe de classe 1. En plus de ce module *mer*, en fonction des variants, des transposons complets ou partiels sont présents comme Tn5393 avec *strA* et *strB*, Tn3 avec *bla_{TEM-1}* et Tn1721 avec *tetA(A)* (Annexe 1).

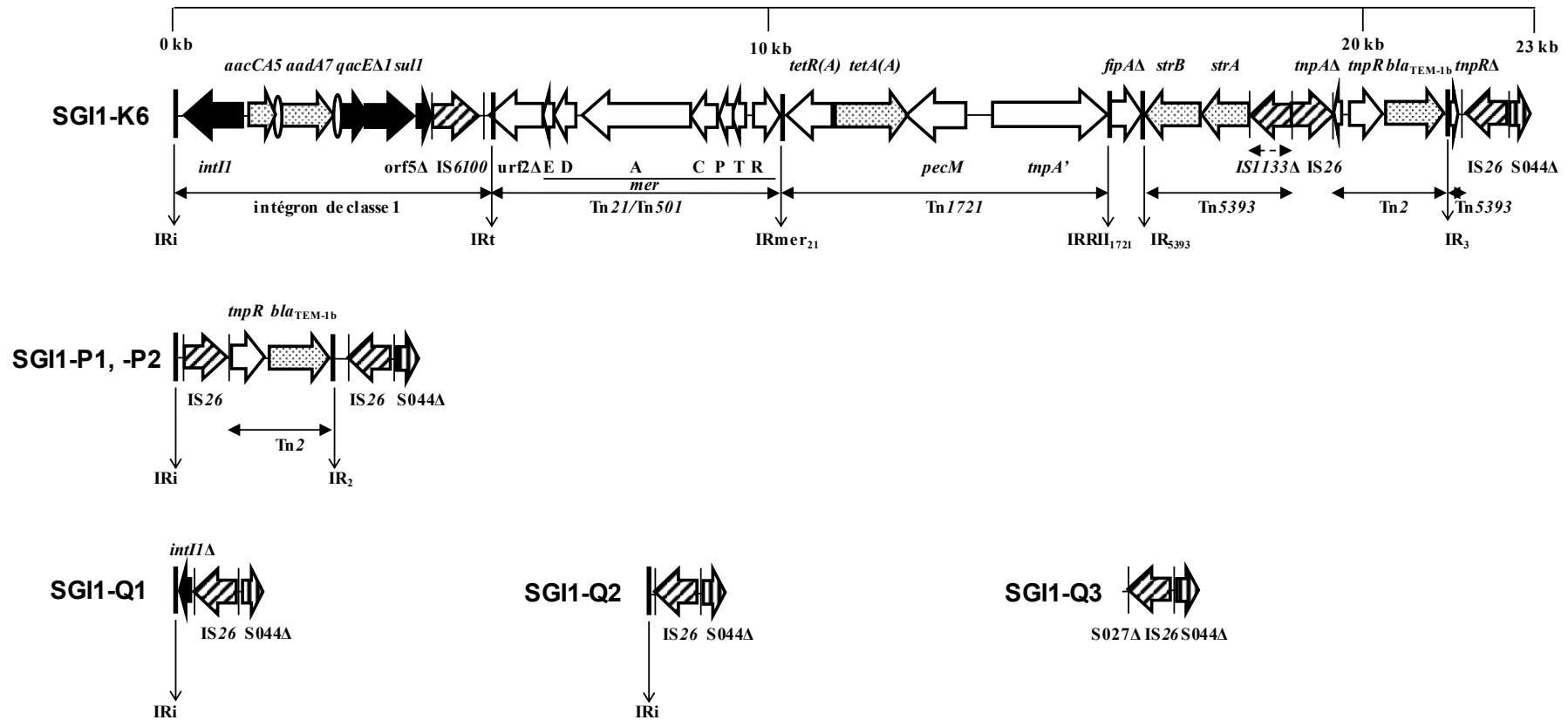


Figure 25 (suite) : Variants de la région MDR de SGI1 résultant d'insertion d'IS et/ou de transposons*

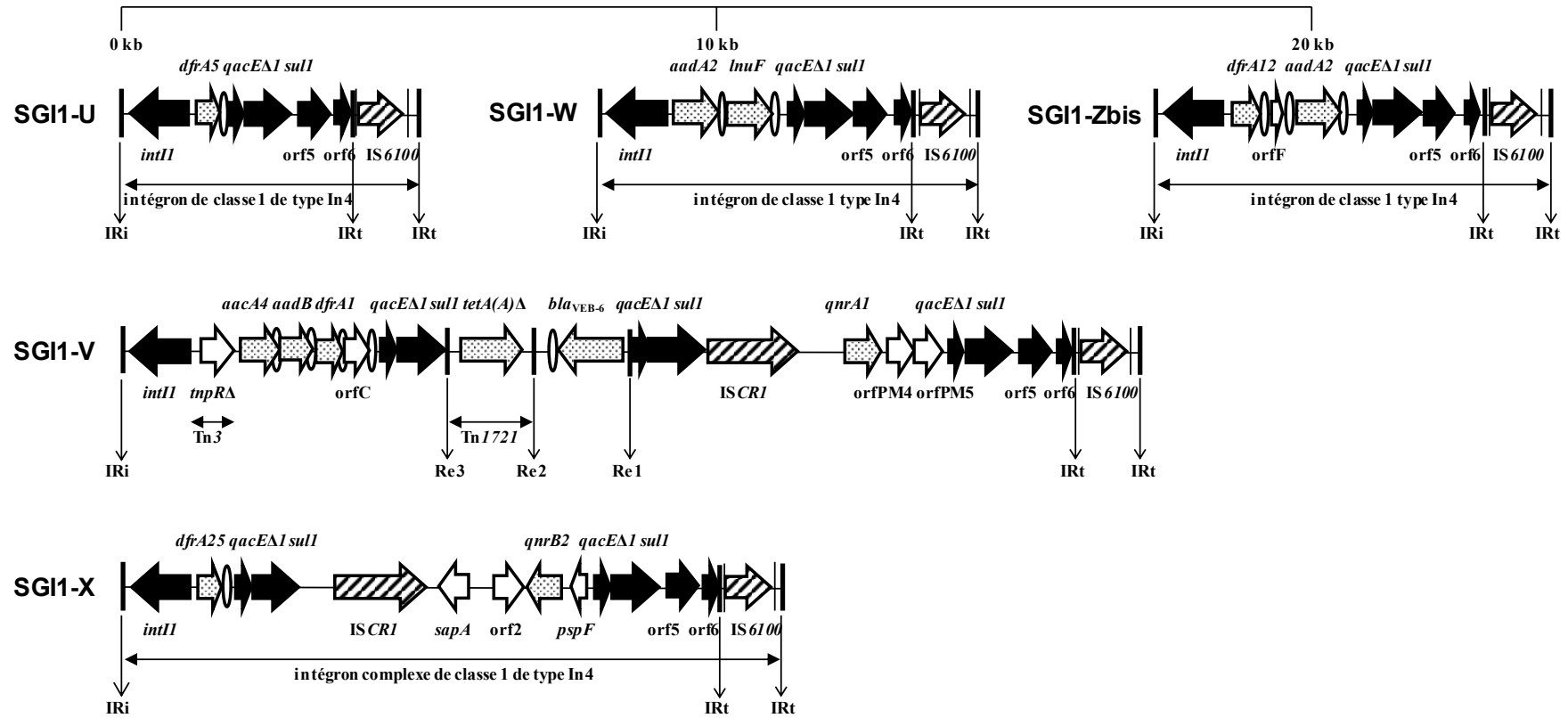


Figure 26 : Variants de la région MDR de SGI1 avec un intégron de type In4 et variants ayant subi des remaniements multiples*

Une partie du gène *fipA* qui code pour une protéine inhibitrice de fertilité du plasmide IncP se trouve entre les transposons Tn1721 et Tn5393. Il est à noter que ces transposons Tn21, Tn1721, Tn5393 et Tn3 ont été retrouvés sur des plasmides de multirésistance (Levings et al. 2007 ; Doublet et al. 2008a; Doublet et al. 2009). La région MDR de SGI1-K1 a été décrite aussi sur l'îlot de résistance AbaR1 de *Acinetobacter baumannii* (Hamidian, Holt, and Hall 2015b).

- *Variants avec un intégron de type In4*

Comme les variants SGI1-B, SGI1-C et SGI1-O, les variants SGI1-U (*dfrA5*), SGI1-W (*aadA2-lnuF*) et SGI1-Zbis (*dfrA12-orfF-aadA2*) possèdent seulement un intégron de classe 1 de type In4 non complexe (Figure 26) (Bi et al. 2011 ; Lei et al. 2014 ; Qin et al. 2015). L'intégron de SGI1-Zbis a été également retrouvé sur le plasmide pBDE0502 d'une souche d'*E. coli* (Qin et al. 2015).

- *Remaniements multiples*

SGI1-X possède un intégron complexe de classe 1 avec un gène cassette *dfrA25*. En aval de l'*ISCR1* se situe le gène *qnrB2*. La majeure partie de la région qui porte *qnrB2* a été retrouvée sur un plasmide chez *S. enterica* (Lei et al. 2015).

La région MDR de SGI1-V possède un intégron complexe comportant une *ISCR1*. Cette structure possède une région 5'CS et 3 trois régions 3'CS. L'intégron porte l'ensemble *aacA4-aadB-dfrA1-orfC*. Le gène *tetA(A)* du transposon Tn1721 et la cassette *bla_{VEB-6}* sont situés entre la 1^{ère} région 3'CS et la 2^{ème} région 3'CS encadrés par 3 éléments répétés de 135 pb (Re1, Re2 et Re3). Le gène *qnrA1* est en aval de l'*ISCR1* (Figure 26). Cette structure a déjà été décrite sur le chromosome d'une souche de *P. mirabilis* JIE273 (Zong, Partridge, and Iredell 2009 ; Siebor and Neuwirth 2011).

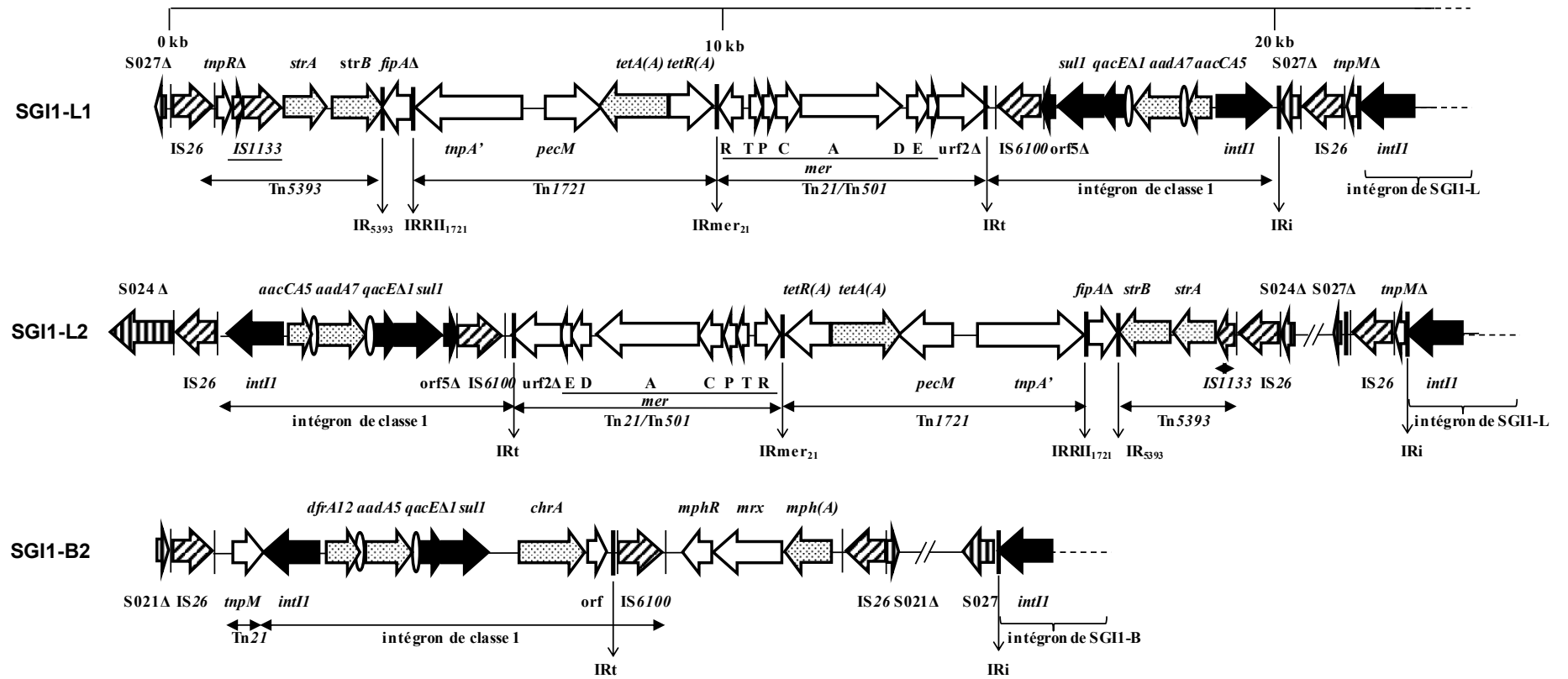


Figure 27 : Variants de la région MDR de SGI1 avec deux régions MDR*

- *Variants avec deux régions MDR*

Plusieurs variants possèdent une seconde région MDR constituée d'un transposon composite d'IS26 (Figure 27). Pour chacun de ces variants, ces régions MDR se sont insérées par transposition puisque des régions dupliquées et répétées sont présentes. Ainsi, SGI1-L2 possède une seconde région MDR (dérivée de la région MDR SGI1-K1) qui est insérée dans S024. Chez SGI1-L1, cette seconde région MDR est insérée dans la résolvasse (S027) et a subi une inversion (Doublet et al. 2009a). Chez SGI1-B2 la seconde région MDR s'est insérée au niveau de S021. Son intégron possède un ensemble de gènes cassettes (*dfrA12 – aadA5*) mais aussi le gène *chrA* conférant la résistance au chrome ainsi que le complexe d'inactivation des macrolides *mphR-mrx-mphA*. Ce transposon composite a déjà été retrouvé sur un plasmide (pEK499) chez *E. coli* (Lei et al. 2015).

En conclusion, la région MDR des îlots de résistance peut contenir une grande diversité de gènes de résistance dont certains ont été préalablement décrits sur d'autres structures notamment sur des plasmides. En revanche, quelques variants ne possèdent aucun gène de résistance. Tout ceci démontre une très grande plasticité de cette région.

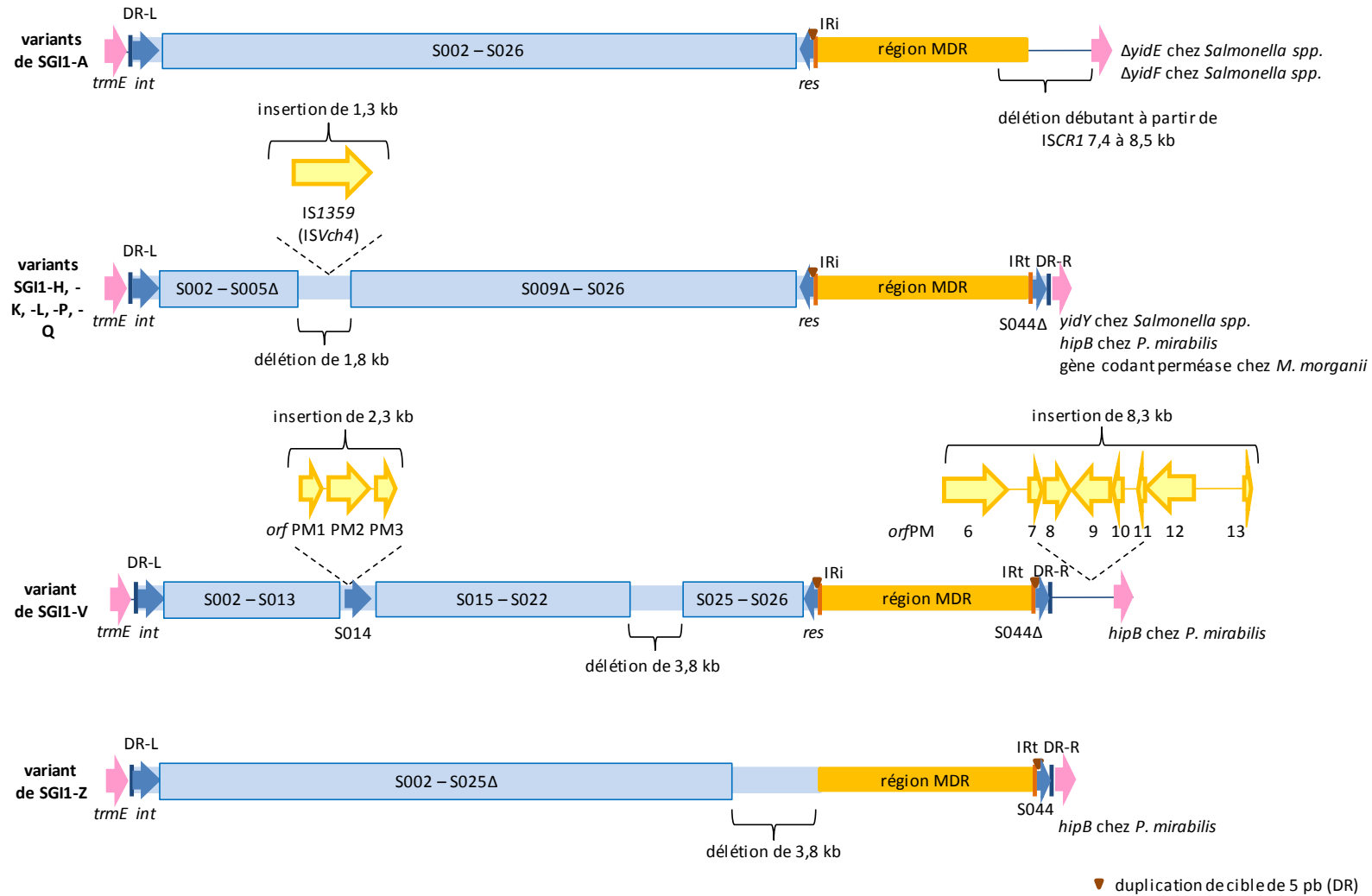


Figure 28 : Variations du squelette dans les variants de *Salmonella* genomic island 1

ii. *Variations du squelette*

La structure du squelette est assez conservée au sein des différents variants. Cependant, certaines modifications ont été rapportées (Figure 28).

Ainsi dans les variants SGI1-H, -K, -L, -P et Q, la région entre S005 et S009 est déléetée (2,8 kb) et remplacée par l'IS1359 (ou IS*Vch4*). De surcroit, chez SGI1-K, -P et -Q, l'ORF S044 est partiellement déléetée de quelques paires de bases du fait de l'insertion d'une IS26 (Levings et al. 2007 ; Doublet et al. 2008a ; Doublet et al 2009a).

Chez le variant SGI1-Z la déléetion de S025 (partielle), S026 et S027 est accompagnée de la déléetion de la majeure partie de l'intégron (Lei et al. 2015).

Certains variants SGI1-A, la déléetion d'une partie de la région MDR en aval de l'ISCR1 s'est accompagnée de la déléetion de certains gènes chromosomiques de *Salmonella* (*yidY*, *yidZ* plus ou moins *yieE* et *yieF*) (Doublet et al. 2004a)

Enfin, SGI1-V a un squelette assez différent de celui de SGI1. Trois ORFs (*orfPM1*, *orfPM2*, *orfPM3*) se sont insérées par transposition dans S014. Le GC% de ces ORFs (47,8%) est proche de celui de *Vibrio cholerae* (47-49%). Par ailleurs, les ORFs S021, S022 et S025 ne présentent respectivement que 93%, 86% et 87% d'identité avec leurs homologues chez SGI1. Ces ORFs présentent 99% d'identité avec des ORFs retrouvées chez *Shewanella*. Les ORFs S023 et S024 sont déléetées (Siebor and Neuwirth 2011). Cet îlot serait plutôt un dérivé de SGI1.

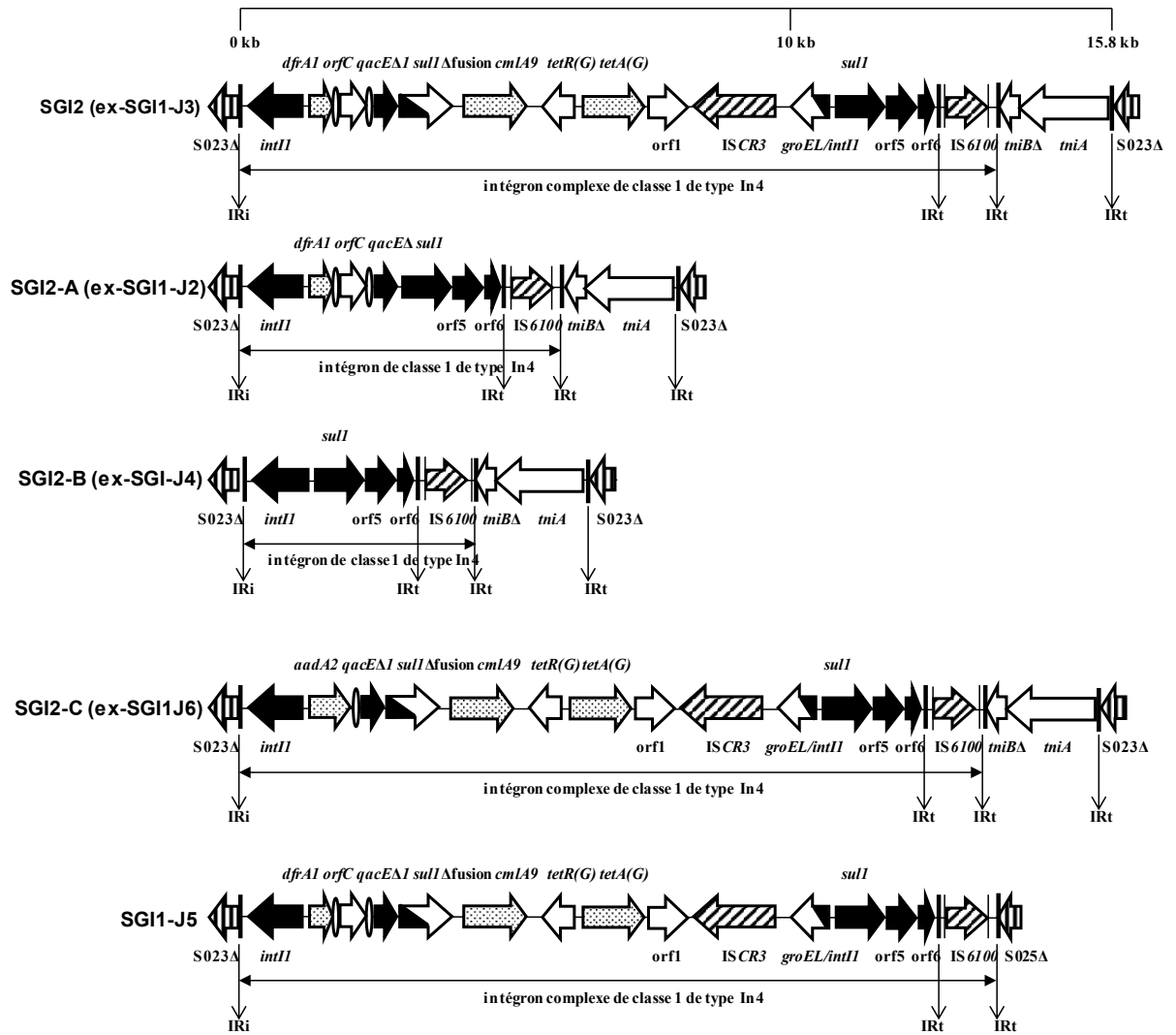


Figure 29 : Régions MDR de *Salmonella* genomic island 2 et de ses variants*

c. Îlots de résistance chez *S. enterica* et *P. mirabilis*

Ces îlots de résistance ont un squelette plus ou moins proche de celui de SGI1. Parmi ces îlots, certains auraient une origine commune avec SGI1 (Annexe 2).

i. *Salmonella genomic island 2 (SGI2)* :

Le SGI2, anciennement appelé SGI1-J, est un dérivé de SGI1 qui présente 0,53% (soit 144 nt) de différences au niveau du squelette (Levings, Djordjevic, and Hall 2008). SGI2 a été identifié chez les sérotypes Emek, Kentucky et Virchow. La région MDR est insérée à l'intérieur de S023. Sa structure est proche de celle du SGI1. Il possède cependant quelques différences : un ensemble de cassette *dfrA1-orfC*, un gène de résistance *cmlA9* (ou *floR2*) et la partie terminale du transposon Tn5058 (Annexe 1). Comme pour SGI1, il existe plusieurs variants (SGI2-A à -C) qui résultent de réarrangements au niveau de la région MDR (Figure 29) (Levings, Djordjevic, and Hall 2008; Doublet, Chu, et al. 2009 ; Chu et al. 2012 ; Le Hello et al. 2012).

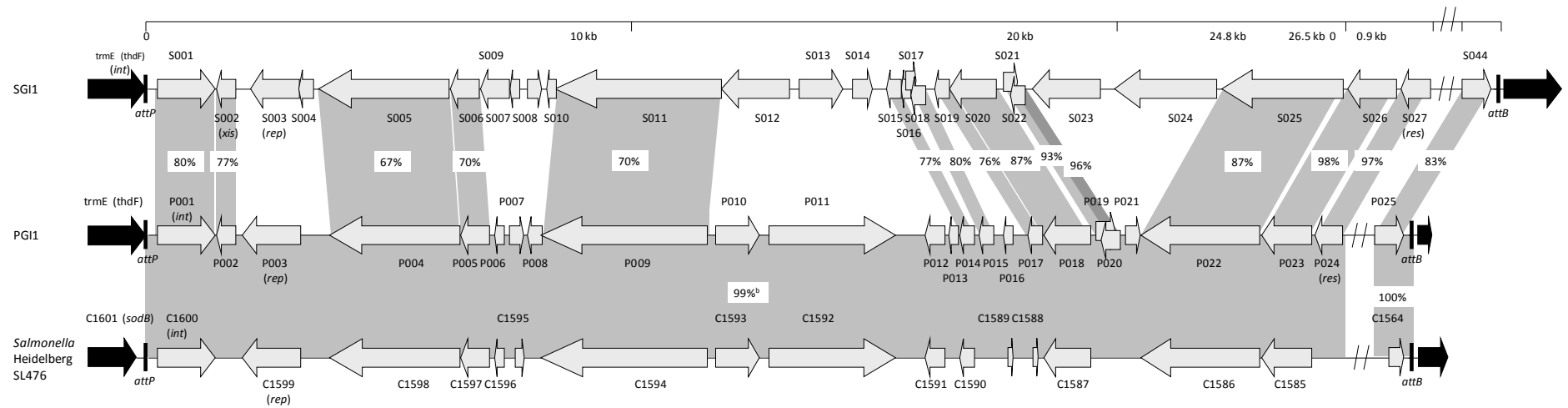


Figure 30 : Comparaison des squelettes SGI1, PGI1 et celui retrouvé chez *Salmonella* Heidelberg (D'après Siebor and Neuwirth 2014)

ii. *Proteus genomic island 1 (PGI1)* :

PGI1 a été décrit pour la première fois chez *P. mirabilis* dans deux souches appelées *PmCHA* et *PmCHE* (Siebor and Neuwirth 2014). Il est inséré au niveau du même site spécifique que SGI1, c'est-à-dire à l'extrémité 3' du gène *trmE*. Le squelette est constitué de 25 ORFs, appelées P001 à P025. En fonction des ORFs, le pourcentage d'identité en nucléotides avec le squelette de SGI1 varie entre 67% et 98%. Comme pour SGI1-V, les 2 ORFs S023 et S024 sont absentes. Il est important de noter que les intégrases diffèrent de 20% en nucléotides. PGI1 est un îlot différent de SGI1. Cependant, par la présence de certaines ORFs communes avec celles de SGI1, nous pouvons émettre l'hypothèse que celui-ci ait un ancêtre commun avec SGI1 (Figure 30).

La région MDR située entre P024 et P025 est constituée en 5' d'un intégron de classe 1 de type In5 au lieu de In4 chez SGI1 et SGI2 (Figure 31). Elle est scindée en 2 parties par la protéine PM12955 et environ 200 kb de chromosome. Cette protéine a probablement subi une insertion d'une IS26 par transposition intramoléculaire répllicative (présence de duplication de cible, 8 pb et d'une deuxième IS26) en *trans*. Ainsi, cette transposition aurait provoqué une inversion de cette région conduisant à la coupure de la région MDR et de PM12955 (He et al. 2015). Dans la première partie, cet intégron qui porte l'ensemble de cassettes *aadB-aadA2* est suivi d'un transposon Tn2 (*bla*_{TEM-135}), d'une partie d'un transposon Tn21 qui est interrompu par une IS4321/ISIR et d'un transposon Tn6020-like. Il est important de noter que la région MDR de PGI1 de *PmCHE* ne contenait pas ce Tn6020-like qui résulterait de l'incorporation d'une TU. La seconde partie de la région MDR est constituée d'un transposon hybride Tn502/Tn5053, d'une région dérivée de Tn501, d'un transposon hybride Tn1696/Tn1721 avec un intégron de classe 1 (*aadA1*) et d'une partie de Tn5393 interrompu par une IS26. Cette IS26 est liée à l'extrémité 3' de la protéine PM12955 (Siebor and Neuwirth 2014).

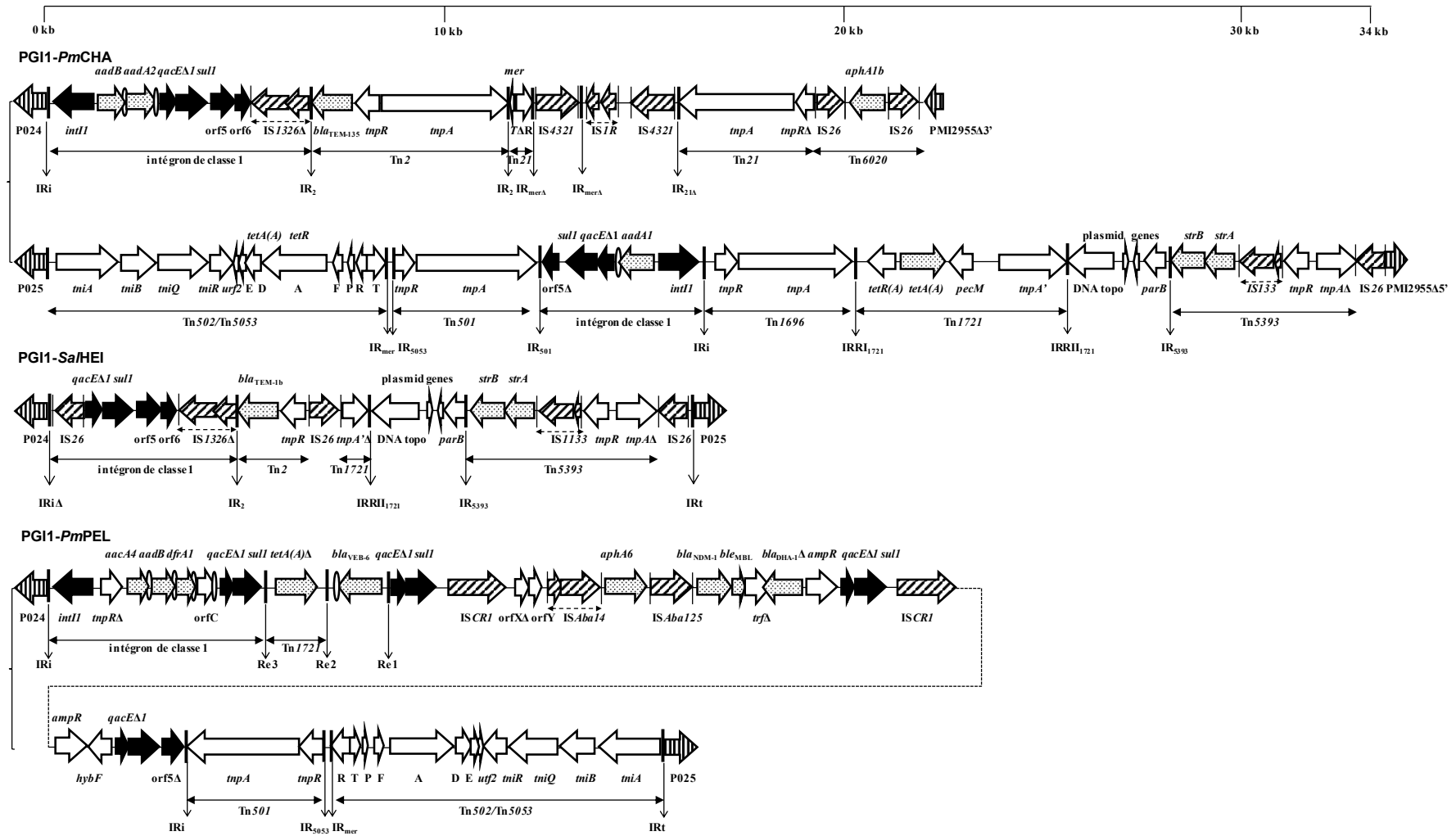


Figure 31 : Régions MDR de PGI1*

Une structure proche de PGI1 a été aussi retrouvée chez *S. Heidelberg* dans un génome complet sans être identifiée. Cette structure est localisée en 3' du gène *sodB* déjà décrit comme 2^{ème} site potentiel d'intégration de SGI1 (Doublet et al. 2008b). Les deux structures ont un squelette identique (à l'exception de 4 nt) et leurs régions MDR sont localisées au même site. L'îlot de *S. Heidelberg* est un variant de PGI1 qui a subi des délétions. En effet, il ne conserve plus qu'une partie de l'intégron de classe 1 de type In5, une partie des transposons Tn2 et Tn1721 et le transposon Tn5393 (Figure 31) (Siebor and Neuwirth 2014).

Un autre variant a été récemment décrit PGI1-*PmPEL*. Il est constitué d'un intégron complexe avec 2 ISCR1. La première partie de l'intégron complexe est identique à celle de SGI1-V (*bla*_{VEB-6}). Elle est suivie par une IS*Aba14*, un gène *aphA6*, un gène codant une carbapénémase NDM-1 associé au gène *ble*_{MBL} et à la séquence d'insertion IS*Aba125*. Ce dernier ensemble présente 99% d'identité avec celui retrouvé sur un plasmide porté par *A. baumannii*. Ensuite, un gène *bla*_{DHA-1} partiel est présent. En aval de la deuxième ISCR1, se situe une transposase de la famille des Tn3 (88% d'identité avec IS*Pa40*), puis un module *mer* du transposon Tn501 et le module Tni de Tn5053 (Figure 31) (Girlich et al. 2015).

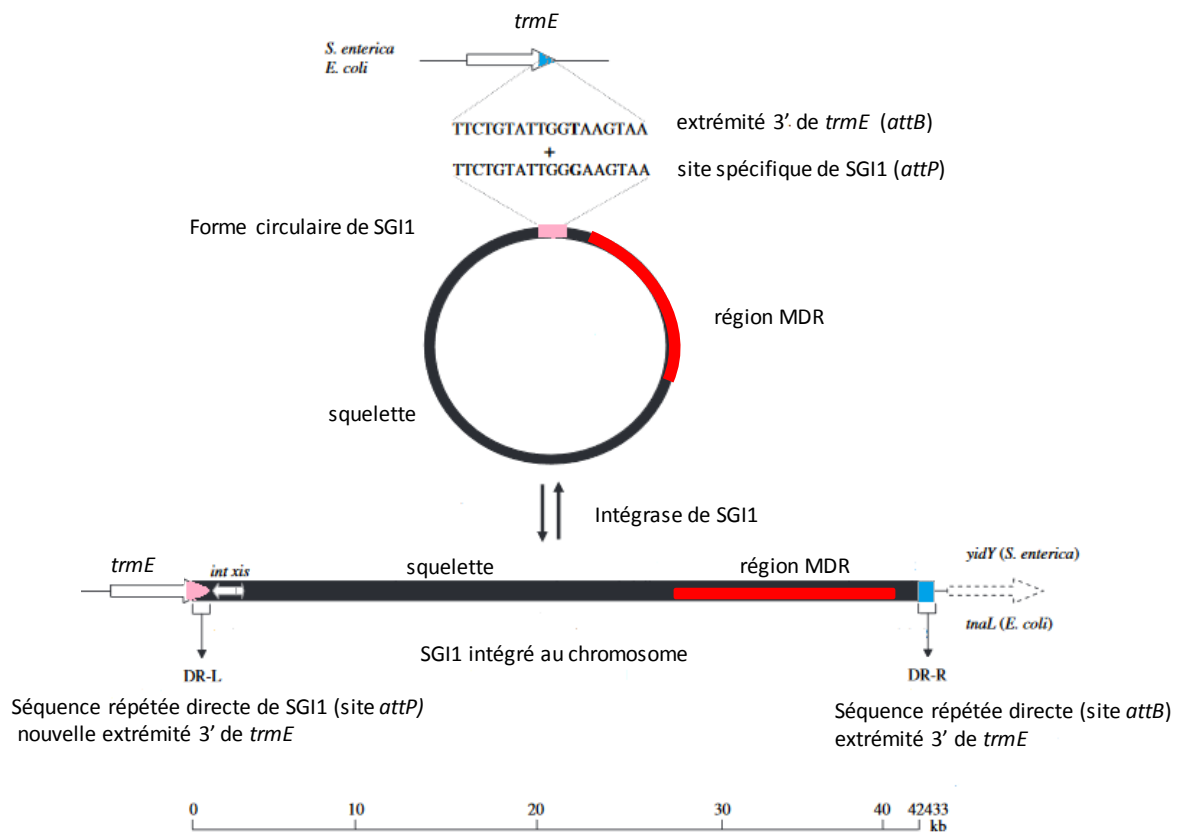


Figure 32 : Schéma de l'intégration et de l'excision de SGI1 par recombinaison entre le site d'attachement chromosomique (*attB*) et le site de SGI1 (*attP*) (D'après Doublet et al. 2005).

2. *Salmonella* genomic island : un élément mobilisable et intégratif

En 2005, Doublet *et al.* ont montré que SGII est un élément mobilisable et intégratif en transférant par conjugaison SGII d'une souche de *S. enterica* donatrice à une souche de *S. enterica* réceptrice (sérotypage différent) ou à une souche de *E. coli* réceptrice en présence du plasmide IncA/C pR55 (Doublet *et al.* 2005). A noter que les plasmides IncA et IncC, ont été groupés dans le même groupe d'incompatibilité sur la base de leur entrée exclusive, c'est-à-dire qu'ils ont un système de répllication et de partition homologues. Depuis 2015, ils sont à nouveau distincts du fait de leur différence au niveau du gène *repA* (Harmer and Hall 2015). Ainsi, par la suite, lorsque les études distingueront les plasmides IncA ou IncC nous préciserons le type de plasmide sinon nous parlerons de plasmide IncA/C.

SGII peut s'exciser du chromosome et générer une forme circulaire, formant ainsi le site spécifique de recombinaison de SGII, *attP*. Au moment de l'intégration de SGII dans le chromosome, ce site *attP* se recombine avec le site d'attachement *attB* situé au niveau des 18 dernières paires de bases de l'extrémité 3' du gène *trmE* qui code pour une protéine modifiant les ARNt (Figure 32). L'intégration de SGII n'altère pas la fonction de TrmE malgré les quelques substitutions d'acides aminés. L'excision et l'intégration de SGII sont sous le contrôle de l'intégrase *int* (S001). L'excisionnase *xis* (S002) n'est pas indispensable pour l'excision mais la facilite (Doublet *et al.* 2005). Le gène *trmE* a été détecté au sein de différentes espèces bactériennes. Ces espèces bactériennes possèdent un site d'attachement *attB* (18 dernières paires de bases du gène *trmE* identiques à celles du gène *trmE* de *S. enterica* ou avec quelques nucléotides de différence (≤ 3 nt)). Ce site potentiel d'attachement a été détecté notamment chez *Shigella sp*, *Vibrio sp*, *Pseudomonas sp*, *Brucella sp*, *Legionella*

pneumophila ou *K. pneumoniae* (Doublet et al. 2007). Il a aussi été démontré chez *S. enterica* qu'en l'absence du gène *trmE*, SGI1 peut aussi s'intégrer au niveau d'un second site d'attachement situé au niveau du gène *sodB* codant pour une superoxyde dismutase en amont du gène *purR* codant pour le répresseur transcriptionnel de la synthèse des purines. L'îlot est capable de s'intégrer en une à plusieurs copies en s'organisant en tandem au niveau de ces deux sites d'attachement du chromosome (Doublet et al. 2008b).

L'îlot de résistance SGI1 est très stable dans la bactérie. En effet, plusieurs études ont montré sa persistance jusqu'à la 350^{ème} génération voire jusqu'à la 460^{ème} génération chez *S. enterica* cultivée sur des milieux non sélectifs de l'îlot. Soit cette stabilité est liée à une activité faible d'excision ($<10^{-6}$), soit l'excision est compensée par la réintégration de l'îlot dans le chromosome (Kiss, Nagy, and Olsasz 2012; Huguet et al. 2016). Par contre en présence d'un plasmide IncA /C, le taux d'excision de SGI1 est élevé et SGI1 est alors mobilisé en *trans* dans une autre cellule. Seuls les plasmides conjugatifs de type IncA/C sont capables de mobiliser en *trans* SGI1 en apportant les outils nécessaires à leur transfert (Doublet et al. 2005; Douard et al. 2010; Carraro et al. 2014; Kiss et al. 2015).

Les plasmides de type IncA/C possèdent le complexe AcaCD qui est un complexe hétérodimérique de type FlhCD, formé de deux sous-unités AcaC et AcaD. Le complexe AcaCD est un activateur transcriptionnel des gènes plasmidiques *tra* qui permettent le transfert des plasmides IncA/C lors de la conjugaison. Ces deux sous-unités AcaC et AcaD partagent respectivement 34% et 23% d'identité avec les sous-unités SetC et SetD des ICEs de la famille SXT/R391 (Carraro et al. 2014).

Plasmide IncA ou IncC

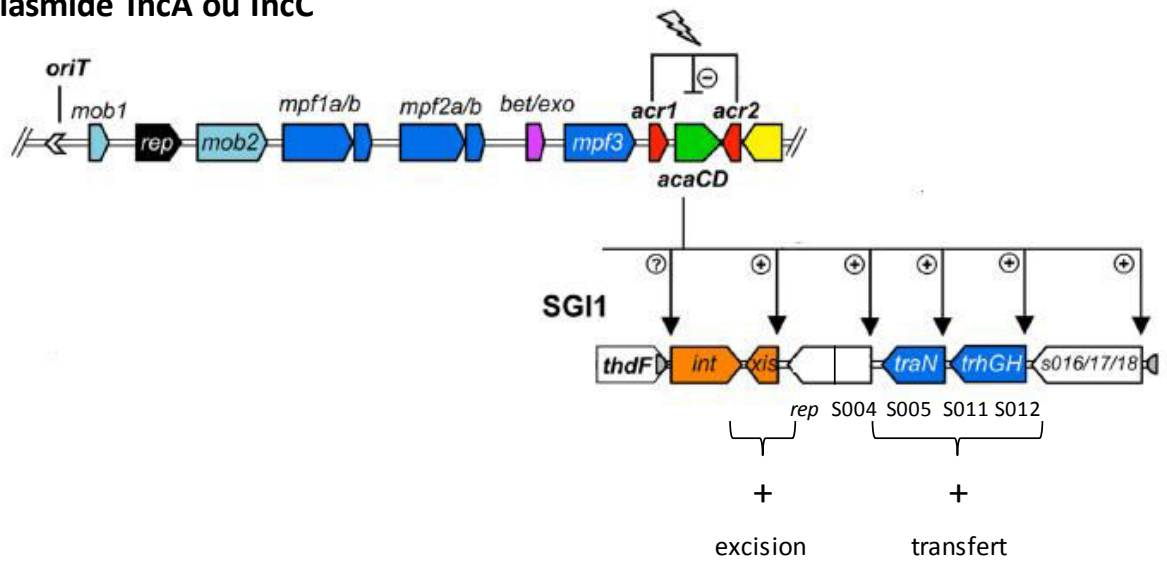


Figure 33 : Rôle du complexe AcaCD synthétisé par le plasmide IncA ou IncC dans le transfert de SGI1 (Adapté de Poulin-Laprade, Carraro, and Burrus 2015).

Ce complexe AcaCD active également l'excision de SGI1. Il se lie au promoteur de *xis* qui possède un motif de liaison AcaCD et active ainsi l'excision de SGI1 dès l'entrée du plasmide IncA/C. Ce promoteur est ainsi un détecteur de l'entrée des plasmides IncA/C (Kiss et al. 2015a). Par ailleurs, les gènes *sgaC* (S006) (79% d'identité en acides aminés avec AcaC) et *sgaD* (S007) (46% d'identité avec AcaD) de SGI1 codent pour un complexe hétérodimérique SgaCD (FlhCD_{SGI1}) homologue à AcaCD (Murányi et al. 2016). Ce complexe active aussi le promoteur de *xis* mais est moins exprimé et a une activité plus faible (Kiss et al. 2015 ; Murányi et al. 2016). Par des expériences de complémentation, il a été démontré que le complexe SgaCD (FlhCD_{SGI1}) est aussi capable d'assurer le transfert des plasmides IncA/C en cas de délétion des gènes codant pour le complexe AcaCD (Murányi et al. 2016). Les complexes AcaCD et SgaCD (FlhCD_{SGI1}) sont aussi capables d'activer les promoteurs de S004, S005 (*traN_s*), S012 (*traH_s*) et S018 qui possèdent aussi des motifs de liaison d'AcaCD (Figure 33) (Carraro et al. 2015; Murányi et al. 2016; Poulin-Laprade, Carraro, and Burrus 2015).

Les gènes situés entre S005 (*traN_s*) et S012 (*traH_s*) ne sont pas indispensables à la mobilisation de l'îlot de type SGI1. En effet, les variants SGI1-K (délétion entre S005 et S009) ainsi qu'un mutant obtenu *in vitro* possédant une délétion entre S005 à S012 peuvent-être transférés d'une bactérie à l'autre (Kiss, Nagy, and Olasz 2012 ; Harmer et al. 2016). L'ORF S005 correspondant au gène *traN_s* code pour une protéine qui a 88% de similarité avec la protéine TraN_c des plasmides IncA et IncC impliquée dans la stabilisation de la jonction entre les cellules. Les ORFs S011 (*traG_s*) et S012 (*traH_s*) codent pour des protéines qui possèdent respectivement 57% et 78% de similarité avec les protéines TraG_c et TraH_c. Ces protéines sont impliquées dans la formation du *pilus* du système de sécrétion de type IV nécessaire à la conjugaison. Ces gènes *tra* présents dans l'îlot ne sont pas indispensables pour

le transfert de SGI1 mais chacune de ces protéines joue un rôle important puisqu'en leur absence le taux de transfert de SGI1 est 4000 fois plus faible (Carraro et al. 2015). En revanche les protéines TraN_c, TraG_c et TraH_c sont indispensables pour le transfert du plasmide IncC. Ces protéines peuvent cependant être substituées par les protéines Tra_S de SGI1 qui sont capables de former un *pilus* du système de sécrétion de type IV fonctionnel. Ce *pilus* peut-être un hybride formé avec des protéines Tra de l'îlot et du plasmide IncC, à l'exception des protéines TraH_s et TraG_c qui sont incompatibles (Carraro et al. 2017).

La protéine TraG_c du plasmide IncC participe au système d'exclusion des plasmides de type IncC (limitation de l'entrée d'autres plasmides de type IncC dans la cellule). La protéine TraG_s permettrait à SGI1 d'échapper à ce système d'exclusion des plasmides IncC. En effet, il n'est pas observé de transfert de SGI1 dans une cellule réceptrice contenant un plasmide IncC lorsque celui-ci est délété de *traG_s* alors que ce transfert de SGI1 est rétabli en présence *traG_s* (Carraro et al. 2017).

Harmer *et al.* ont observé que SGI1 et SGI2 diminuent la fréquence de transfert des plasmides IncC (Harmer et al. 2016). Cette observation pourrait-être expliquée par le fait que les gènes *traG_s* et *traH_s* sont exprimés de façon constitutive à un taux faible et permettraient ainsi dès l'entrée du plasmide IncC la formation d'un *pilus* du système de sécrétion de type IV ce qui favoriserait le transfert de SGI1 au détriment de celui du plasmide IncC (Carraro et al. 2017).

Il existe une certaine incompatibilité entre les plasmides IncC et SGI1 ainsi qu'entre les plasmides IncA/C et SGI2. En effet, lorsqu'ils sont présents dans une même bactérie soit l'îlot est perdu (absence de la forme circulaire et de la forme intégrée), soit le plasmide est éliminé (Kiss et al. 2015; Harmer et al. 2016). En revanche, le variant SGI1-K qui présente une délétion entre le gènes S005 et S009 et des substitutions au niveau des protéines SgiT (S025)(N735K) et SgiA (S026)(K328N) ne déstabilise pas le plasmide IncC. Ceci suggère

que les gènes délétés ou les substitutions présentes dans le système SgiAT pourraient être impliqués dans l'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides de type IncA/C (Harmer et al. 2016).

Un autre travail a montré que le système SgiAT est un système toxine/antitoxine. Après transformation d'une souche de *E. coli* avec un plasmide porteur de *sgiT* et induction de ce gène, une activité toxique de SgiT est exercée sur *E. coli*. Cette toxicité est inhibée en présence de SgiA. Ces résultats confirment que le système toxine/antitoxine de SGI1 est bien fonctionnel. Pour autant, SGI1 reste stable en l'absence de ces gènes *sgiT* et *sgiA* (toujours présent à la 350^{ème} génération) dans une souche ne possédant pas de plasmide IncA/C. En revanche, ce système jouerait un rôle en présence d'un plasmide IncA/C. En effet, plusieurs expériences de conjugaison ont été menées. Tout d'abord, après insertion d'un plasmide IncA/C (pR55) dans *S. Agona* porteuse de SGI1, il est observé la présence de transconjugants avec SGI1 seul (40%), de transconjugants avec le plasmide IncA/C seul (23%) et de transconjugants avec les deux (32%). La même expérience a été réalisée avec un SGI1 délété de ces gènes *sgiT* et *sgiA*. Dans ce cas, le pourcentage de transconjugants avec SGI1 seul passe de 40% à 9% alors que le pourcentage de transconjugants avec le plasmide IncA/C seul passe de 23% à 49%. Sous pression antibiotique (sélectionnant le plasmide), 90% des transconjugants ont perdu l'îlot sans les gènes *sgiT* et *sgiA* alors qu'en présence de ces gènes, seulement 40% de ces transconjugants ont perdu l'îlot. Ainsi, le système toxine/antitoxine permet de maintenir SGI1 dans la bactérie et favorise la perte du plasmide IncA/C (Huguet et al. 2016).

En conclusion, SGI1 est un élément génétique stable. Il est mobilisable, capable de détourner l'appareil conjugatif d'un plasmide IncA/C et de l'adapter pour assurer son propre transfert au détriment du plasmide ; ceci en dépit de l'incompatibilité qui existe entre SGI1 et les plasmides de type IncA/C. Ce système de mobilisation permet la diffusion de SGI1 tout en

assurant sa pérennité. Toutes les étapes du processus et leurs systèmes de régulation ne sont pas encore connus à ce jour.

3. Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 ou PGI1

Plusieurs études ont recherché les îlots de résistance de type SGI1 au sein de différentes collections de souches de *S. enterica*. Le plus souvent la recherche d'îlot a été réalisée sur des souches sélectionnées en fonction de la présence d'intégrons de classe 1, du phénotype de résistance ou du sérotype. Ces études sont parfois limitées à un seul pays. Ainsi, il est difficile d'avoir une estimation précise de la prévalence des îlots de résistance de type SGI1. Enfin, aucune étude n'a recherché les îlots de résistance de type PGI1.

a. Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi les souches de *S. enterica* possédant un intégron de classe 1

Deux études ont recherché SGI1 au sein de souches possédant un intégron de classe 1. La première réalisée aux Pays-Bas a porté sur 237 souches isolées en 2004 et représentant 25 sérotypes différents (dont 51 *S. Typhimurium*, 41 *S. Enteritidis*). Parmi ces souches, 114 étaient isolées chez des patients, 115 étaient isolées d'animaux (chats, cochons et poulets) et 8 provenaient de produits alimentaires d'origine animale. 36 souches possédaient un intégron de classe 1 portés par un SGI1 dans 16 cas. La majorité des souches porteuses de SGI1 appartenaient au sérotype *S. Typhimurium* (n = 14). SGI1 a été aussi détecté au sein des sérotypes Derby et Albany. Un peu plus de la moitié de ces souches porteuses d'îlot étaient humaines (9/114, soit 7,9%), 6/115 (5,2%) étaient animales et 1 souche (1/8, soit 12,5%) a été retrouvée sur de la viande (Vo et al. 2006). La seconde étude a porté sur 87 souches de *S.*

enterica (20 sérotypes) collectées en Ethiopie entre 2000 et 2008. Parmi les 29 souches retenues, 19 possédaient un SGI1, soit 21,8% (19/87). Les souches avec SGI1 appartenait pour la plupart au sérotype Kentucky (n= 14), mais également au sérotype *S. Typhimurium* (n =5) dont 3 DT104 (Eguale et al. 2014). Dans ces deux études, la prévalence des souches avec îlots peut être sous-estimée, la recherche n'ayant été effectuée que sur les souches possédant un intégron de classe 1. Or il existe des SGI1 sans MDR, ou des MDR sans intégron, ou des MDR avec des intégrons délétés de leur région 5'CS ou 3'CS (Doublet et al. 2008a ; Schultz et al. 2015). De plus, pour chacune de ces études, les souches ont été sélectionnées dans une collection. Cette sélection a pu apporter un biais.

b. Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi les souches de *S. enterica* ayant acquis au moins une résistance

Une collection internationale (Afrique du Sud, Allemagne, Argentine, Australie, Belgique, Canada, Danemark, Espagne, Etats-Unis, Italie, Ouganda, Philippines et Taïwan) de 1920 souches de *S. enterica* isolées entre 2001 et 2003 a été étudiée. Sur ces 1920 souches, 104 exprimaient un phénotype de penta-résistance (ACSSuT) dont 90 (soit 86,5%) possédaient un intégron de classe 1. Parmi ces 90 souches, 17 possédaient un îlot de résistance (soit 19%) : 13 *S. Typhimurium* ST19 et 4 *S. Albany*. Cette étude sous estime probablement la part des souches porteuses de SGI1 parmi toutes les salmonelles (17/1920, soit 0,9%) puisqu'elle ne rapporte que la prévalence des SGI1 parmi les souches penta-résistantes (ACSSuT) et possédant un intégron (Krauland et al. 2009). D'autres auteurs ont travaillé sur une collection de 76 souches de *Salmonella* (20 sérotypes) d'origine humaine (n= 39), animale (n= 36) et environnementale (n= 1) isolées en Australie entre 1999 et 2001. Parmi les souches présentant au moins une résistance, 9 (11,8%) étaient porteuses d'un SGI1 dont 8 souches humaines

(8/39, soit 20,5%). Dans ces souches avec SGI1, 7 sérotypes étaient représentés : Cerro, Derby, Dusseldorf, Emek, Infantis, Kiambu (n= 2), Paratyphi B dT+ (Java) (n= 2). Il est étonnant qu'aucun SGI1 n'ait été détecté dans le 14 *S. Typhimurium* de la collection (Levings et al. 2005).

c. Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi les souches de *S. Typhimurium*

Plusieurs études montrent qu'une forte proportion des *S. Typhimurium* est porteuse de SGI1. Ainsi, une étude française a montré que parmi 148 souches de *S. Typhimurium* isolées du bétail et résistantes à au moins deux antibiotiques, 143 étaient porteuses d'un SGI1. A noter que sur les 148 souches, 115 avaient le phénotype de penta-résistance (77,7%). Parmi ces 143 souches, 138 appartenaient au clone DT104, confirmant la diffusion de ce clone (Targant et al. 2010b). D'autres auteurs ont étudié 538 souches de *S. Typhimurium* d'origine animale (n=391 ; dont 61 porcs, 212 volailles, 67 bœufs), d'origine humaine (n=28), issues de la nourriture (n=90), de l'environnement (n= 23) ou d'origine inconnue (n=6), isolées en France entre 1999 et 2009. Ainsi, cette étude montrait de fortes prévalences de SGI1 parmi les souches de *S. Typhimurium* : 67% chez les porcs, 37% chez les volailles, 65% chez les bovins, 31% chez les autres animaux, 49% dans la nourriture, 61% dans l'environnement et 57% chez l'homme (Bugarel et al. 2011). Une autre étude menée en Slovaquie a montré que parmi 193 souches humaines cliniques de *S. Typhimurium*, 35,8% (69) avaient un îlot (Majtánová, Majtán, and Majtán 2010).

En ce qui concerne les souches de *S. Typhimurium* DT104, une étude sur l'épidémie en Ecosse entre 1990 et 2004, a estimé par une approche Bayésienne que seulement 4% et 1 %

de ces souches isolées respectivement chez l'homme et l'animal ne contenaient pas de SGI1 (Mather et al. 2011).

d. Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 parmi d'autres sérotypes de *S. enterica*

D'autres sérotypes comme *S. Kentucky* et *S. Paratyphi B dT+* (Java) possèdent souvent des îlots de résistance. Ainsi, en France entre 2000 et 2003, parmi 47 souches humaines de *S. Paratyphi B dT+* (Java) avec au moins 2 résistances, 39 souches (83%) étaient porteuses de SGI1 (Weill et al. 2005). Une autre étude internationale a observé que 28 (58,3%) souches de *S. Kentucky* portaient SGI1 sur 48 appartenant au clone ST198-X1 (Le Hello et al. 2011).

Il est surprenant de noter qu'aucun SGI1 n'ait été identifié chez *S. Enteritidis* alors que celle-ci est la première responsable d'infections à *S. enterica* chez l'homme.

e. Epidémiologie des îlots de résistance SGI1 et PGI1 parmi les souches de *P. mirabilis*

En ce qui concerne *P. mirabilis*, espèce dans laquelle les îlots de résistance ont été décrits bien plus récemment, quelques études de prévalence des souches avec SGI1 et/ou PGI1 ont été menées en France et en Chine. Elles sont limitées à une région ou à un pays mais présentent en général moins de biais de sélection que celles réalisées pour *S. enterica* (absence de pré-sélection sur la penta-résistance ou la présence d'un intégron de classe 1).

La première, en France, s'est concentrée sur 57 souches de *P. mirabilis* ayant au moins une résistance acquise à l'amoxicilline et/ou à la gentamicine et/ou au sulfaméthoxazole/triméthoprime et sur 9 souches productrices de BLSE isolées chez des

patients du CHU de Dijon entre 2011 et 2012. Parmi ces souches, 5/57 (9%) étaient porteuses d'un îlot ainsi que 2 souches productrices de BLSE (Siebor and Neuwirth 2013). La deuxième étude française réalisée entre 2010 et 2013 a montré que 5 souches humaines sur 52 (9,6%) et 7 souches animales sur 46 (15,2%) avaient un îlot. Parmi les souches animales, toutes étaient retrouvées chez le chien (7/32, soit 21,8%) (Schultz et al. 2015). Enfin, récemment, les îlots chez les *Proteae* ont été recherchés sur 468 souches animales isolées en France. Les îlots n'ont été retrouvés que chez *P. mirabilis*. Parmi eux, 17/459 (3,7%) avaient un îlot dont un tiers était de type PGI1 (Schultz, Cloeckert, et al. 2017).

Contrairement aux études françaises, les études chinoises n'ont recherché par PCR que les îlots de résistance SGI1. Ainsi les prévalences étaient de 9,4% (6/64) chez les poulets, 4,9% (3/61) chez les porcs et de 29,4% (5/17) chez l'homme (Lei et al. 2014, 2015 ; Bi et al. 2011).

A ce jour, les îlots ont seulement été décrits chez *S. enterica*, *P. mirabilis* et *M. morganii* alors que d'autres entérobactéries possèdent un site d'attachement potentiel *attB*. Entre 2002 et 2008, la recherche de l'îlot a été effectuée sur 445 souches d'entérobactéries d'origine humaine, animale ou isolée de la nourriture (277 *Salmonella*, 116 *E. coli*, 43 *Shigella* et 9 *Proteus*) sélectionnées sur leur profil de résistance. A l'exception de *S. enterica*, aucune autre entérobactérie ne possédait SGI1 (Amar et al. 2008).

4. SGI1 et virulence

L'observation d'infections sévères chez l'homme et chez les animaux par ce clone épidémique de *S. Typhimurium* DT104 penta-résistant (ACSSuT) a suscité des interrogations sur le caractère hypervirulent de ce clone (Wall et al. 1994; S. A Carlson, Stoffregen, and Bolin 2002).

Cette hypervirulence pourrait-être liée à la multirésistance de la souche. Des premiers travaux ne mettent pas en évidence de différence du pouvoir invasif sur des cultures tissulaires entre des souches de *S. Typhimurium* multirésistantes (différents lysotypes) et des *S. Typhimurium* sensibles (S. A. Carlson et al. 2000a). En présence d'antibiotiques, il n'est pas non plus observé de différence (S. A. Carlson et al. 2000b). De même, ce clone ne survit pas plus dans les macrophages, ne résiste pas plus au stress oxydatif et n'est pas plus invasif au cours d'une infection chez la souris qu'une souche de référence *S. Typhimurium* sensible (Allen et al. 2001). Ces expériences *in vitro* corroborent une étude clinique qui n'objective pas plus de bactériémie chez les patients infectés par le clone de *S. Typhimurium* DT104 penta-résistant (E. J. Threlfall, Ward, and Rowe 1998). En revanche, une autre étude a montré pour autant que les patients infectés par *S. Typhimurium* penta-résistant avaient un risque plus élevé de décéder (Helms et al. 2002). De même, les patients sont plus souvent hospitalisés lorsqu'ils sont infectés par *S. Typhimurium* avec au moins une résistance associée à l'amoxicilline et au chloramphénicol ou à la streptomycine, aux sulfamides et à la tétracycline (Martin et al. 2004 ; Varma et al. 2005). Cette virulence pourrait être liée notamment à un pouvoir cytotoxique de ce clone. En effet, des expériences de ligature iléale chez la souris ont montré que cette souche était responsable d'extrusion cellulaire et d'atrophie des villosités contrairement aux autres souches de *S. enterica* (S. A. Carlson et al. 2001). Ces études ont été menées pour comprendre l'hypervirulence liée à la multirésistance ou au clone penta-résistant de *S. Typhimurium* DT104 mais n'ont pas recherché la présence de SGI1.

D'autres auteurs suggèrent que l'absence de la transcriptase inverse du rétron dans *S. Typhimurium* DT104 pourrait jouer un rôle dans la virulence. Ils ont observé que toutes les souches de *S. Typhimurium* ayant perdu la transcriptase inverse du rétron étaient porteuses de SGI1. Ils remarquent toujours la présence de la même délétion, c'est-à-dire

une délétion de 816 pb entre la partie 3' terminale de l'IS6100 et les 397 pb en aval du codon d'initiation du gène *yieE* (gène chromosomique de *S. enterica* en aval de *yidY* et *yidZ*). Ils suggèrent que cette délétion est due à une recombinaison homologe au niveau de l'IS6100 qui procurerait une plus grande stabilité à SGII. Ainsi, en déléant cette transcriptase inverse du rétron chez une souche de *S. Typhimurium* porteuse de SGII-C, ils ont montré que les souris mouraient plus vite que celles infectées par la souche isogénique non déléetée (Pilousova et al. 2005).

Une autre hypothèse serait que les souches porteuses de SGII auraient un fond génétique commun constitué de gènes conférant une plus grande virulence (virulotype particulier). Une première étude a mis en évidence une association forte entre les souches de *S. Typhimurium* ST19 porteuses de SGII et la présence du plasmide de virulence pSLT ($p=0,001$ avec un OR= 119). Cependant, ils n'ont pas mis en évidence de lien entre les infections invasives chez l'homme et la présence du plasmide de virulence pSLT (Wiesner et al. 2009). D'autres auteurs n'ont pas différencié de complexe de virulence particulier associé aux souches avec SGII (Beutlich et al. 2011 ; Bugarel et al. 2011). Ils ont presque toujours détecté chez *S. Typhimurium* les principaux déterminants de virulence (le plasmide de virulence pSLT, les îlots de pathogénicité SPI-2, -3, -4 et 5) (Bugarel et al. 2011).

Enfin, les gènes présents dans SGII pourraient influencer sur l'expression de gènes de virulence de *S. enterica*. Ainsi, des auteurs ont montré que le gène chromosomique *clg* qui code pour une collagénase a une activité cytopathogène sur les entérocytes murins. Ce gène *clg* est présent chez de nombreuses espèces bactériennes mais n'est pas exprimé (Wu, Carlson, and Meyerholz 2002). L'expression de ce gène est réprimée par la protéine SlyA. En l'absence de cette protéine SlyA, les souches porteuses de SGII (*S. Agona*, *S. Infantis* et *S. Typhimurium*) activent l'expression de ce gène *clg* et produisent un effet

cytopathogène. Le mécanisme de cette activation n'est pas connu à ce jour. Ce gène *clg* n'est pas activé chez les souches de *S. enterica* sans SGII (S.A. Carlson, McCuddin, and Wu 2005). D'autre part devant des infections très sévères chez des bovins, liées à des *S. Typhimurium* DT104 penta-résistantes, il a été émis l'hypothèse que les protozoaires présents dans le rumen pouvaient activer le pouvoir invasif de ces souches comme les amibes pour *Legionella pneumophila* (Cirillo, Falkow, and Tompkins 1994). Ils ont effectivement observé une augmentation du pouvoir invasif des souches de *S. enterica* porteuses de SGII après leur exposition à des protozoaires du rumen chez des veaux. Cette augmentation du pouvoir invasif n'est pas objectivée en l'absence de SGII (Rasmussen et al. 2005). Par ailleurs, les souches délétées de S013 n'expriment pas non plus ce pouvoir invasif. Ainsi, S013 joue un rôle dans ce pouvoir invasif. Par contre, l'apport de S013 aux souches de *S. enterica* sans îlot exposées aux protozoaires ne permet pas d'exprimer ce pouvoir invasif. Ainsi, S013 ne fonctionne pas seul et a besoin d'un autre co-facteur non encore identifié présent sur le SGII pour exprimer son pouvoir invasif après exposition aux protozoaires (S. A. Carlson et al. 2007). Le rôle de S013 a été confirmé avec des souches de *S. Kentucky* isolées de poulets septiques au Nigéria (Ogunleye and Carlson 2012). Une étude a comparé l'expression des gènes chromosomiques entre une souche de *S. Typhimurium* sans SGII et sa souche isogénique avec SGII (obtenue après conjugaison), grâce à une puce d'ADN. Ainsi, l'expression de 36 gènes est modulée en présence de SGII. Les gènes codant pour l'utilisation du fer ou de l'acide sialique sont sur-exprimés alors que les gènes impliqués dans le chimiotactisme ou l'expression des flagelles sont sous-exprimés. En présence de SGII, *Salmonella* pourrait échapper plus facilement au système immunitaire de l'hôte ou aurait un meilleur « fitness » dans son environnement (Golding et al. 2007). Cette modification de l'expression des gènes en présence de SGII, comme la sur-expression du gène *sthE* codant

pour une sous-unité d'un *pilus* pourrait expliquer le fait que *S. enterica* avec SGII est capable de produire plus de biofilm que celle qui n'en possède pas (Malcova et al. 2008). Enfin, des travaux ont été réalisés sur le modèle de *Caenorhabditis elegans*. Ils ont mis en évidence que la survie de *C. elegans* était plus courte après infection par *S. Typhimurium* DT104 porteuse d'un SGII complet qu'après une infection par sa souche isogénique déléetée de la région MDR. L'expression des gènes codant pour des peptides antimicrobiens de *C. elegans* est d'autant plus activée en présence de la région MDR. Sahu *et al* suggèrent donc que certains gènes de cette région pourraient jouer un rôle dans la modulation de la réponse immune précoce de *C. elegans*. Ainsi, le gène *floR* présent sur cette région code pour la résistance au chloramphénicol *via* l'expression d'une pompe d'efflux. Cette pompe d'efflux pourrait avoir un impact sur la virulence de la souche ou sa capacité à survivre en milieu hostile. D'autres gènes présents dans cette région n'ont pas de fonction connue tels *orf1*, *orf5*, *orf6* ou *groEL* et pourraient être impliqués dans la virulence (Sahu et al. 2013).

Ces différents travaux suggèrent que SGII joue un rôle dans la pathogénicité des *S. enterica*. Certains gènes présents dans SGII (S013, certains gènes de la région MDR) influenceraient l'expression de gènes chromosomiques. Le succès des clones portant SGII (ex : *S. Typhimurium* DT104, *S. Kentucky* ST198...) indique que cette régulation joue en faveur de *S. enterica*.

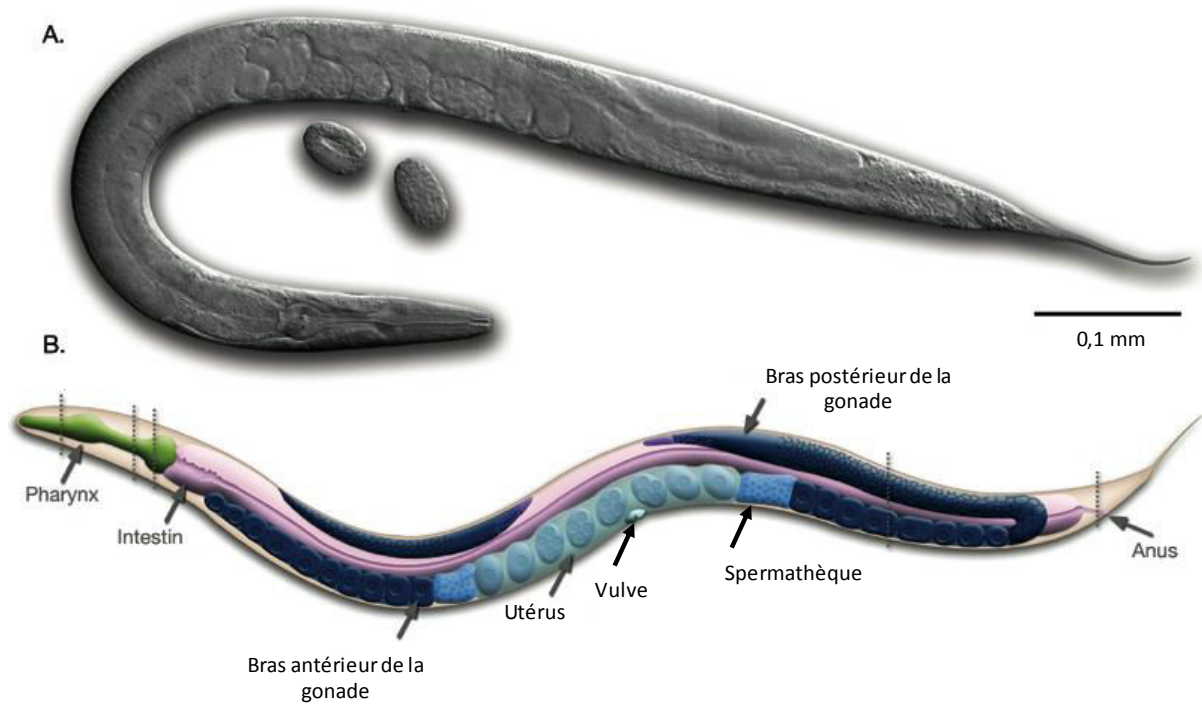


Figure 34 : Anatomie d'un adulte hermaphrodite de *C. elegans* (D'après Altun et al. 2002)

E. *Caenorhabditis elegans* : un modèle vivant pour étudier les interactions hôte pathogène

1. *Caenorhabditis elegans*

C. elegans est un nématode dont le cycle de vie est court (15-20 jours). Il est non pathogène et vit dans le sol et se nourrit essentiellement de micro-organismes présents dans son environnement. Il est présent dans la majeure partie du monde. Ce ver a été décrit pour la première fois au cours du 19^{ème} siècle par le naturaliste français Emile Maupas. Il l'a isolé de l'humus en Algérie. Ce ver transparent mesure 1 mm de long. Il est protégé de l'extérieur par une cuticule. Dessous se trouve un épiderme qui entoure les fibres musculaires et des cordons nerveux. Il a un système digestif constitué d'une bouche, d'un pharynx, d'un broyeur, d'un intestin et possède des gonades. Ces organes baignent dans le liquide pseudocoelomique. Il est hermaphrodite et auto-fécondant. La gonade est en 2 bras situés en antérieur et en postérieur du ver et qui débouchent dans une poche contenant le sperme, appelée spermathèque. Celle-ci est reliée à l'utérus (Figure 34).

Les oocytes progressent dans la gonade jusqu'à la spermathèque et peuvent être fécondés au contact du sperme. L'œuf est pondu 10 heures après la fécondation et devient un adulte en 3 jours à 20°C. Après éclosion, il passe par 4 stades larvaires (L1 à L4) avant de devenir un adulte au bout d'environ 48h. En cas de conditions défavorables pour sa croissance au moment du stade larvaire L2, il peut se mettre en stade « dauer » et peut alors survivre des mois sous cette forme qui est une forme de résistance (Figure 35). Cet adulte produit des oocytes pendant environ 4 jours puis vit encore pendant 10 à 15 jours. Il est capable de pondre environ 300 œufs.

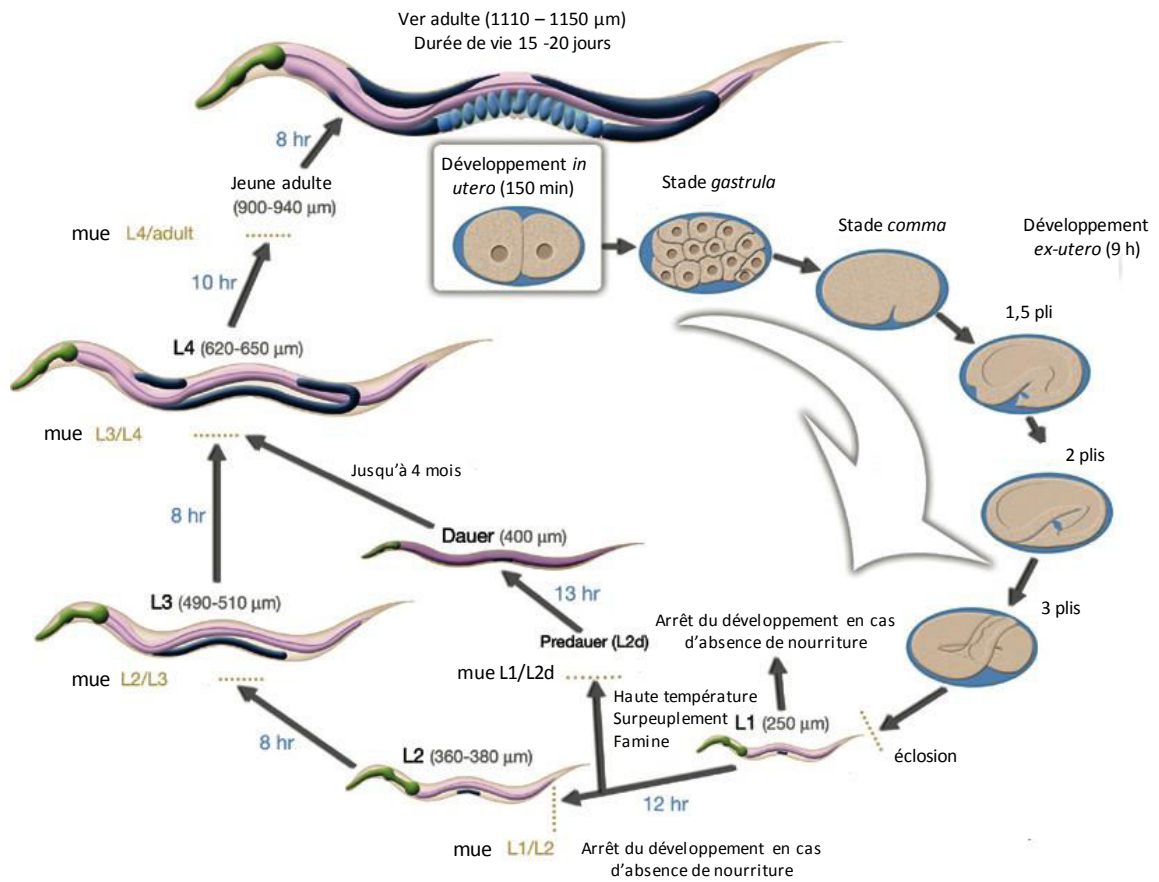


Figure 35 : Cycle de vie de *C. elegans* (D'après Altun et al. 2002).

Son caractère hermaphrodite permet d'obtenir une descendance monoclonale. Cependant, dans 0,1 à 0,2 % des cas, au cours de la méiose, au moment de la répartition du chromosome X se produit une erreur qui aboutit à la naissance d'un ver mâle (X0) et non hermaphrodite (XX). Ces mâles peuvent se reproduire avec un hermaphrodite ce qui entraîne alors une descendance non monoclonale. Le nombre d'œufs peut alors monter jusqu'à 1200 à 1400 (Corsi Ann K. Chalfie Martin 2015; Altun et al. 2002).

2. *C. elegans* : un bon modèle pour étudier les interactions hôte pathogène

C. elegans se cultive facilement en laboratoire entre 15°C et 25°C sur des milieux gélosés comme le milieu NGM (Nematode Growth Media) ou liquides (S-Medium) en présence de bactéries *E. coli* OP50. Ils peuvent être congelés dans du glycérol à -80°C et reprendre aussitôt leur cycle de vie. Leur durée de vie courte, leur petite taille, la simplicité de leur organisme et le faible coût pour les étudier font de *C. elegans* un bon modèle vivant.

Dans les années 1960, le célèbre biologiste Sydney Brenner, qui a tout d'abord travaillé sur la nature du code génétique avec Crick, s'est intéressé à *C. elegans* du fait de sa simplicité et de sa facilité de culture pour établir les bases génétiques et moléculaires du développement des cellules. Ses travaux sur *C. elegans* lui ont valu l'attribution du prix Nobel de médecine en 2002 en physiologie. Ils lui ont permis de développer les outils de biologie moléculaire pour étudier *C. elegans*. Au cours de ses recherches, une technique a été mise au point pour provoquer la génération de nombreux mutants qui l'ont conduit à établir une cartographie de 100 gènes. Le génome complet de *C. elegans* est constitué de 20 mégabases réparties en 6 chromosomes et 20 000 gènes. *C. elegans* est l'un des premiers organismes vivants dont le génome a été complètement séquencé. Son génome a été publié en 1998. Il existe un centre de

référence aux Etats-Unis (*Caenorhabditis* genetic center) qui répertorie (données génétiques), conserve les différents mutants de *C. elegans* sélectionnés et les redistribue aux laboratoires. Cette centralisation permet d'utiliser les mêmes souches au sein de différents laboratoires et permet de procurer aux laboratoires des mutants adaptés à leurs études. Par exemple, il existe des mutants *C. elegans glp-4* qui se multiplient à 15°C mais sont stériles à 25°C. Ces mutants sont souvent utilisés pour les études de survie de *C. elegans* afin que les vers ne se multiplient pas et puissent être comptés. La connaissance de son génome et l'obtention de mutants facilite l'étude des interactions hôte pathogène. De plus, il partage des points communs avec les mammifères notamment au niveau du processus de développement, de son système neurologique, des mécanismes de biologie cellulaire et biochimiques. Il possède une immunité innée mais pas d'immunité acquise (Corsi Ann K. Chalfie Martin 2015).

Même si toutes les bactéries ne sont pas pathogènes pour *C. elegans*, c'est un modèle vivant qui peut être utilisé pour étudier l'interaction hôte pathogène de nombreuses bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia pseudomallei*, *Serratia marcescens*, *S. enterica* ou à Gram positif comme *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Enterococcus faecalis*. Ces espèces bactériennes sont en général étalées et cultivées sur des géloses NGM dans des boîtes de Pétri sur lesquelles sont disposés les nématodes. Les espèces bactériennes absorbées par le pharynx sont en général dégradées au niveau du broyeur avant de passer sous forme de lysat dans la lumière intestinale où il est assimilé. Certaines espèces bactériennes comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *S. enterica* sont capables de pénétrer dans la lumière intestinale sans être altérées. L'étude des interactions hôte pathogène peut-être réalisée par de simples études de survie à l'étude du transcriptome de *C. elegans* pour connaître et comprendre les voies de signalisation déclenchées en présence du pathogène (Aballay and Ausubel 2002; Sifri, Begun, and Ausubel 2005; Darby 2005).

3. Interactions entre *S. Typhimurium* et *C. elegans*

Plusieurs travaux ont été menés pour étudier les interactions entre *S. Typhimurium* et *C. elegans*. Le mode d'infection est le même que celui des mammifères, c'est-à-dire par ingestion. *S. Typhimurium* est pathogène pour *C. elegans*. La durée de survie de *C. elegans* est diminuée en présence de *S. Typhimurium* (médiane de survie = 5,1 jours) en comparaison à celle en présence de *E. coli* OP50 (médiane de survie = 9,9 jours) à 25°C. Celle-ci est la même après une exposition courte (5 h) à *S. Typhimurium* qu'après une exposition permanente. De même, elle reste diminuée après exposition à des concentrations plus faibles en *S. Typhimurium* (ratio *S. Typhimurium*/*E. coli* = 1/1000^{ème}). Après le début de l'infection, l'analyse régulière (toutes les 24 h) du contenu de *C. elegans* en bactéries montre que *S. Typhimurium* prolifère contrairement à *E. coli*. Après suivi des bactéries par microscopie par fluorescence, il est observé que *S. Typhimurium* est capable de passer le broyeur sans être dégradée et s'accumule dans la lumière intestinale qui devient distendue. Le nombre de cellules intestinales diminue et la partie terminale du bulbe du pharynx est détruite. Ces observations montrent que *S. Typhimurium* est capable de se multiplier et de persister dans l'intestin de *C. elegans* en adhérant probablement aux cellules intestinales. Par contre *S. Typhimurium* n'est pas capable d'envahir les cellules intestinales de *C. elegans*. Contrairement à *P. aeruginosa* qui est capable de tuer *C. elegans* sans contact direct en sécrétant une toxine dans le milieu de culture, *S. Typhimurium* ne sécrète pas de telle toxine (Aballay, Yorgey, and Ausubel 2000; Labrousse et al. 2000).

Plusieurs interactions entre *S. Typhimurium* et *C. elegans* ont pu être mises en évidence. Ainsi, les gènes (*fur-1*, *ompR* et *rpoS*) favorisant la survie de *S. Typhimurium* en milieu acide jouent aussi un rôle dans la pathogénèse de *S. Typhimurium* puisqu'en leur absence la virulence de *S. Typhimurium* diminue sur *C. elegans* (Labrousse et al. 2000). *S. Typhimurium*

est capable d'activer l'apoptose des cellules germinales de *C. elegans*. Le déclenchement de cette apoptose par *S. Typhimurium* est notamment dû à la présence du lipopolysaccharide (LPS) mais cette réponse immune innée de *C. elegans* ne passe pas par l'activation des récepteurs Toll-like *via* les motifs moléculaires des pathogènes associés (PAMPs) (ex : LPS) contrairement aux mammifères (Aballay et al. 2003). L'induction de l'apoptose implique aussi le système PhoP/PhoQ (régulateur des gènes de virulence) de *S. Typhimurium* (Aballay and Ausubel 2001). Les gènes de virulence (*hilA*, *hilD*, *invH* et *sptP*) présents sur l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* SPI-1 et associés au système de sécrétion de type 3 jouent un rôle dans la virulence de *S. Typhimurium* sur *C. elegans*. Les gènes *hilA*, *hilD* sont aussi nécessaires à *S. Typhimurium* pour déclencher l'apoptose (Tenor et al. 2004). En revanche, le gène *ssaV* de l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* SPI-2 ne semble pas être impliqué dans cette virulence (Labrousse et al. 2000).

En dehors d'une approche de virulence, le modèle de *C. elegans* permet d'évaluer le fitness de *S. Typhimurium*, notamment le coût de la résistance. En effet, une étude de compétition entre *S. Typhimurium* sensible et des mutants résistants (à la streptomycine, ou à la rifampicine, ou à l'acide fusidique, ou à la mupirocine) de *S. Typhimurium* a mis en évidence que les souches résistantes prolifèrent moins dans l'intestin de *C. elegans* et ont tendance à être remplacées par les souches sensibles (Paulander et al. 2007).

III. Objectifs

Le travail de cette thèse avait plusieurs objectifs. Nous nous sommes intéressée à la prévalence et à la structure des îlots de résistance de type SGI1 et PGI1 au sein de souches cliniques de *P. mirabilis* car il existe très peu de données concernant cette espèce contrairement à *S. enterica*. Nous avons également étudié la mobilité de ces îlots : leur capacité de transfert à d'autres entérobactéries et leur excision. Enfin, nous avons tenté de préciser le rôle potentiel des îlots dans la virulence dans un modèle expérimental utilisant *C. elegans* et dans une étude clinique incluant des patients infectés par *S. enterica*.

IV. Première étude : épidémiologie et structure des îlots de résistance de type SGI1 et/ou PGI1 chez *P. mirabilis*

A. Introduction

Cette partie du travail porte sur la prévalence des îlots de résistance de type SGI1 et PGI1 au sein de souches cliniques de *P. mirabilis*. L'étude des structures a été également réalisée afin d'approfondir les connaissances sur leur origine, leur plasticité et leur importance dans la dissémination des gènes de résistance.

B. Matériels et méthodes

1. Recrutement des souches de *P. mirabilis*

De 2011 à 2015, 410 souches cliniques de *P. mirabilis* ayant acquis au moins 1 résistance à un antibiotique ont été incluses : 380 du CHU de Dijon et 30 de l'hôpital Lariboisière à Paris [hôpitaux du nord de l'assistance publique des hôpitaux de Paris (APHP)]. Par ailleurs, la recherche de l'îlot a été effectuée sur 33 souches cliniques dijonnaises qui n'avaient aucune résistance acquise.

Ces souches ont été identifiées par galerie biochimique Api20E BioMérieux, ou par cartes Vitek® idGN de BioMérieux, ou par spectrométrie de masse (Maldi-Tof de Bruker). Les antibiogrammes ont été réalisés selon la méthode recommandée par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM).

2. Techniques de biologie moléculaire

cf Annexe 4

a. Extraction de l'ADN bactérien :

i. Extraction par choc thermique

Après lavage des bactéries avec de l'eau pour préparation injectable (EPPI), les bactéries sont alors lysées par choc thermique (10 minutes dans de l'eau bouillante puis 10 minutes dans de la glace). Puis l'ADN présent dans le surnageant est alors récupéré. Cette méthode a été utilisée pour la réalisation des réactions de polymérisation en chaîne (PCRs).

ii. Extraction par le kit Gentra[®] Puregene[®], QIAGEN

Les bactéries sont lysées par une solution de lyse cellulaire. L'ARN est digéré par une RNase A, puis les protéines sont éliminées par précipitation. Enfin, l'ADN est précipité puis réhydraté. Cette méthode a été utilisée pour le séquençage haut débit.

b. Quantification de l'ADN bactérien

i. Dosage de l'ADN par spectrophotométrie

Les concentrations d'ADN sont mesurées par absorbance à la longueur d'onde 260 nm à l'aide du NanoDrop ND-1000, Thermo scientific[®]. La pureté de l'extrait d'ADN est aussi vérifiée en calculant de ratio d'absorbance 260/280 (protéines, phénols et autres composés organiques absorbant à 280 nm) qui doit être aux alentours de 1,8 et en calculant le ratio 260/230 (autres contaminants qui absorbent à 230 nm) dont la valeur doit avoisiner 2 à 2,2.

Cette méthode ne dose pas spécifiquement l'ADN car elle peut être faussée par la présence d'ARN et d'autres contaminants qui absorbent à 260 nm. Elle n'est donc pas très spécifique.

ii. Dosage de l'ADN par fluorescence

Le kit Qubit[®] dsDNA BR Assay de Invitrogen life technologies a été utilisé. Une solution avec un marqueur fluorescent de l'ADN est préparée. En parallèle, une gamme d'étalonnage est réalisée afin de déterminer la concentration en ADN de l'échantillon. La fluorescence des tubes échantillons contenant l'ADN est mesurée avec l'appareil Qubit[®], THERMO SCIENTIFIC[®].

c. Techniques de PCR

i. Réaction de PCR classique (amplification d'un fragment d'ADN ≤ 1 kb)

Cette réaction de PCR a été utilisée pour la recherche de l'îlot de résistance en amplifiant un gène hautement conservé, *sgiA* (S026) qui permet de détecter les îlots de résistance de type SGI1 ou PGI1 quelque soit leur site d'insertion. A ce jour, une seule structure a été décrite sans ce gène *sgiA* (Lei et al. 2015).

La liste des amorces choisies est citée en annexe 5. La composition du milieu réactionnel et le programme du thermocycleur sont décrits dans l'annexe 6.

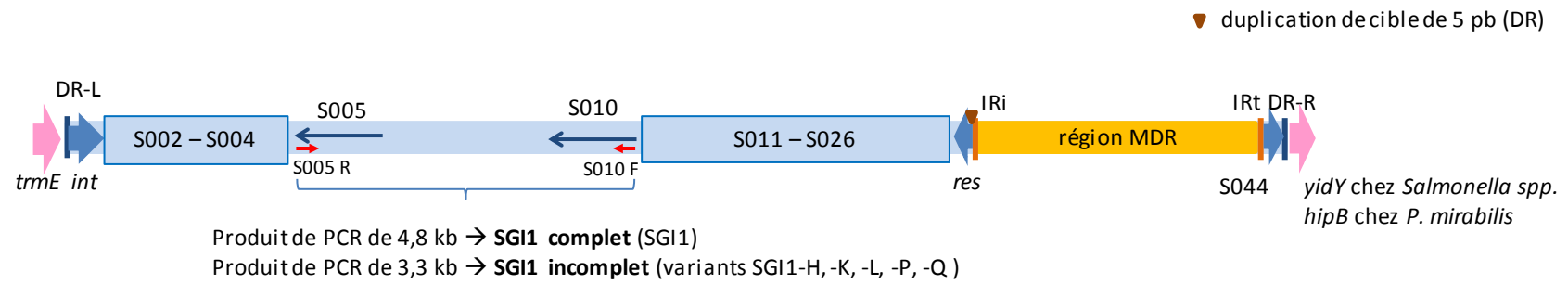


Figure 36 : PCR longue utilisée pour classer les SGI1 en SGI1 complet ou incomplet

ii. Réaction de PCR longue (amplification d'un fragment d'ADN entre 1 et 5 kb)

Cette réaction de PCR est utilisée pour déterminer la taille et le nombre d'intégrons de classe 1 dans la souche étudiée, en utilisant les amorces L1 et R1 (Annexe 5). Cette réaction de PCR permet aussi de déterminer le type d'îlot : SGI1 complet, SGI1 incomplet (délétion entre S005 et S009) ou PGI1 (Figure 36). En présence d'un SGI1 complet, un produit de PCR de 4,8 kb est attendu alors qu'il sera de 3,3 kb si le SGI1 est incomplet en utilisant les amorces S005 R et S010 F (Figure 36). En présence de PGI1, un produit de PCR de 3,5 kb est attendu en utilisant les amorces C1599 outR et C1598 F (Annexe 5). Enfin, elle permet d'assembler les contigs obtenus par séquençage haut débit et permet d'amplifier les régions à séquencer par la méthode de Sanger. Les amorces sont alors sélectionnées en fonction de la région à étudier et ciblent des séquences non répétées. La composition du milieu réactionnel et le programme du thermocycleur pour la réaction d'amplification sont détaillés dans l'annexe 7.

d. Migration des produits de PCR par électrophorèse et révélation

Les produits de PCR sont révélés par du bromure d'éthidium (BET) après migration par électrophorèse grâce à un transilluminateur UV (Vilber Lourmat[®]). Ils migrent en fonction de la taille du fragment d'ADN amplifié.

e. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés par filtration sur membrane (Amicon[®]centrifugal filter, Merck[®]).

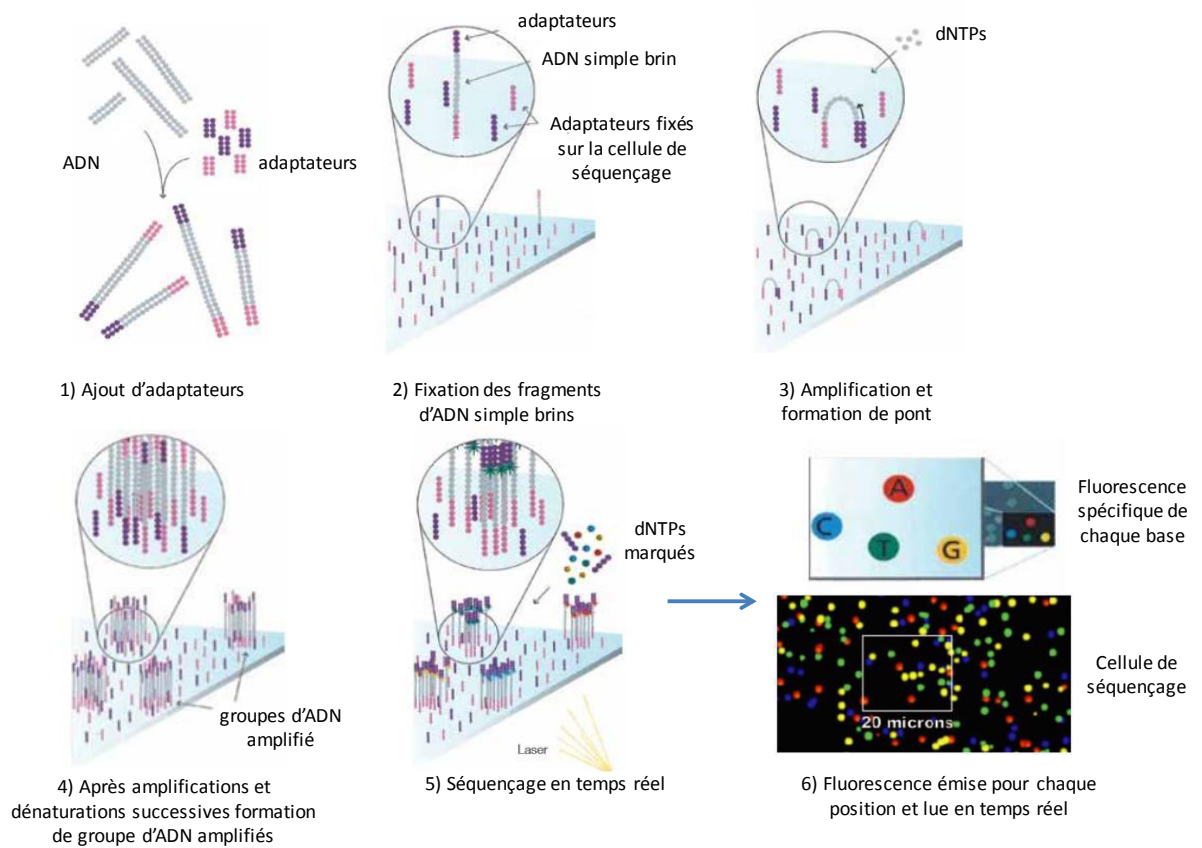


Figure 37 : Schéma du séquençage à haut débit (D'après Illumina®)

f. Méthodes de séquençage

i. *Séquençage par la nouvelle génération de séquençage (NGS) à haut débit*

La technologie utilisée pour réaliser le séquençage à haut débit est celle d'Illumina[®] qui repose sur le séquençage par la méthode des terminateurs réversibles (Figure 37). La réaction d'amplification et de séquençage est réalisée sur un support solide, appelé cellule de séquençage. Les fragments d'ADN simple brin fixés sur ce support sont amplifiés en présence d'ADN polymérase et de nucléotides et forment des ponts. L'ADN double brin formé est dénaturé puis à nouveau amplifié. Ainsi, des groupes denses de fragments amplifiés sont obtenus. Le séquençage de ces groupes de fragments amplifiés se déroule en temps réel, position par position. L'ADN polymérase incorpore au fur et à mesure des nucléotides avec une extrémité 3'OH désactivée et marquée par un fluorochrome différent. Un lecteur laser permet alors de détecter simultanément toutes les positions incorporées. Après détection des signaux, le groupement de protection du nucléotide est éliminé par photoclivage en utilisant la lumière ultraviolette. L'ADN polymérase peut incorporer le prochain nucléotide et ainsi de suite.

Pour préparer la librairie, le kit Nextera[®]XT d'Illumina[®] est utilisé. La préparation de la librairie se déroule en plusieurs étapes.

- la tagmentation : cette étape consiste à fragmenter l'ADN bactérien de façon aléatoire à des tailles en moyenne égales à 200 pb (< 800 pb) par une enzyme appelée « tagmentase » et à ajouter des adaptateurs appelés ligands A et B au niveau de chaque extrémité des fragments d'ADN simple brin. Seuls les fragments avec le ligand B, biotinylé, pourront se fixer sur la cellule de séquençage sur laquelle est présente de la streptavidine. Les ligands A et B servent d'amorces pour l'ADN polymérase
- l'amplification et l'indexage des fragments d'ADN tagmentés

- le lavage des produits de PCR indexés : cette étape permet de purifier les produits de PCR indexés en utilisant des billes magnétiques qui vont fixer l'ADN et permettre d'éliminer les contaminants tels que les amorces, les dNTPs et les sels
- la normalisation de la librairie : cette étape permet d'équilibrer la concentration d'ADN de chaque librairie
- le mélange des différentes librairies
- la dénaturation du mélange des librairies
- *Séquençage par la méthode des terminateurs réversibles*

La cartouche avec la librairie dénaturée est insérée dans le séquenceur. Le séquençage est en « paired-end », c'est-à-dire que les deux extrémités des fragments d'ADN sont séquencées. A la fin du séquençage, il est important de vérifier la densité des clusters (doit-être comprise entre 800 et 1200 K/ mm²) et la qualité des lectures en regardant le score de Phred. Ainsi, nous avons considéré que le séquençage était de bonne qualité si 85% des lectures avaient un score de Phred > 30 (une probabilité d'erreur d'identification de base < 1/1000).

ii. Séquençage par la méthode de Sanger

- *Réaction de séquençage*

Cette méthode utilise le principe des terminateurs irréversibles (ddNTPs marqués par un fluorochrome). Les produits de PCR utilisés pour la réaction de séquençage sont ajustés à une concentration en ADN égale à 1 ng/100 pb. Pour la réaction de séquençage, la composition du milieu réactionnel et le programme du thermocycleur sont détaillés dans l'annexe 9.

- *Purification des produits d'extension*

Les produits d'extension obtenus sont purifiés avec de l'EDTA 125 mM (chélateur des ions Mg^{2+}) et de l'acétate de sodium 3 M (pH = 5,2) (stabilisant de l'ADN sous forme bicaténaire) et de l'éthanol qui précipite l'ADN. Le mélange est incubé pendant 15 minutes puis centrifugé pendant 15 minutes à 18 000 g à 4°C. Le culot contenant les produits d'extension est resolubiliser dans du formamide.

- *Séquençage*

Les produits d'extension sont séparés en fonction de leur taille. Le séquenceur (16 capillaires) 3130 XL (Applied[®]) traduit les signaux en séquence.

iii. Analyse des séquences

Les séquences obtenues (2 fichiers par souche) par le séquençage haut débit sont téléchargées dans le serveur web <http://galaxy.prabi.fr/> pour être analysées. L'outil trimmomatic est paramétré pour sélectionner uniquement les lectures de plus de 50 pb avec un score de Phred >30 et pour supprimer la 1^{ère} base de chaque lecture. Les lectures sont alignées sur la séquence de référence de *P. mirabilis* HI4320 (AM942759) avec l'outil BWA. Ensuite, un filtre est appliqué pour ne sélectionner que les lectures qui n'alignent pas avec la séquence de référence. Les lectures filtrées sont coupées par l'outil Velvet en paramétrant un K-mer égal à 29. L'assemblage réalisé avec Velvetg est paramétré pour obtenir des contigs d'une profondeur au moins égale à 50X et de plus de 200 pb. Les contigs retenus sont alors alignés un à un à l'aide de nucleotide blast à des séquences de la base de données NCBI dans le serveur web <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Pour assembler les contigs, des PCR longues sont effectuées en utilisant des amorces hybridant des régions non répétées. Les

produits de PCR obtenus sont séquencés par la méthode de Sanger. Le logiciel Bioedit permet de lire et analyser les chromatogrammes et de corriger les séquences obtenues. Enfin, le logiciel Integrative Genomics Viewer - Broad Institute[®] permet de vérifier que les lectures sont bien alignées sur la séquence obtenue de l'îlot de résistance et qu'il n'y a pas de double population, notamment au niveau des régions répétées.

g. Comparaison des séquences d'acides aminés des ORFs du squelette de l'îlot

Les séquences d'acides aminés des ORFs du squelette de l'îlot présent chez *Pm1LENAR* ont été alignées une à une avec celles de l'îlot SGI1 (AF261825) et des îlots apparentés SGI2 (AY963803), SGI1-V (HQ888851) et PGI1 (KJ411925) à l'aide de l'outil ClustalW.

h. Génotypage des souches de *P. mirabilis* par électrophorèse en champ pulsé (ECP)

Toutes les souches de *P. mirabilis* avec îlot de résistance ont été génotypées par ECP selon les techniques déjà décrites (Neuwirth et al. 2001). L'ADN bactérien est extrait à partir d'une culture de 18 h sur gélose Mueller Hinton (MH). Les bactéries sont lavées dans 1 ml de tampon Tris-NaCl 1M puis centrifugées à 20000 g pendant 5 minutes. Un 2^{ème} lavage est effectué en répétant cette opération. Le culot bactérien est remis en suspension dans 2 ml de tampon Tris-NaCl 1 M. La densité optique (DO) à 650 nm est lue au spectrophotomètre et ajustée à 1,7-1,8 pour obtenir une concentration bactérienne optimale. La suspension bactérienne est par la suite incubée à 60°C pendant 30 minutes. 500 µL de cette suspension bactérienne est ajoutée à 500 µL de gélose à bas point de fusion à 60°C (gélose SeePlaque GTG FMC (Tebu) à 1% en tampon de suspension Tris-NaCl 1 M. Ce mélange est distribué

dans une barrette à inserts. Après refroidissement à 4°C, les inserts solidifiés sont démoulés et incubés 1 h à 37°C dans 3 ml de tampon EDTA 0,5 M pH=8. Ce tampon permet de complexer les cations, le lipopolysaccharide (LPS) est alors déstabilisé, la membrane externe se rompt. Après élimination du tampon EDTA, 5 ml de solution de lyse (EDTA à 0,5M à pH=8, Sodium dodécylsulfate 1%) sont ajoutés ainsi que 25 µL de pronase à 5000 UI/ml et incubés au moins 36 h à 37°C. Cette étape permet l'hydrolyse des protéines bactériennes. Les inserts sont lavés 2 fois avec 20 ml de tampon Tris-EDTA (TE) contenant 200 µL de phénylméthylsulfonyl fluorure à 1,75% (PMSF) pendant 1 h à 37°C sous agitation douce. Le PMSF permet d'inhiber les protéases. Puis les inserts sont lavés 3 fois avec 20 ml de tampon TE sans PMSF pendant 1 h à 37°C sous agitation douce. Ces 3 derniers lavages permettent d'éliminer le PMSF pouvant interférer avec les enzymes de restriction. La digestion des inserts contenant l'ADN bactérien est réalisée à l'aide de l'enzyme de restriction *SmaI*. Cet insert est d'abord immergé dans 190 µL de tampon de restriction fourni avec l'enzyme (20 000 U/ml, Biolabs[®]) pendant 30 minutes, puis 5 µL de l'enzyme de restriction *SmaI* sont ajoutés. Les inserts sont incubés à 4°C pendant une nuit. Pour la digestion de l'ADN, les inserts sont incubés pendant 5 h à 25°C. Afin d'augmenter le pouvoir discriminant une autre digestion est réalisée avec 3 µL de l'enzyme de restriction *ApaI* à la même température (10 000 U/ml, Biolabs[®]). Les inserts sont intégrés dans le gel d'agarose 1% en tampon Tris-acide borique-EDTA (TBE) à 0,5X. Les paramètres de l'ECP sont les suivants : pulses initiaux (20 secondes), pulses finaux (5 secondes) et temps de migration (20 heures) à 180V dans du tampon TBE à 0.5X réfrigéré à 14°C. Le gel est coloré dans une solution de BET à 1 mg/l.

Tableau 2 : Prévalence des îlots parmi les souches de *P. mirabilis* ayant acquis au moins une résistance parmi celles étudiées au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon, entre 2011 et 2015.

Années	Recherche d'un îlot négative	Recherche d'un îlot positive	Pourcentage de souches avec îlot
2011 (n = 18)	15	3	16,7%
2012 (n = 61)	57	4	6,6%
2013 (n = 82)	75	7	8,5%
2014 (n = 118)	113	5	4,2%
2015 (n = 101)	95	6	5,9%
Total n = 380	355	25	6,6%

C. Résultats et discussion

1. Description des souches de *P. mirabilis* étudiées

a. Prévalence des îlots de résistance SGI1 ou PGI1

De mai 2011 à novembre 2015, l'îlot de résistance a été détecté parmi 25 souches de *P. mirabilis* isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon. La prévalence des souches porteuses d'un îlot de résistance parmi les souches de *P. mirabilis* ayant acquis au moins une résistance était donc de 25/380, soit 6,6% (Tableau 2). Cette prévalence fluctue en fonction des années. Elle était un peu plus élevée en 2013 (7/82, soit 8,3%) et fortement élevée en 2011 (3/18, soit 16,7%). Ceci peut être lié à un biais de sélection. En effet, de 2011 à 2013, les souches de *P. mirabilis* retenues pour l'étude présentaient au moins une résistance à l'amoxicilline et/ou à la gentamicine et/ou au triméthoprim-sulfaméthoxazole. Or les gènes conférant ces résistances sont ceux classiquement présents dans les îlots (Siebor and Neuwirth 2013). A partir de 2014, toutes les souches ayant au moins une résistance acquise ont été incluses dans l'étude. Ainsi, la prévalence était égale à 5,0% au CHU de Dijon sur les années 2014 et 2015.

Il est à noter que la recherche d'un îlot de résistance s'est révélée négative sur les 33 souches qui ne présentaient aucune résistance acquise.

Parmi les 30 souches ayant acquis au moins 1 résistance et collectées au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Lariboisière en 2015, 5 souches de *P. mirabilis* étaient porteuses de l'îlot de résistance. Ainsi, la prévalence des souches porteuses d'îlot de résistance était de 5/30, soit 16,7%.

Tableau 3 : Sites dans lesquels ont été isolées les souches de *P. mirabilis* étudiées au CHU de Dijon et à Lariboisière (Paris)

Sites*	Recherche d'un îlot négative (n=380) (%)	Recherche d'un îlot positive (n=30) (%)	Nombre total d'isolat par site (n =410) (%)	Résultat du test statistique**
Moyenne d'âge des patients (an)	65,8	60,9	65,5	p = 0,30
ECBU	174 (45,8%)	16 (53,3%)	190 (46,3%)	p = 0,45
Pus superficiels ou cathéters	78 (20,5%)	5 (16,7%)	83 (20,2%)	p = 0,81
Prélèvements respiratoires	44 (11,6%)	0	44 (10,7%)	p = 0,06
Prélèvements profonds	39 (10,3%)	3 (10%)	42 (10,2%)	p = 1,0
Sites de colonisation	25 (6,6%)	5 (16,7%)	30 (7,3%)	p = 0,06
Hémocultures	20 (5,3%)	1 (3,3%)	21 (5,1%)	p = 1,0

* ECBU : examen cyto-bactériologique des urines

Pus superficiels et cathéters : pus superficiels de cicatrice, plaie, d'ulcérations, d'escarre, placentoculture, vis, cathéters et chambre implantable

Prélèvements respiratoires : expectorations, aspiration trachéale protégée (ATP), sécrétions bronchiques, lavage broncho-alvéolaire (LBA), fibro-aspiration

Prélèvements profonds : abcès, hématome, pus profond, liquide gastrique, liquide d'ascite, liquide articulaire, liquide pleural, os, biopsie de sinus, liquide céphalo-rachidien (LCR) de dérivation

Sites de colonisation : prélèvements de selles, rectal, vaginal, de la gorge, du nez, de l'oreille, d'une iléostomie et d'un point de ponction

** La comparaison des moyennes d'âge et la comparaison des sites ont été effectuées respectivement par le test de Student et par le test exact de Fisher. Les valeurs $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives

La différence de prévalence entre ces 2 hôpitaux peut s'expliquer aussi par un biais de sélection mais aussi par une population de patients différente. En effet, l'hôpital Lariboisière, accueille des patients plutôt cosmopolites, notamment d'origine asiatique, africaine et du Moyen-Orient. Dans ces pays la prévalence de la résistance aux antibiotiques est plus forte, il n'est donc pas surprenant que la prévalence des îlots de résistance le soit aussi (Woerther et al. 2013). Ainsi une étude chinoise a rapporté qu'au sein de 17 souches cliniques, 5 étaient porteuses de SGI1 (29,4%) (Bi et al. 2011). Ces chiffres chinois diffèrent beaucoup de ceux rapportés par une étude française menée entre 2010 et 2013 et qui a détecté un îlot dans 9,6% des souches (5/52) (Schultz et al. 2015). Ce dernier pourcentage est plus en accord avec celui retrouvé au CHU de Dijon (6,6%).

Enfin, il est à noter que notre méthode de détection des îlots par la recherche du gène *sgIA* (S026) a pu conduire à une légère sous-estimation. En effet, le nouveau variant, SGI1-Z récemment décrit ne contient pas ce gène (Lei et al. 2015).

b. Sites anatomiques dans lesquels les souches de *P. mirabilis* ont été isolées

Comme attendu, la majorité des souches de *P. mirabilis* étudiées provenait d'urines (46,3%) (Tableau 3). La proportion de souches isolées d'hémoculture était égale à 5,1% (21/410). La moyenne d'âge des patients infectés (ou colonisés) par une souche de *P. mirabilis* avec îlot de résistance était égale à 65,8 ans (écart-type = 25,0 ans) et ne différait pas de celle des patients infectés (ou colonisés) par une souche de *P. mirabilis* sans îlot de résistance (60,9 ans, écart-type = 21,7) ($p = 0,30$). Après analyse univariée par le test exact de Fisher, il n'est pas observé de différence significative de localisation entre les infections dues à des souches avec îlot et celles dues à des souches sans îlot (Tableau 3).

Tableau 4 : Phénotype des souches de *P. mirabilis* avec îlot de résistance

		Résistance		
		Dijon (n=25)	Lariboisière (n=5)	Total (n =30) (%)
β-lactamines				
amino-pénicillines		20	5	25 (83,3%)
Profil enzymatique	Pénicillinase	17	4	21 (70%)
	céphalosporinase	2	1	3 (10%)
	BLSE	1	0	1 (3,3%)
Aminosides				
spectinomycine		24	5	29 (96,7%)
streptomycine		23	4	27 (90%)
kanamycine		13	3	16 (53,3%)
tobramycine		14	3	17 (56,7%)
gentamicine		19	5	24 (80%)
amikacine		0	0	0
Quinolones				
acide nalidixique		14	2	16 (53,3%)
ofloxacine		15	1	16 (53,3%)
ciprofloxacine		12	1	13 (43,3%)
Autres classes d'antibiotiques				
chloramphénicol		14	2	16 (53,3%)
sulfamides		23	5	28 (93,3%)
triméthoprime		17	2	19 (63,3%)
Souches avec penta-résistance (ACSSuT)		9	2	11 (36,7%)

Toutefois, la proportion des souches isolées sur un site de colonisation avait tendance à être plus élevée chez les souches avec îlots (5/30, soit 16,7%) que celles sans îlot (25/380, soit 6,6%) ($p = 0,06$). De plus, il est aussi observé qu'aucune souche avec îlot n'a été isolée dans les prélèvements respiratoires alors que 44 (11,6%) souches sans îlot l'ont été ($p = 0,06$). Cette analyse présente cependant un biais puisqu'un seul site a été retenu par patient. Il n'est pas à exclure que d'autres sites plus profonds aient été infectés par la même souche. Enfin, le nombre de souches de *P. mirabilis* avec îlot reste limité pour pouvoir conclure sur le fait que l'îlot de résistance ait un impact sur la localisation de l'infection.

c. Phénotype des souches de *P. mirabilis* avec îlot de résistance

Dans cette étude, les souches avec îlot étaient quasi-constamment résistantes à la spectinomycine (29/30, soit 96,7%) et aux sulfamides (28/30, soit 93,3%) (Tableau 4). Le pourcentage de souches résistantes à la streptomycine était égal à 27/30, soit 90%. Il est à noter que deux souches résistantes à la spectinomycine restaient sensibles à la streptomycine. Les souches étaient souvent résistantes aux amino-pénicillines (25/30, soit 83,3%) et à la gentamicine (24/30, soit 80%). En revanche, seulement la moitié des souches avec îlot étaient résistantes au chloramphénicol (16/30, soit, 53,3%). Enfin, seul un tiers (11/30, soit 36,7%) des souches avec îlot avaient un phénotype de penta-résistance (ACSSuT). Ces résultats démontrent que le phénotype de penta-résistance (ACSSuT) n'est pas un bon marqueur de détection des îlots.

Tableau 5 : Souches de *P. mirabilis* avec îlot de résistance et caractéristiques de leur îlot

Souche	Date isolement	Lieu*	Prélèvement **	Phénotype***	Type d'îlot	Gènes de résistance dans la région MDR
<i>Pm4</i> CHASY	09/2013	D	ECBU	ACSSuTTm	SGI1-A (complet)	<i>aadA2, qac/sul1, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}, dfrA1</i>
<i>Pm</i> BRI	12/2011	D	Coproculture	AKSSuTTm	SGI1-C (complet)	<i>aadA2, qac/sul1</i>
<i>Pm2</i> CHAMA	06/2013	D	ECBU	ASSuTTm	SGI1- <i>Pm2</i> CHAMA (complet)	<i>qacH, aadA1, qac/sul1, dfrA15, strA, strB, bla_{CARB-4}</i>
<i>Pm145</i> VERGE	01/2015	D	Os orteil	ASuT	SGI complet (non séquencé)	ND****
<i>Pm180</i> MORPH	03/2015	D	ECBU	CiKToGSSuT Tm	SGI complet (non séquencé)	ND****
<i>Pm313</i> LEBMA	10/2015	D	Hémoculture	AnCiGKToSp SuTTm	SGI complet (non séquencé)	ND****
<i>Pm1</i> LENAR	06/2013	D	Coproculture	ACtxCiKST Tm	SGI0 (complet)	aucun
<i>Pm14</i> -ABB	02/2012	D	Coproculture	AnCi GKSTo SuTTm	SGI1-K8 (ex-SGI1- <i>Pm</i> ABB) (incomplet)	<i>aacCA5, aadA7, qac/sul1</i>
<i>Pm</i> MAT	08/2011	D	Os escarre sacré	An GSSuTTm	SGI1-K8 (incomplet)	<i>aacCA5, aadA7, qac/sul1</i>

- * D : Dijon ; L : Lariboisière (Paris)
- ** ECBU : examen cyto-bactériologique des urines
- *** Molécules inactives (en rouge : résistance liée aux gènes présents sur la région MDR) : A : amino-pénicilline ; Ctx : céfotaxime ; C : chloramphénicol ; An : acide nalidixique ; Ci : ciprofloxacine ; K : kanamycine ; G : gentamicine ; S : streptomycine/spectinomycine ; Sp : spectinomycine (uniquement) ; To : tobramycine ; Su : sulfamides ; T : tétracyclines ; Tm : triméthoprime
- **** Gènes de résistance présents sur la région MDR non déterminés

2. Structures détectées

Parmi les 25 souches de *P. mirabilis* avec îlot isolées au CHU de Dijon, 8 (32%) avaient un SGI1 complet, 7 (28%) un SGI1 incomplet (délétion entre S005 et S009) et 10 (40%) un PGI1. Parmi les 5 souches de Lariboisière avec îlot, 3 avaient un SGI1 incomplet et 2 avaient un PGI1 (Tableau n°5).

Parmi ces 30 îlots, 26 ont été séquencés (22 îlots de Dijon et 4 îlots de Lariboisière) dont 23 ont été assemblés. Les îlots des souches *Pm5TRIRE*, *Pm287BENFA* et *Pm302THIJO* ont été séquencés mais n'ont pas encore été assemblés. Pour les îlots des souches *Pm65JULLA* et *Pm95LEBLU*, le squelette a été complètement assemblé et la région MDR est en cours d'assemblage.

L'îlot de résistance était inséré au niveau du site spécifique (en 3' du gène *trmE*) du chromosome des 23 souches assemblées.

Sur les 21 îlots complètement assemblés, il a été détecté 8 nouveaux variants de la région MDR et 4 nouvelles structures du squelette.

Parmi les 4 îlots SGI1 complets, nous avons détecté 4 structures :

- un variant SGI1-A, présentant une délétion de 279 pb dans l'ISCR3 (*Pm4CHASY*)
- un variant SGI1-C (*PmBRI*)(Siebor and Neuwirth 2013)
- un nouveau variant, appelé SGI1-*Pm2CHAMA* (article n°1 soumis)
- un îlot présentant de nombreuses modifications du squelette et sans région MDR (SGI1-*Pm1LENAR*, appelé SGI0)

Parmi les 9 îlots SGI1 incomplets, nous avons détecté 6 structures :

- un variant SGI1-H présent dans les souches *Pm3BAUCH* et *PmSCO* (Siebor and Neuwirth 2013)

Tableau 5 (suite): Souches de *P. mirabilis* avec îlot de résistance et caractéristiques de leur îlot

Souche	Date isolement	Lieu*	Prélèvement **	Phénotype***	Type d'îlot	Gènes de résistance dans la région MDR
<i>Pm24</i> CHAMA	03/2014	D	ECBU	CAnCi GSSuT Tm	SGII-K8 (incomplet)	<i>aacCA5, aadA7, qac/sul1</i>
<i>Pm</i> SCO	10/2011	D	ECBU	ACAnCiGSSuT Tm	SGII-H (incomplet)	<i>aacCA5, aadA7, qac/sul1, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}</i>
<i>Pm3</i> BAUCH	08/2013	D	Os métatarse	ACAnCiGSSuT Tm	SGII-H (incomplet)	<i>aacCA5, aadA7, qac/sul1, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}</i>
<i>Pm</i> GUE	01/2012	D	ECBU	ACAnCiKGS SuTTm	SGII-K1 (incomplet)	<i>aacCA5, aadA7, qac/sul1, tetA(G), merA, strB, strA, bla_{TEM-1}</i>
<i>Pm37</i> THOMI	01/2014	D	ECBU	ACtxAnCiGS ToSuTTm	SGII-K7 (incomplet)	<i>strAΔ, strB, tetA(A), merA, aadA7, aacCA5, qac/sul1, bla_{TEM-1}, aacC2, tmrB, bla_{CTX-M-15}</i>
<i>Pm144</i> BOUSA	01/2015	D	Coproculture	AAnKSSuT Tm	SGII-L3 (incomplet)	<i>bla_{TEM-1}, qac/sul1, dfrA15</i>
<i>Pm294</i> MATLI	09/2015	L	Pus superficiel	ACGKSSuT Tm	SGII-L4 (incomplet)	<i>aacCA5, aadA7, qac/sul1, tetA(A), merA, strB, strA, bla_{PSE-1}, tetA(G), floR, dfrA15, aphA1, bla_{TEM-1}</i>
<i>Pm286</i> TALSP	06/2015	L	Pus superficiel	AAnGSToSuT Tm	SGI incomplet (non séquencé)	ND****
<i>Pm302</i> THIJO	09/2015	L	ECBU	AAnCiGSpSu T	SGI incomplet (non assemblé)	ND****
<i>Pm</i> CHA	03/2012	D	Pus superficiel	AKGSToSuT	PGII	<i>aadB, aadA2, qac/sul1, bla_{TEM-135}, aphA1b, aadA1, merA, strA, strB, tetA(A)</i>
<i>Pm</i> CHE	07/2012	D	ECBU	AKGSToSuT	PGII	<i>aadB, aadA2, qac/sul1, bla_{TEM-135}, aadA1, merA, strA, strB,, tetA(A)</i>
<i>Pm7</i> THIRO	01/2014	D	ECBU	ACAnCiKGS ToSuTTm	PGII	<i>aadB, aadA3, qac/sul1, bla_{TEM-135}, aphA1b, aadA1, merA, strA, strB, tetA(A)</i>
<i>Pm257</i> CISEL	09/2015	D	Coproculture	AKGTSSuT	PGII- <i>Pm257</i> CISEL	<i>aadB, aadA3, qac/sul1, bla_{TEM-135}</i>
<i>Pm</i> ESC	07/2013	D	CIP	CKGSToSuT	PGII- <i>Pm</i> ESC	<i>aadB, aadA3, qac/sul1, merA</i>

Souche	Date isolement	Lieu*	Prélèvement **	Phénotype***	Type d'îlot	Gènes de résistance dans la région MDR
<i>Pm6</i> MARLU	12/2013	D	Pus superficiel	AKGSToSuT	PGI1- <i>PmESC</i>	<i>aadB, aadA3, qac/sul1, merA</i>
<i>Pm160</i> BOUGU	02/2015	D	ECBU	AAAnKGSToSuT	PGI1- <i>PmESC</i>	<i>aadB, aadA3, qac/sul1, merA</i>
<i>Pm288</i> BREMA	07/2015	L	ECBU	ACKGSToSuT	PGI1- <i>PmESC</i>	<i>aadB, aadA3, qac/sul1, merA</i>
<i>Pm65</i> JULLA	06/2014	D	ECBU	ACAnKGSToSuTTm	PGI1 (squelette assemblé)	<i>aadB, aadA3, qac/sul1</i> (en cours d'assemblage)
<i>Pm95</i> LEBLU	08/2014	D	ECBU	ACAnCiKGSToSuTTm	PGI1 (squelette assemblé)	<i>aadB, aadA3, qac/sul1, bla_{TEM-135}, aphA1b, aadA1, merA, strB, strA, tetA(A)</i> (en cours d'assemblage)
<i>Pm5</i> TRIRE	11/2013	D	ECBU	ACAnCiGSToSuTTm	PGI1 (non assemblé)	ND****
<i>Pm287</i> BENFA	07/2015	L	ECBU	AKGSToSuTm	PGI1 (non assemblé)	ND****

- * D : Dijon ; L : Lariboisière (Paris)
- ** ECBU : examen cyto-bactériologique des urines
- *** Molécules inactives (en rouge : résistance liée aux gènes présents sur la région MDR) : A : amino-pénicilline ; Ctx : céfotaxime ; C : chloramphénicol ; An : acide nalidixique ; Ci : ciprofloxacine ; K : kanamycine ; G : gentamicine ; S : streptomycine/spectinomycine ; Sp : spectinomycine (uniquement) ; To : tobramycine ; Su : sulfamides ; T : tétracyclines ; Tm : triméthoprime
- **** Gènes de résistance présents sur la région MDR non déterminés

1^{ère} étude : épidémiologie et structure des îlots chez P. mirabilis

- un variant SGI1-K1 présent dans la souche *PmGUE* (Siebor and Neuwirth 2013)
- deux nouveaux variants de SGI1-K :

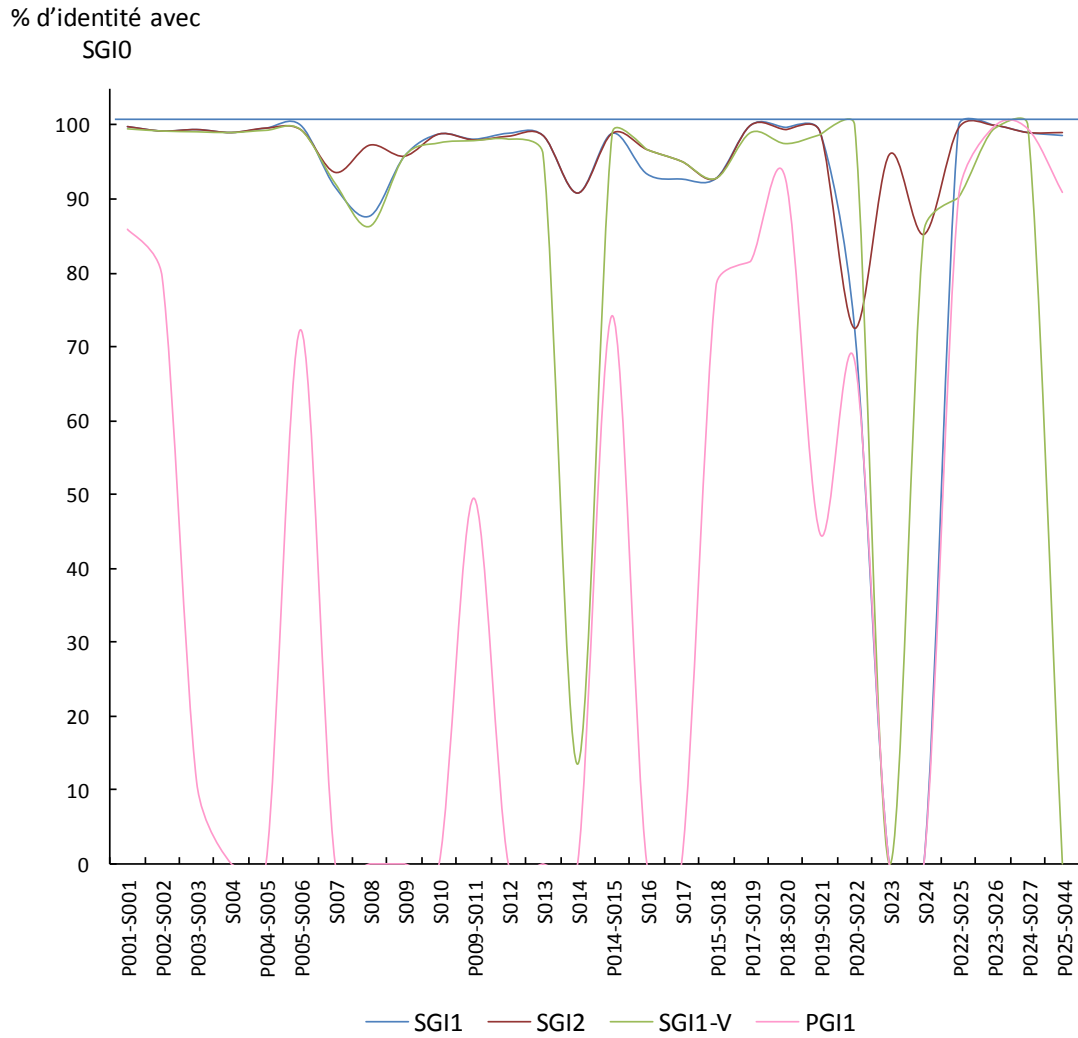


Figure 38 : Comparaison des ORFs du squelette SGI0 (% d'identité en acides aminés) avec les squelettes de SGI1, SGI2, SGI1-V et PGI1.

a. Etude des squelettes des îlots de résistance

i. *Les 4 structures présentant des modifications dans le squelette*

Parmi les îlots de résistance assemblés, quatre îlots avaient un squelette qui différait de ceux précédemment décrits.

- *Variants du squelette SGI1*

Le squelette de SGI1-*Pm2CHAMA* partageait 99% d'identité en acides nucléiques avec celui de SGI1. Il présentait 41 nucléotides différents et 20 substitutions en acides aminés. Une délétion de 175 pb était observée entre la partie 3' de la région MDR et l'ORF S044 et responsable de la perte de 34 pb de S044.

- *Les 2 variants du squelette SGI1-K*

- L'îlot de *PmMAT* était un SGI1 incomplet (délétion entre S005 et S009) qui avait la particularité de ne pas posséder d'*IS1359* (Siebor and Neuwirth 2013).
- L'îlot de *Pm294MATLI* présentait une délétion plus large entre S005 et S013 tout en conservant l'insertion de la séquence *IS1359*.

- *Squelette de l'îlot de Pm1LENAR*

Le squelette de l'îlot de *Pm1LENAR* ne présentait que 85% d'identité en acides nucléiques avec SGI1. Les séquences protéiques de S014, S021 et S024 étaient allongées respectivement de 21, 42 et 1 acides aminés (mutations au niveau du codon stop). De plus, S017, S018 et S023 étaient délétées respectivement de 43, 22 et 2 acides aminés (mutations non-sens).

L'alignement des séquences d'acides aminés de ses ORFs avec celles de SGI1, SGI2, SGI1-V et PGI1 montre que seules S019 et S026 présentaient 100% d'identité en acides aminés avec celles de SGI1 et de SGI2, que S006 était identique à celle de SGI1 et que S022

et S027 étaient identiques à celles de SGI1-V (Figure 38). Certaines ORFs semblent très conservées au sein de tous les îlots. En effet, S020 (ou P018), S025 (ou P022), S026 (ou P023) et S027 (ou P024) avaient des pourcentages d'identité > 90%. Ces ORFs ont vraisemblablement un rôle essentiel. La fonction de l'ORF S020 (ou P018) n'est à ce jour pas connue. Elle présente des homologies avec une intégrase de phage de la famille des tyrosine-recombinases. Les ORFs S025 et S026 codent pour le système toxine / anti-toxine qui permet la stabilité de l'îlot de résistance dans la bactérie, notamment en présence d'un plasmide IncA/C (Huguet et al. 2016). Bien qu'il existe un variant SGI-Z délété d'une partie de S025 et de S026, les îlots de résistance sans ce système sont probablement moins stables dans le temps (Lei et al. 2015). Enfin, S027 (ou P024) correspond à la résolvasse qui permet d'intégrer la région MDR.

L'îlot de *Pm1LENAR* n'avait pas de région MDR mais possédait une résolvasse (S027) 100% identique à celle de SGI1-V. De ce fait, on peut supposer que l'îlot de *Pm1LENAR* serait capable lui aussi d'intégrer une région MDR. Un îlot sans région MDR a déjà été décrit dans une souche de *P. mirabilis* isolée chez un chien vivant dans les Pyrénées-Orientales (Schultz et al. 2015). Les deux seules ORFs partiellement séquencées dans l'étude (S008 et S011) étaient identiques à celles de l'îlot de *Pm1LENAR*.

Du fait de ces différences, l'îlot de *Pm1LENAR* pourrait alors être considéré comme un îlot dérivé de SGI1. En raison de l'absence de région MDR, nous proposons de le nommer SGI0.

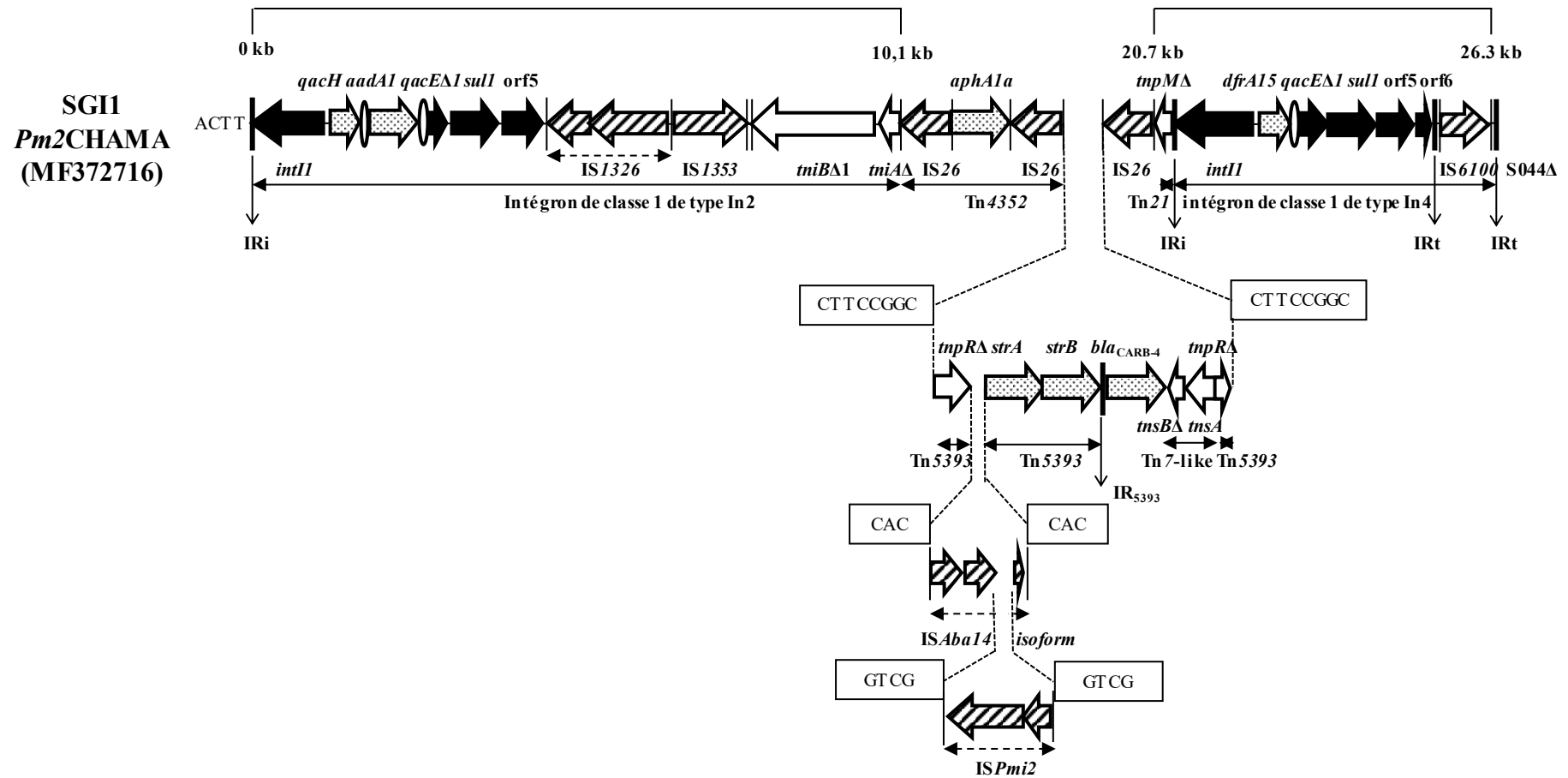


Figure 39 : Région MDR de SGI1-*Pm2CHAMA*.

Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes et des ORFs. Les flèches noires représentent les régions conservées 5'-CS et 3'-CS des intégrons. Les séquences inversées et répétées (IR) des intégrons et des transposons sont indiquées par les barres fines verticales. Les gènes de résistance sont illustrés par les flèches avec des points et les formes ovales représentent les sites *attC*. Les séquences d'insertion sont figurées par les flèches hachurées. Les DR (direct repeat) sont encadrées.

b. Nouveaux variants de la région MDR

i. *SGI1-Pm2CHAMA*

La région MDR (26,3 kb) de *SGI1-Pm2CHAMA* était constituée de deux intégrons de classe 1 : un intégron de type In2 et un autre de type In4 (Figure 39). C'est la première description d'un intégron de type In2 et d'un gène *qacH* dans un îlot de résistance. La présence du gène *qacH*, codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires permettrait à *Pm2CHAMA* de survivre dans l'environnement hospitalier. Le deuxième intégron de classe 1 de type In4 possédait une cassette *dfrA15*. Ces deux intégrons étaient séparés par une région fortement remaniée de 10,6 kb encadrée par deux IS26. Cette région a été qualifiée de « zoo de transposons » par Michael Chandler.

Cette région était constituée d'un transposon Tn4352 avec un gène *aphA1a*, d'une partie du transposon Tn5393 qui était interrompu par l'insertion d'une isoforme de IS*Aba14* [94% d'identité avec IS*Aba14* CP001921]. IS*Aba14* a déjà été décrit chez *PGI1-PmPEL* (Girlich et al. 2015). Celle-ci était elle-même interrompue par la nouvelle IS*Pmi2* de la famille des IS3. L'insertion de ces deux IS résulte de phénomènes de transposition comme en atteste les duplications de cible (CAC pour IS*Aba14* et GTCG pour IS*Pmi2*). Elle contenait aussi un gène *bla_{CARB-4}* dont les 9 premières pb de la cassette et les 119 pb du site *attC* étaient absents. Un dérivé de Tn7 contenant une partie de *tnsB* et une partie de *tnsA* [(90% d'identité avec Tn7 (DQ176869)] était présent.

La présence de trois IS26 dans la même orientation suggère que cette région a été générée par des mouvements d'IS26. Ainsi, un co-intégrat se serait formé entre une IS26 présente entre les 2 intégrons de cette région du MDR et une autre IS26 appartenant à un autre élément génétique permettant l'intégration de cette structure par transposition conservative (événement le plus fréquent) (Harmer, Moran, and Hall 2014). Les DR de 8 pb (CTTCCGGC)

identifiées à l'intérieur de cette structure étaient sans doute présentes avant la transposition. Quant au Tn4352, il se serait formé par l'incorporation d'une TU (IS26 associée à un gène *aphA1a*) à côté d'une IS26 pré-existante et située entre les deux intégrons. Cette incorporation de la TU est probablement due à une transposition conservative sans génération de DR (DR absentes) (Harmer and Hall 2016).

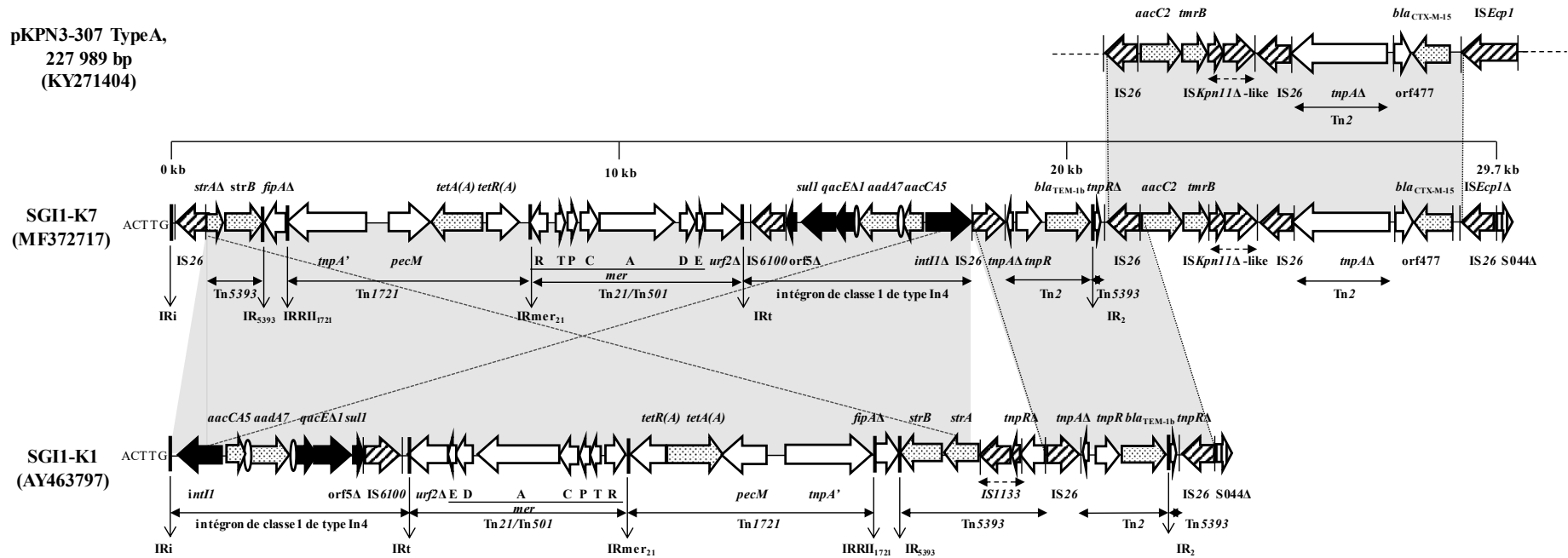


Figure 40 : Structure de la région MDR de SGI1-K7.

Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes et des ORFs. Les flèches noires représentent les régions conservées 5'-CS et 3'-CS des intégrons. Les séquences inversées et répétées (IR) des intégrons et des transposons sont indiquées par les barres fines verticales. Les gènes de résistance sont illustrés par les flèches avec des points et les formes ovales représentent les sites *attC*. Les séquences d'insertion sont figurées par les flèches hachurées en biais. Les flèches hachurées verticalement représentent les ORFs du squelette.

ii. SGI1-K7

La souche *Pm37THOMI* possédait un îlot qui avait une région MDR (29,7 kb) dérivée de celle de SGI1-K et a été appelée SGI1-K7 (Figure 40). Cette région MDR aurait subi deux remaniements.

Le premier événement serait une inversion de la région entre *intI1* de l'intégron contenant *aacCA5-aadA7* et le gène *strA* du transposon Tn5393. Cette inversion résulterait d'une transposition répllicative intramoléculaire en *trans* à partir de l'IS26 adjacente au transposon Tn5393 générant une duplication de l'IS26 (orientée en sens inverse par rapport à la première IS26) et probablement des duplications de cible comme précédemment décrit par He *et al.* (He *et al.* 2015). Dans notre structure, les duplications de cible étaient absentes vraisemblablement déléetées. En effet, il a été rapporté que ces transpositions répliquatives étaient souvent associées à des délétions (He *et al.* 2015). Cette délétion aurait aussi entraîné la perte d'une partie du transposon Tn5393 (partie du gène *strA*, *IS1133* et *tnpR*) et du gène *intI1*.

Le deuxième événement serait l'insertion d'une structure déjà décrite sur des plasmides présents dans des clones multirésistants et prévalents comme *E. coli* ST131 (pEK516) ou *K. pneumoniae* ST307 (pKPN3-307 type B) (Villa *et al.* 2017 ; Woodford *et al.* 2009). Cette structure contenait les gènes de résistance *aacC2* et *tmrB* (résistance à la tunicamycine) associés à une séquence d'insertion partielle dérivée de *ISKpn11* appartenant à la famille des IS3 [86% d'identité avec *ISKpn11* (EU780013)]. Elle portait aussi le gène de résistance *bla_{CTX-M-15}* associé à un résidu de *ISEcp1* (209 pb). Cet environnement génétique de *bla_{CTX-M-15}* a déjà été décrit (Dhanji *et al.* 2011).

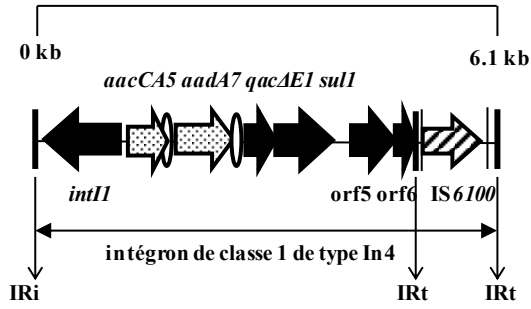


Figure 41 : Structure de la région MDR de SGI1-K8*

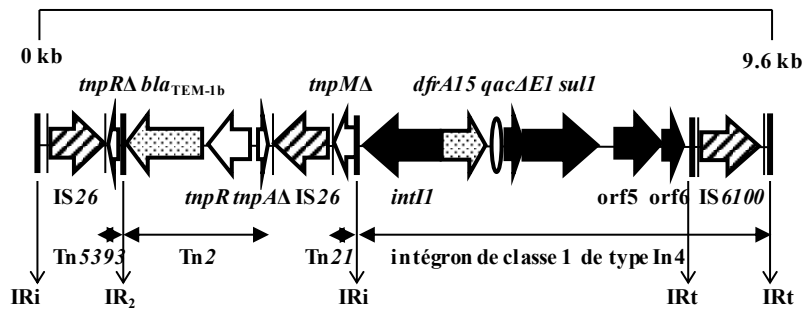


Figure 42 : Structure de la région MDR de SGI1-L3*

iii. SGI1-K8

Enfin, les îlots des souches *Pm*-ABB, *Pm*MAT étaient identiques et dérivait de SGI1-K (Figure 41) (Siebor and Neuwirth 2013). En effet, ils possédaient le même intégron de classe 1 de type In4 que SGI1-K1 mais étaient délévés du module *mer* de Tn21, des parties de transposons Tn1721 et Tn5393 et ne possédaient pas d'IS26. La région MDR avait une taille de 6,1 kb. Anciennement appelés SGI1-*Pm*ABB, ils ont été renommés SGI1-K8. L'îlot de la souche *Pm*24CHAMA était proche mais se différençiait par la présence d'une délétion de 38 pb dans la séquence non codante entre l'ORF6 et l'IS6100.

iv. SGI1-L3

La souche *Pm*144BOUSA serait un dérivé de SGI1-L (Figure 42). Sa région MDR (9,6 kb) était constituée d'un intégron de classe 1 type In4 avec la cassette *df*rA15. Il aurait ainsi perdu sa partie centrale par recombinaison homologue entre les régions 3'CS de l'intégron complexe. Une structure était présente en amont de cet intégron. Cette structure constituée d'un transposon composite d'IS26 avec une partie du gène *tnpR* de Tn5393, une partie de Tn2 et une partie de Tn21 a déjà été décrite dans SGI1-K. Aucune DR n'encadrait ces IS26.

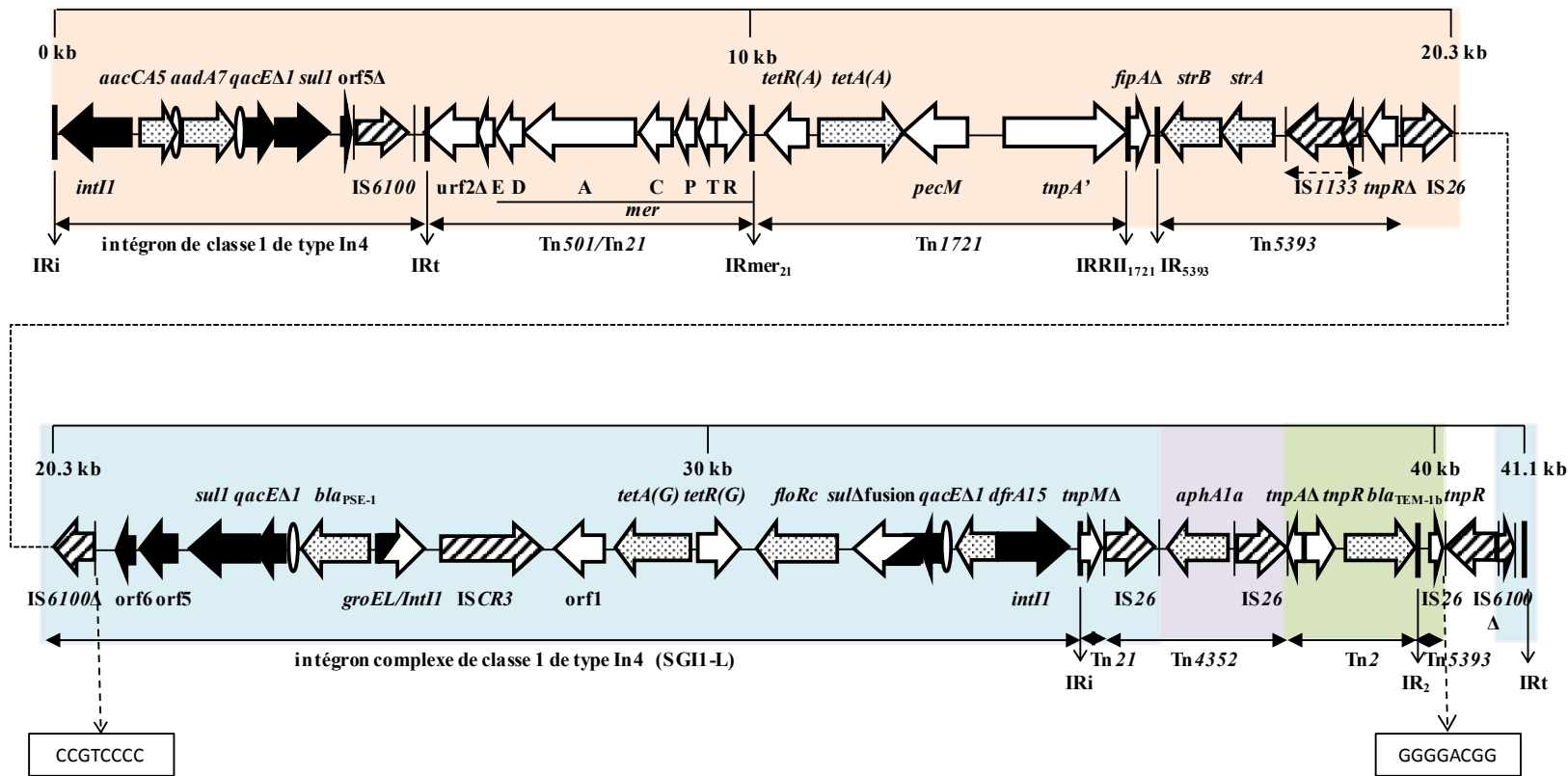


Figure 43 : Structure de la région MDR de SG11-L4.

Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes et des ORFs. Les flèches noires représentent les régions conservées 5'-CS et 3'-CS des intégrons. Les séquences inversées et répétées (IR) des intégrons et des transposons sont indiquées par les barres fines verticales. Les gènes de résistance sont illustrés par les flèches avec des points et les formes ovales représentent les sites *attC*. Les séquences d'insertion sont figurées par les flèches hachurées en biais. Les régions en orange correspondent à la région MDR du variant SG11-K1 et les régions en bleu à celles correspondant à la région MDR du variant SG11-L. La région violette correspond à une TU. La région en vert kaki représente le transposon composite d'IS26 commune à SG11-K et SG11-L3. L'IS26 non colorée représente l'IS26 générée au cours de la transposition répliquative. Les DR (direct repeat) sont encadrées

v. **SGI1-L4**

La souche *Pm294MATLI* possédait un nouveau variant SGI1-L avec les 2 régions MDR de SGI1-K et de SGI1-L combinées en une seule région MDR de 41,1 kb (Figure 43) (Levings et al. 2007; Hamidian, Holt, and Hall 2015a; Cloeckert et al. 2006; Ahmed, Hussein, and Shimamoto 2007). La première partie de sa région MDR (de *intI1* à l'IS26 adjacente au gène *tnpR* du transposon Tn5393) était identique à celle de SGI1-K1. La deuxième partie de la région MDR était constituée du même intégron complexe de classe 1 que SGI1-L associé à un Tn4352 et deux transposons partiels Tn2 et Tn5393. Cet ensemble orienté en sens inverse a été décrit précédemment dans SGI1-L3 (à l'exception de Tn4352). Cette inversion résulterait d'une transposition répllicative intramoléculaire en *trans* de l'IS26 (située à côté gène *tnpR* du transposon Tn5393) au sein de l'IS6100. En effet, la présence d'une deuxième IS26 et de DR de 8 pb en sens inverse adjacentes à l'IS6100 scindée en 2 en est le marqueur (He et al. 2015). Le transposon Tn4352 aurait été généré par incorporation d'une TU (gène *aphA1* associé à une IS26) par transposition conservative (IS26 non encadrées par des DR) (Harmer and Hall 2016).

Les variants SGI1-L3 et -L4 montrent à quel point les régions MDR de SGI1-K et SGI1-L sont liées et pourraient être issues d'une seule et unique région MDR qui aurait été scindée en deux régions MDR par des IS26 dans des localisations différentes. L'étude des variants SGI1-L3 et -L4 mais aussi des variants SGI1-K7 et SGI1-*Pm2CHAMA* mettent en évidence le rôle majeur des IS26 dans le remaniement des régions MDR et dans l'apport de gènes de résistance provenant notamment de structures plasmidiques.

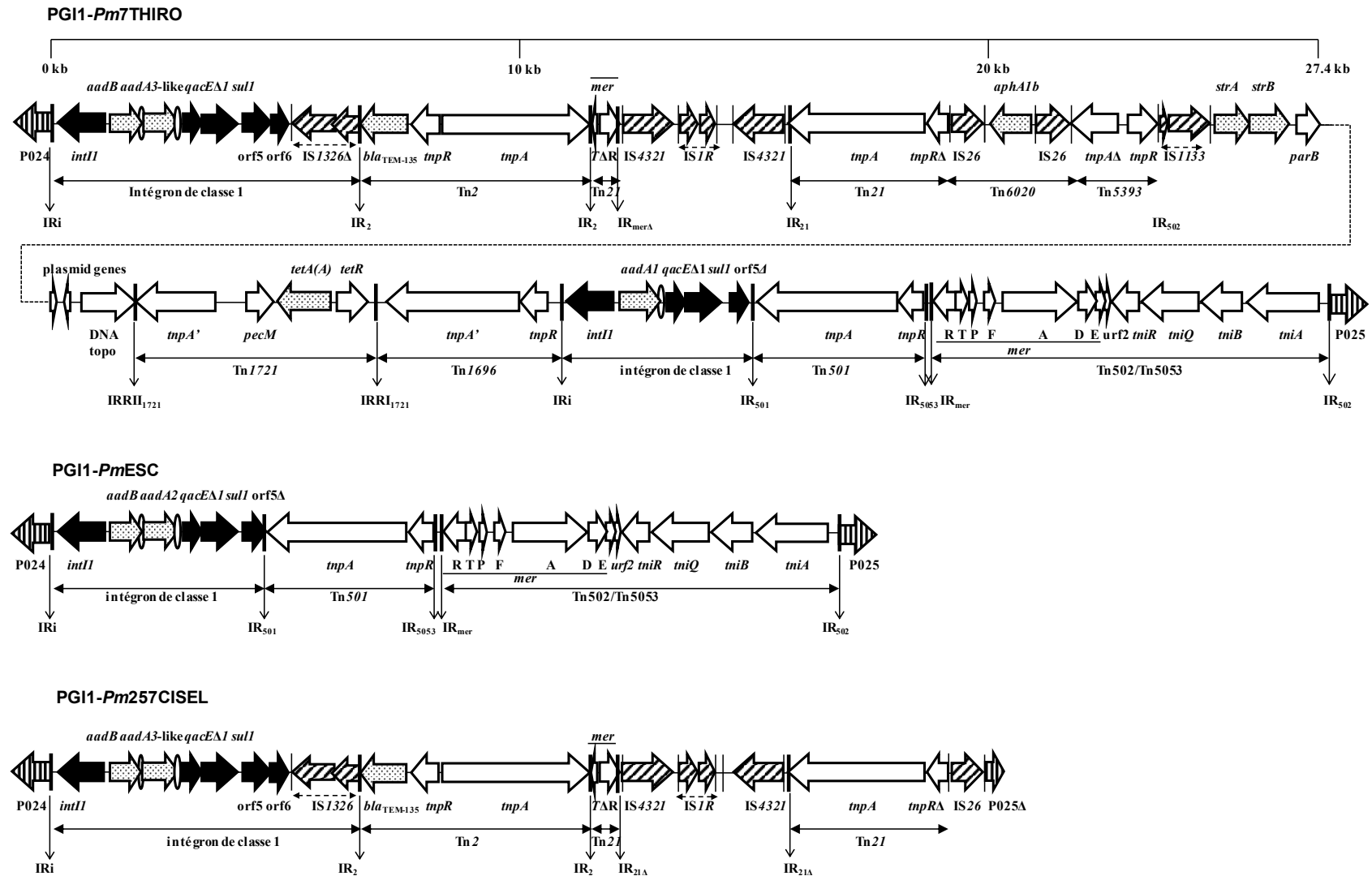


Figure 44 : Nouveaux variants de la région MDR de PGI1*

vi. *Nouveaux variants de PGI1*

- *Région MDR de PGI1 non scindée*

Cette région MDR (54,4 kb) présente chez la souche *Pm7THIRO* était très proche de celle de *PmCHA* qui était scindée en deux parties (Figure 31) (Siebor and Neuwirth 2014). Chez *Pm7THIRO*, cette région n'était pas scindée en deux (Figure 44). De plus, l'intégron de type In5 portait l'ensemble de cassettes *aadB- aadA3-like* à la place de la cassette *aadB-aadA2*. La nucléotidyltransférase (*AadA3-like*) présentait deux substitutions d'acides aminés (V3T et I250V) par rapport à celle déjà décrite (*AadA3*). A noter que cet intégron possédait une intégrase non fonctionnelle (codon stop dans *intI1*). Le même intégron a aussi été détecté dans les régions MDR de *Pm65JULLA* et *Pm95LEBLU* mais possédait une intégrase fonctionnelle.

- *Les deux régions MDR de PGI1 avec délétion*

- Variant PGI1-*PmESC* :

Les autres souches *PmESC*, *Pm6MARLU*, *Pm160BOUGU* et *Pm288BREMA* avaient un îlot appelé PGI1-*PmESC*. La région MDR (16,8 kb) aurait subi une délétion de la partie centrale. Ainsi, il ne possédait plus qu'une partie de l'intégron de classe 1 de type In5 avec l'ensemble *aadB-aadA2*, *tnpA* de Tn501 et le module *mer* hybride de Tn502/Tn5053 (Figure 45) (Siebor et al. 2016).

- Variant PGI1-*Pm257CISEL*

La souche *Pm257CISEL* possédait un îlot appelé PGI1-*Pm257CISEL*. Sa région MDR (19,9 kb) aurait aussi subi une délétion (Figure 44). En effet, il avait perdu la 2^{ème} partie de la région MDR de PGI1 en aval de la première IS26. Cette délétion a aussi provoqué la perte d'une partie de P025 (203 pb).

Les différentes régions MDR des PGI1 décrites dans cette étude sont assez proches. Elles présentent des homologies avec celles décrites chez les variants SGI1-K : présence dans les deux types de structures d'un module *mer* et des transposons Tn5393, Tn1721. La majorité des PGI1 possédaient un intégron de type In5 partiel. Il est possible que cet intégron partiel soit en fait un intégron de type In2 délété (intégron In2 présent dans l'îlot SGI1-*Pm2CHAMA*).

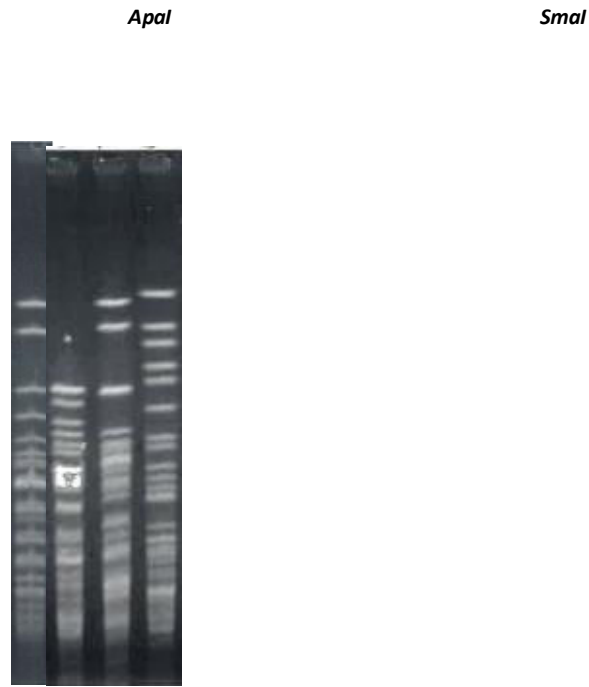


Figure 45 : Profils génotypiques en électrophorèse en champ pulsé des souches avec une structure SGI1 complet.

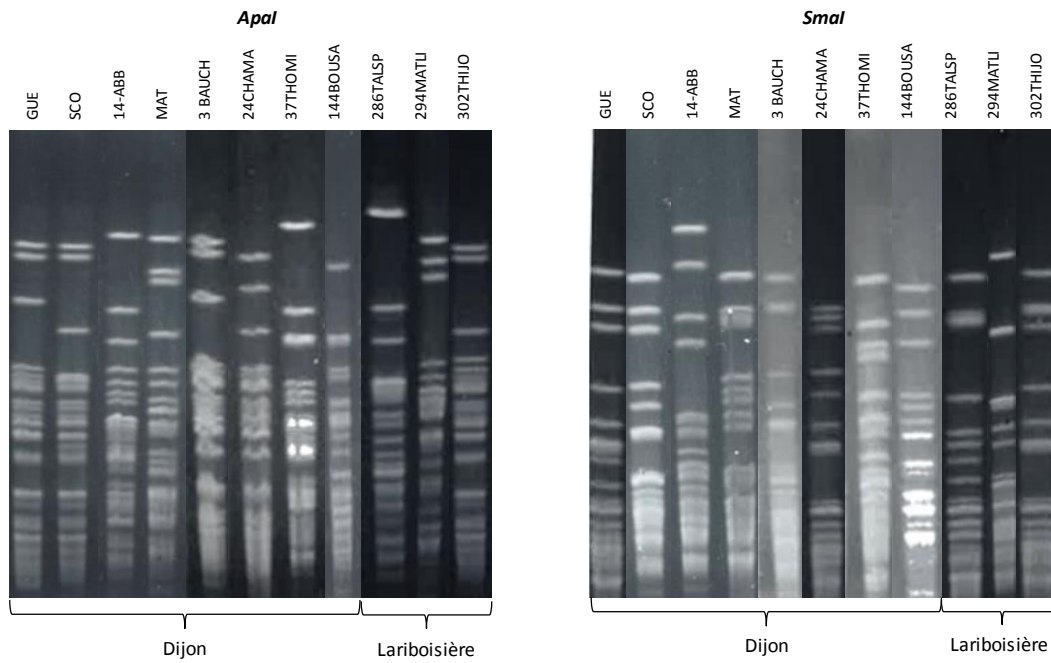


Figure 46 : Profil génotypique en électrophorèse en champ pulsé des souches avec une structure SGI1 incomplet.

c. Etude génotypique des souches de *P. mirabilis*

i. *Souches avec SGI1 complet :*

Les souches avec un îlot SGI1 complet avaient toutes un profil génotypique différent quel que soit l'enzyme de restriction utilisée (Figure 45).

ii. *Souches avec SGI1 incomplet :*

Pour les souches avec un îlot SGI1 incomplet, il était aussi observé une diversité de profils génotypiques. Cependant, les souches *PmGUE*, *PmSCO*, *Pm3BAUCH* et *Pm302THIJO* avaient un profil très proche (moins de 3 bandes différentes) avec l'enzyme de restriction *ApaI* (Figure 46). Cette similitude a été confirmée avec l'enzyme de restriction *SmaI* pour *PmGUE*, *PmSCO* et *Pm302THIJO*. Ces 3 souches étaient donc génotypiquement reliées. Par contre, la souche *Pm3BAUCH* avait un profil différent après restriction avec l'enzyme *SmaI*. Il n'est pas surprenant d'observer un lien de clonalité entre *PmGUE* et *PmSCO* qui ont été isolées à Dijon entre octobre 2011 et janvier 2012. Cependant les souches ne possédaient pas le même îlot (SGI1-H et SGI1-K1 respectivement). En revanche, *Pm302THIJO* a été isolée à Lariboisière en septembre 2015. Il serait intéressant de confirmer ce lien avec les souches dijonnaises par une étude génotypique plus approfondie. Il est important d'utiliser deux enzymes de restriction (*ApaI* et *SmaI*). En effet, l'enzyme *SmaI* ne permettait pas de différencier les souches *Pm302THIJO* et *Pm24CHAMA* (différenciées par *ApaI*) et *ApaI* ne permettait pas de différencier les souches *Pm37THOMI* et *Pm14-ABB* (différenciées par *SmaI*). Les autres souches avaient des profils différents quel que soit l'enzyme utilisée.

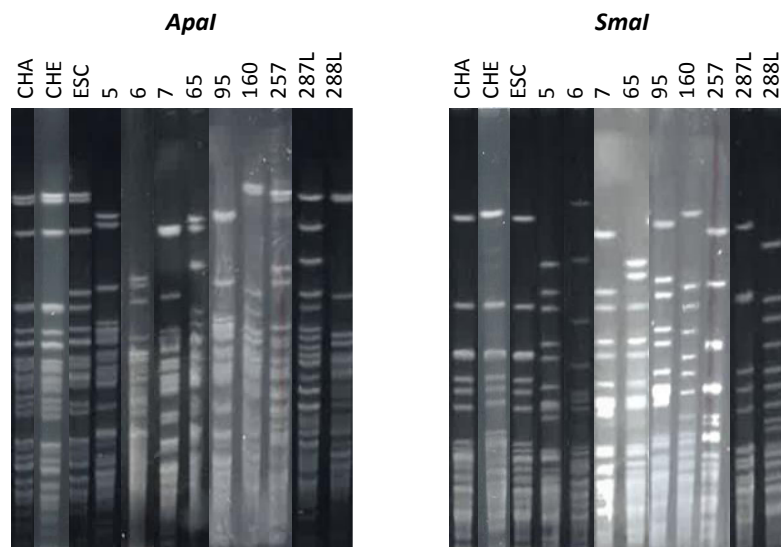


Figure 47 : Profil génotypique en électrophorèse en champ pulsé des souches avec une structure PGI1

iii. Souches avec PGI1 :

Pour les souches avec un îlot de type PGI1, il était observé 3 groupes de souches présentant des profils proches avec les deux enzymes de restriction (Figure 47). Premièrement, les souches *PmCHA*, *PmCHE* et *PmESC* ont été respectivement isolées en mars, juillet 2012 et en juillet 2013 au CHU de Dijon. *PmCHA* et *PmCHE* possédaient un PGI1 très proche alors que *PmESC* avait un PGI1-*PmESC*. Il est possible que les souches *PmCHA* ou *PmCHE* aient subi un remaniement de leur îlot (délétion). Le deuxième groupe comprenait les souches *Pm5TRIRE*, *Pm7THIRO*, *Pm65JULLA* et *Pm95LEBLU* qui avaient aussi un profil proche. Ces quatre souches avaient été respectivement isolées au CHU de Dijon en novembre 2013, en janvier, juin et novembre 2014. Toutes possédaient un PGI1 et ces 4 souches avaient le même phénotype de résistance (ACAnCiKGSToSUTm), à l'exception de *Pm65JULLA* qui était sensible à la ciprofloxacine. Le troisième groupe était constitué des souches *Pm160BOUGU* et *Pm288BREMA*. Ces deux souches qui possédaient un PGI1-*PmESC* ont été respectivement isolées à Dijon et à Lariboisière et pourraient avoir un lien de clonalité. Cependant, elles n'ont pas tout à fait le même profil de résistance. En effet, en plus du phénotype de résistance (AKGSToSUT), *Pm160BOUGU* était résistante à l'amikacine et la souche *Pm288BREMA* était résistante au chloramphénicol. Les trois autres souches avec PGI1 (*Pm6MARLU*, *Pm257CISEL*, *Pm287BENFA*) avaient des profils différents de ces 3 groupes.

De manière générale dans cette étude, il existe une grande diversité génotypique au sein de ces souches de *P. mirabilis* porteuses d'îlot de résistance. Un même variant SGI1 ou PGI1 dans des souches de profil différent. Par exemple, les souches *PmMAT*, *Pm14-ABB* et *Pm24CHAMA* possédaient le même variant SGI1-K8. La même remarque s'applique pour les souches *PmESC*, *Pm6MARLU*, *Pm160BOUGU* et *Pm288BREMA* qui possédaient un PGI1-*PmESC*. Par ailleurs, il est aussi observé que des souches présentant un profil génotypique

proche ne possédaient pas le même îlot [ex : *PmGUE* (SGI1-H) et *PmSCO* (SGI1-K1)]. Ces observations confirment l'importance du transfert horizontal de ces îlots de type SGI1 ou PGI1 précédemment évoqué dans une étude française (Schultz et al. 2015). De même, dans cette étude, il semblerait que certaines souches isolées à Lariboisière aient le même profil génotypique que celles isolées à Dijon. Ces résultats corroborent les résultats de l'étude française qui suggère que certains clones porteurs d'îlot de résistance auraient tendance à se répandre (Schultz et al. 2015). Ces premiers résultats sur la clonalité des souches avec îlot de résistance doivent donc être confirmés par une analyse génotypique plus approfondie incluant un plus grand nombre de souches émanant d'origines géographiques variées.

D. Conclusion

Dans cette étude, la prévalence des îlots de résistance chez les souches de *P. mirabilis* ayant au moins une résistance acquise varie de 5% à 16% en fonction des deux hôpitaux étudiés. Ces souches de *P. mirabilis* porteuses d'un îlot sont isolées dans les mêmes sites anatomiques (essentiellement au niveau des urines) que celles sans îlot. Elles sont quasiment toujours résistantes à la spectinomycine (96,3%) et à la streptomycine (90%) et ne sont penta-résistantes (ACSSuT) que dans un tiers des cas. Ainsi ce phénotype de penta-résistance n'est pas un bon marqueur de la présence de l'îlot de résistance. Même si ces souches n'ont pas toutes le phénotype de penta-résistance, elles sont toutes multirésistantes à l'exception d'une souche uniquement résistante aux amino-pénicillines et aux sulfamides. Cette multirésistance est souvent liée à la présence de l'îlot de résistance mais pas uniquement. En effet, des souches possédaient peu de gènes de résistance sur l'îlot mais étaient tout de même multirésistantes. Il serait donc intéressant d'étudier dans ces souches la présence concomitante de plasmides. Cette multirésistance suggère une pression de sélection par les antibiotiques qui

aurait favorisé des échanges de gènes de résistance entre des plasmides et les îlots de résistance (Brewer et al. 2013). En effet, le séquençage de ces îlots a montré que leurs régions MDR résultaient de l'insertion de nombreux transposons et de structures déjà décrites sur des plasmides de bactéries de l'environnement comme *Shewanella spp.* mais aussi sur des plasmides multirésistants présents dans des clones d'entérobactéries répandus comme *E. coli* ST131 ou *K. pneumoniae* ST307 (Siebor and Neuwirth 2011; Woodford et al. 2009 ; Villa et al. 2017). L'étude des nouveaux variants SGI1-*Pm2*CHAMA, SGI1-K7, SGI1-L3 et SGI1-L4 a souligné le rôle majeur que jouaient les IS26 dans l'apport de transposons et dans les remaniements de la région MDR. De ces échanges résulte la présence de nouveaux gènes de résistance dans les îlots tels que *bla*_{CTX-M-15}, *qacH*, *aadA3*, *tmrB*. Cette étude confirme donc la grande plasticité de la région MDR des îlots de résistance et montre qu'elle peut être le support de nombreux gènes de résistance. La présence du gène *bla*_{CTX-M-15} mais aussi des gènes *bla*_{NDM-1}, *qnrA1*, *qnrB2* et *rmtC* est un tournant dans le rôle que peuvent jouer les îlots dans la résistance. Ces gènes de résistance peuvent alors être transmis de façon verticale et horizontale. Ainsi, les îlots de résistance peuvent être considérés comme une interface stable de dissémination des gènes de résistance.

Les profils génotypiques des souches de *P. mirabilis* porteuses de ces îlots sont très variés et soulignent l'importance de la transmission horizontale de ces îlots de résistance. Néanmoins, il semblerait que certains clones avec îlot se répandent comme se sont répandus les clones de *S. Typhimurium* DT104 et *S. Kentucky* ST198. Les îlots évoluent dans les souches par phénomène de délétion et d'insertion. Ainsi, l'étude de ces structures n'est qu'une photographie d'un instant « t », les îlots de résistance étant des interfaces dynamiques de la résistance susceptibles d'être transférées à d'autres entérobactéries (cf étude suivante).

Tableau 6 : Liste des souches d'entérobactéries porteuses d'un îlot utilisées pour les conjugaisons et leur phénotype de résistance.

Souches porteuses de l'îlot SGI1 (ou PGI1)	Phénotype de résistance ^a	Type de conjugaison (essai de mobilisation ou d'excision)
<i>S. Typhimurium</i> DT104 8BAZJU (SGI1)	AMX, PIP, CHL, SPT, STR, SUL, DOX , RIF	Mobilisation et excision
<i>S. Typhimurium</i> DT104 GOS (SGI1)	AMX, PIP, CAZ, CHL , NAL, CIP, KAN, TOB, GEN, SPT, STR, SUL , TMP, DOX , RIF	Mobilisation et excision
<i>P. mirabilis</i> PmSCO (SGI1-H) (SGI incomplet)	AMX, PIP, CHL , NAL, CIP, GEN, SPT, STR, SUL , TMP, SXT, DOX , CST	Mobilisation et excision
<i>P. mirabilis</i> Pm1LENAR (SGI0)	AMX, PIP, CAZ, KAN, SPT, STR, TMP, DOX, CST	Mobilisation et excision
<i>P. mirabilis</i> VB1248 (SGI1-V)	AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, CIP, AMK, KAN, TOB, GEN, SPT, STR, SUL, TMP, DOX, CST	Mobilisation
<i>P. mirabilis</i> ESC (PGI1-PmESC)	CHL, KAN, TOB, GEN, SPT, STR, SUL , DOX, CST,	Mobilisation
<i>P. mirabilis</i> 6 MARLU (PGI1-PmESC)	AMX, KAN, TOB, GEN, SPT, STR, SUL , DOX, CST	Excision

* Abréviations utilisées pour les molécules d'antibiotiques: AMX, amoxicilline; PIP, piperacilline; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; NAL, acide nalidixique; CIP, ciprofloxacine; AMK, amikacine; KAN, kanamycine; GEN, gentamicine; TOB, tobramycine; STR, streptomycine; SPT, spectinomycine; SUL, sulfamides; TMP, triméthoprim; DOX, doxycycline; CST, colistine; RIF, rifampicine. Antibiogramme réalisé et interprété selon les recommandations du CASFM.

^a Les résistances apportées par l'îlot de résistance de type SGI (ou PGI) sont en rouge.

V. Deuxième étude : mobilisation des îlots de résistance

A. Introduction

Il a été une fois démontré que SGI1 pouvait être transféré d'une souche de *S. enterica* à une souche d'*E. coli* lorsqu'un plasmide IncA/C était introduit dans la souche donatrice de l'îlot. Le transfert de SGI1 à d'autres entérobactéries n'a jamais été démontré et la mobilisation de PGI1 n'a pas été étudiée.

L'objectif de ce travail est d'étudier la mobilisation des îlots SGI1 et des îlots apparentés SGI1-H, SGI1-V, SGI0 et PGI1 par conjugaison avec des souches d'entérobactéries possédant un plasmide IncA/C porteur du gène de résistance *bla*_{TEM-24}. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressée à l'insertion des îlots SGI1 et PGI1 dans les entérobactéries porteuses de plasmides IncA/C (article n°2 en 2^{ème} auteur publié) et dans un second temps à leur excision (Siebor et al. 2016).

B. Matériels et méthodes

1. Souches utilisées

a. Souches porteuses de l'îlot SGI1 ou PGI1

Les souches utilisées sont deux souches de *S. Typhimurium* DT104 STGOS et ST8BAZJU avec SGI1, une souche de *P. mirabilis* PmSCO avec SGI1-H (SGI1 incomplet), une souche de *P. mirabilis* VB1248 avec SGI1-V, une souche de *P. mirabilis* Pm1LENAR avec SGI0, ainsi que deux souches de *P. mirabilis* PmESC et Pm6MARLU avec PGI1-PmESC. La liste et le

phénotype de résistance de ces souches sont récapitulés dans le tableau n°6. Des mutants résistants à la rifampicine des souches *STGOS* et *ST8BAZJU* ont été sélectionnés selon la méthode du gradient de Szybalski pour faciliter la sélection des transconjugants ayant acquis le plasmide IncA/C.

Tableau 7 : Liste des souches d'entérobactéries porteuses du plasmide IncA/C utilisées pour les conjugaisons et phénotype de résistance de ces souches

Souches porteuses du plasmide IncA/C	Phénotype de résistance ^{a, b}	Type de conjugaison (essai de mobilisation ou d'excision)
<i>C. freundii</i> 2954	AMX, PIP, CAZ, KAN, TOB, SPT, SUL, TMP, RIF	Mobilisation
<i>E. aerogenes</i> 409 ^b	AMX, PIP, CAZ, NAL, CIP, KAN, TOB, SUL, TMP, DOX, RIF	Mobilisation et excision
<i>E. cloacae</i> 646	AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, KAN, TOB, SUL, TMP, RIF	Mobilisation
<i>E. coli</i> 565	AMX, PIP, CAZ, CHL, AMK, KAN, STR, SPT, TOB, SUL, TMP, RIF	Mobilisation
<i>K. oxytoca</i> 603	AMX, PIP, CAZ, CHL, AMK, KAN, STR, SPT, TOB, SUL, TMP, RIF	Mobilisation
<i>K. pneumoniae</i> 568	AMX, PIP, CAZ, CHL, KAN, TOB, SPT, SUL, TMP, RIF	Mobilisation
<i>P. mirabilis</i> 709	AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, KAN, GEN, TOB, STR, SPT, SUL, TMP, DOX, CST, RIF	Mobilisation
<i>P. vulgaris</i> 835 ^b	AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, KAN, TOB, SPT STR, SUL, TMP, DOX, CST	Mobilisation et excision
<i>P. stuartii</i> 719	AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, CIP, KAN, GEN, TOB, STR, SPT, SUL, TMP, DOX, CST, RIF	Mobilisation
<i>S. marcescens</i> 1003	AMX, PIP, CAZ, NAL, CIP, AMK, KAN, TOB, STR, SPT, SUL, TMP, DOX, CST, RIF	Mobilisation
<i>E. coli</i> K-12 C600 (pA/C ₂) ^b	AMX, PIP, CAZ, AMK, KAN, TOB, SUL, TMP, RIF	Mobilisation et excision
<i>E. aerogenes</i> BOL (pA/C ₂) ^b	AMX, PIP, CAZ, CHL, KAN, TOB, SUL, TMP, RIF	Mobilisation et excision

^a Abréviations utilisées pour les molécules d'antibiotiques: AMX, amoxicilline; PIP, piperacilline; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; NAL, acide nalidixique; CIP, ciprofloxacine; AMK, amikacine; KAN, kanamycine; GEN, gentamicine; TOB, tobramycine; STR, streptomycine; SPT, spectinomycine; SUL, sulfamides; TMP, triméthoprim; DOX, doxycycline; CST, colistine; RIF, rifampicine. Antibiogramme réalisé et interprété selon les recommandations du CASFM.

^b Les résistances portées par les plasmides IncA/C de *E. aerogenes* 409 et de *P. vulgaris* 835 sont en vert.

b. Souches porteuses du plasmide IncA/C avec le gène *bla*_{TEM-24}

Une collection de 10 souches cliniques d'entérobactéries porteuses d'un plasmide IncA/C avec le gène de résistance *bla*_{TEM-24} isolées au CHU de Dijon, a été utilisée. Elle est constituée des bactéries suivantes : *Citrobacter freundii* 2954, *Enterobacter aerogenes* 409, *Enterobacter cloacae* 646, *E. coli* 565, *Klebsiella oxytoca* 965, *K. pneumoniae* 568, *P. mirabilis* 709, *Proteus vulgaris* 835, *Providencia stuartii* 719 et *Serratia marcescens* 1003. Des mutants résistants à la rifampicine des souches *C. freundii* 2954, *E. aerogenes* 409, *E. cloacae* 646, *E. coli* 565, *K. oxytoca* 965, *K. pneumoniae* 568 ont été sélectionnés selon la méthode du gradient de Szybalski.

Le plasmide IncA/C avec le gène *bla*_{TEM-24} a aussi été introduit *in vitro* dans la souche de *E. aerogenes* BOL par conjugaison avec *P. vulgaris* 835 et dans la souche *E. coli* K12 C600 par conjugaison avec *E. aerogenes* 409.

La liste et le phénotype de résistance de ces souches sont récapitulés dans le tableau n°7.

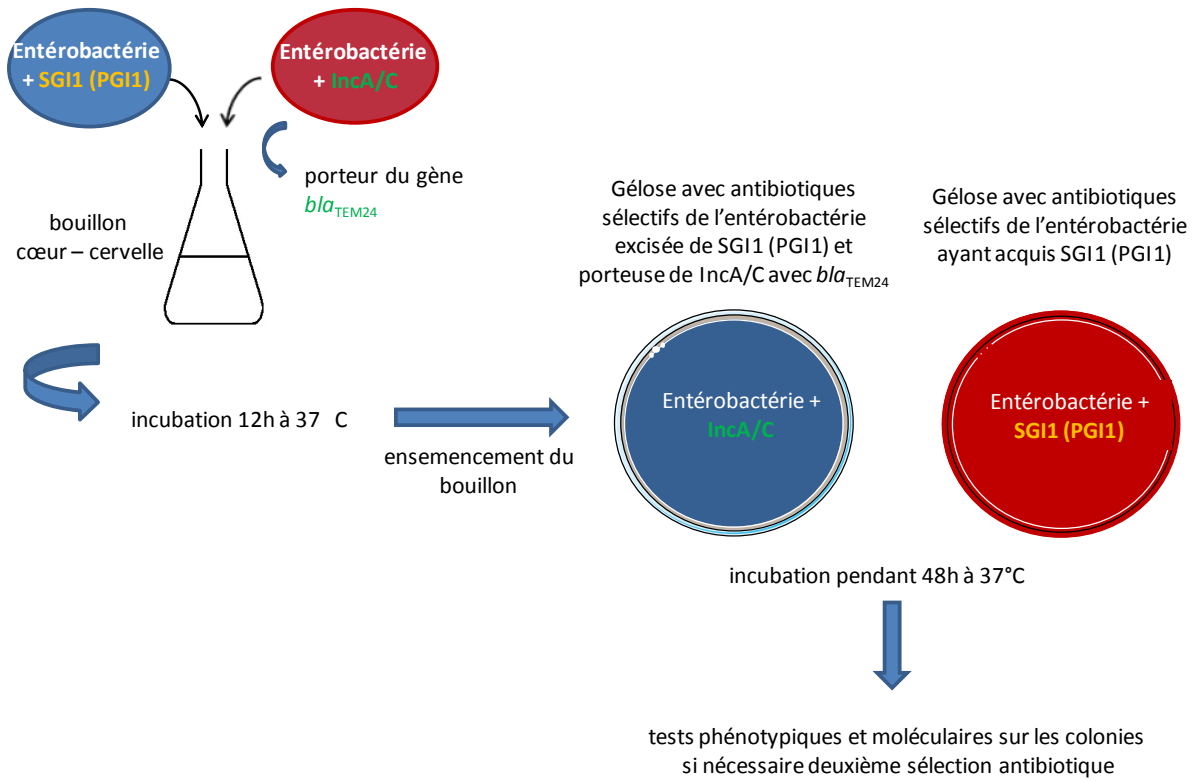


Figure 48 : Schéma explicatif des conjugaisons et sélection des transconjugants avec SGI1 (ou PGI1) ou des transconjugants excisés de SGI1 (PGI1).

2. Insertion des îlots SGI1 (ou PGI1) dans une souche porteuse du plasmide IncA/C

Les souches avec un îlot SGI1 (ou PGI1) ont été considérées comme souches donatrices. Les souches porteuses du plasmide IncA/C avec le gène *bla*_{TEM-24} ont été appelées souches réceptrices. Ces souches ont été mises en culture dans du bouillon cœur-cerveille et incubées pendant 6 h à 37°C. Les expériences de conjugaison ont consisté à mélanger 4 ml de bouillon contenant une souche donatrice avec 1 ml de bouillon contenant une souche réceptrice. Ce mélange est incubé pendant 12 h à 37°C sans agitation pour favoriser les contacts entre les bactéries. Ensuite, 100 µl de ce mélange pur et dilué (dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁵) ont été ensemencés au râteau sur des géloses sélectives de la souche réceptrice ayant acquis l'îlot SGI1 (ou PGI1) (Figure 48). Ainsi dans cette expérience de conjugaison, les colonies ayant acquis l'îlot sont sélectionnées.

3. Excision des îlots SGI1 (ou PGI1)

Pour l'excision des îlots de résistance de type SGI1 (ou PGI1), la conjugaison a été réalisée selon la même méthode. En revanche, la bactérie porteuse du plasmide IncA/C avec le gène *bla*_{TEM-24} a été considérée comme donatrice et la bactérie avec îlot SGI1 (ou PGI1) a été appelée réceptrice. Les géloses utilisées étaient sélectives de la souche réceptrice du plasmide IncA/C avec le gène *bla*_{TEM-24}. Le choix des entérobactéries donatrices de plasmide IncA/C a été réalisé selon les sélections possibles des transconjugants excisés de l'îlot. Ainsi, dans cette expérience de conjugaison, les colonies ayant perdu l'îlot ont été recherchées.

Les concentrations et les antibiotiques utilisés pour élaborer les géloses sélectives sont listés dans le tableau n°9.

4. Caractérisation des transconjugants

Les transconjugants ont été identifiés soit par galerie biochimique Api20E BioMérieux soit par spectrométrie de masse (Maldi-Tof de Brucker). L'antibiogramme ainsi que la recherche du phénotype de BLSE par la méthode des disques rapprochés entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de 3^{ème} génération ont été effectués (cf paragraphe IV.B.1). La PCR courte et la méthode de séquençage de Sanger ont été utilisées pour caractériser les transconjugants (cf paragraphe IV.B.2). La liste des amorces utilisées est dans l'annexe 4.

a. Recherche de l'îlot SGI1 (ou PGI1) chez les transconjugants

La recherche de l'îlot SGI1 (ou PGI1) dans les transconjugants a été effectuée selon la méthode précédemment décrite [recherche du gène *sgiA* (S026)] (cf paragraphe IV.B.2). La recherche de la forme intégrée dans le chromosome du transconjugant a été effectuée en amplifiant les jonctions entre le chromosome et l'îlot SGI1 (ou PGI1) par PCR. Tout d'abord, au niveau de la 1^{ère} jonction entre le gène chromosomique *trmE* et le 1^{er} gène de l'îlot *int* (S001 ou P001) puis entre le dernier gène de l'îlot S044 (ou P025) et le gène chromosomique du transconjugant [*int_{RET}* (*Salmonella*), *hipB* (*P. mirabilis*), *mdtL* (*C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*), *tnaA* (*E. coli*), *nanA* (*K. oxytoca*), *pin* (*P. vulgaris*), *transf* (*P. stuartii*) et *iucD* (*S. marcescens*)].

Tableau 8 : Site *attP* des îlots de résistance SGI1 (ou PGI1) et sites d'attachement *attB* au niveau de l'extrémité 3' de leur gène *trmE* des souches d'entérobactéries porteuses du plasmide IncA/C avec le gène *bla*_{TEM-24}.

Type d'îlot	Site <i>attP</i> ^a
SGI	TTCTGTATTGGGAAGTAA
PGI	TTCTGTATTGGGAAGTGA
Souches d'entérobactéries réceptrices d'îlot	Site <i>attB</i> ^a
<i>S. Typhimurium</i> AF261825 (référence)	TTCTGTATTGGGAAGTAA
<i>C. freundii</i> 2954	TTCTGTATTGGTAAGTAA
<i>E. aerogenes</i> 409	TTCTGTATCGGTAAGTAA
<i>E. cloacae</i> 646	TTCTGCAATTGGTAAGTAA
<i>E. coli</i> 565	TTCTGTATTGGTAAGTAA
<i>K. oxytoca</i> 603	TTCTGTATTGGTAAGTAA
<i>K. pneumoniae</i> 568	TTCTGCATCGGTAAGTAA
<i>P. mirabilis</i> 709	TTCTGTATTGGGAAGTAA
<i>P. vulgaris</i> 835	TTCTGTATCGGGAAGTGA
<i>P. stuartii</i> 719	TTCTGTATCGGCAAGTAA
<i>S. marcescens</i> 1003	TTCTGCATCGGCAAATAA

^a en rouge : mutations au niveau du site *attP* ou du site *attB* par rapport au premier site décrit

b. Confirmation de la perte de l'îlot SGI1 (ou PGI1) chez les transconjugants

Pour les transconjugants excisés de l'îlot SGI1 (ou PGI1), la présence du site *attB* intact et du plasmide IncA/C a été recherchée par PCR selon la méthode de Caratolli (Caratolli et al. 2005). Pour s'assurer de l'absence de SGI1 (ou PGI1) dans ces transconjugants, le gène *sgiA* (S026), et la forme intégrée dans le chromosome (amplification des jonctions précédemment citées) ont été recherchés par PCR. Enfin, une PCR en deux étapes a été effectuée pour amplifier le site *attP* et vérifier l'absence de forme circulaire. Ces PCR ont été effectuées avec un témoin positif en parallèle.

C. Résultats

1. Insertion des îlots SGI1 (ou PGI1) dans des souches d'entérobactéries

Toutes les souches d'entérobactéries porteuses du plasmide IncA/C avec le gène *bla*_{TEM-24} utilisées dans nos essais de conjugaison possédaient un gène *trmE* et avaient donc un site d'attachement *attB* (Tableau n°8).

Une forme circulaire (PCR *attP* positives) des îlots SGI1, SGI1-V et PGI1-*PmESC* était présente dans toutes les souches donatrices d'un îlot.

Trois essais de conjugaison ont été réalisés entre *S. Typhimurium* DT104 GOS donatrice de SGI1 et les souches réceptrices *E. coli* K12-C600 et *E. aerogenes* BOL sans plasmide IncA/C. Ces essais n'ont pas permis d'obtenir des transconjugants avec SGI1.

Tableau 9 : Conjugaisons réalisées, antibiotiques utilisés pour la sélection des transconjugants avec îlot de résistance SGI1 (ou PGI1) et phénotypes des transconjugants obtenus.

Souches donatrices de l'îlot	Souches réceptrices	Antibiotiques sélectifs (mg/l)	Transconjugants	Phénotype des transconjugants ^{a, b}
<i>S. Typhimurium</i> DT104 GOS (SGI1)	<i>C. freundii</i> 2954 <i>E. aerogenes</i> 409 <i>E. cloacae</i> 646 <i>E. coli</i> 565 <i>K. oxytoca</i> 603 <i>K. pneumoniae</i> 568 <i>P. mirabilis</i> 709 <i>P. vulgaris</i> 835 <i>P. stuartii</i> 719 <i>S. marcescens</i> 1003 <i>E. coli</i> K-12 C600 <i>E. coli</i> K-12 C600 (pA/C) <i>E. aerogenes</i> BOL <i>E. aerogenes</i> BOL (pA/C)	RIF (50) + DOX (10) RIF (50) + CHL (50) RIF (50) + DOX (50) RIF (50) + DOX (10) RIF (50) + DOX (10) RIF (50) + DOX (10) CST(10) + PIP (15) CST(10) + PIP (15) CST(10) + PIP (15) CST(10) + CHL (50) RIF (50) + CHL (50) RIF (50) + CHL (50) RIF (50) + DOX (10) RIF (50) + DOX (10)	<i>C. freundii</i> 2954-S1F1 <i>E. aerogenes</i> 409- SGI1 <i>E. cloacae</i> 646-S1-L21 <i>E. coli</i> 565-S1C1 <i>K. oxytoca</i> 603-S1O1 <i>K. pneumoniae</i> 568-S1K38 <i>P. mirabilis</i> 709-S1P3 <i>P. vulgaris</i> 835-S1V1 <i>P. stuartii</i> 719-S1T1 <i>S. marcescens</i> 1003-S1M12 aucun <i>E. coli</i> K-12 C600 -SGI1 aucun <i>E. aerogenes</i> BOL-SGI1	AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, DOX, RIF AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, CIP, STR, SPT, SUL, DOX, RIF AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, STR, SPT, SUL, DOX, RIF AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, TMP, DOX, RIF AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, DOX, RIF AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, DOX, RIF AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, DOX, RIF AMX, PIP, CHL, NAL, KAN, GEN, TOB, STR, SPT, SUL, TMP, DOX, CST, RIF AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, DOX, CST AMX, PIP, CHL, NAL, CIP, STR, SPT, SUL, TMP, DOX, CST, RIF AMX, PIP, CHL, NAL, CIP, STR, SPT, SUL, DOX, CST, RIF AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, DOX, RIF AMX, PIP, CHL, STR, SPT, SUL, DOX, RIF
<i>S. Typhimurium</i> DT104 8BAZJU (SGI1)	<i>E. aerogenes</i> 409	RIF (50) + CHL (50)	<i>E. aerogenes</i> 409- SGI1	AMX, PIP, CAZ, CHL, NAL, CIP, STR, SPT, SUL, DOX, RIF
<i>P. mirabilis</i> VB1248 (SGI1-V)	<i>E. aerogenes</i> 409	RIF (50) + GEN (4)	<i>E. aerogenes</i> 409- SGI1-V	AMX, PIP, CAZ, NAL, CIP, AMK, KAN, GEN, TOB, SUL, TMP, DOX, RIF
<i>P. mirabilis</i> ESC (PGI1-PmESC)	<i>E. aerogenes</i> 409	RIF (50) + GEN (4)	<i>E. aerogenes</i> 409- PGI1-PmESC	AMX, PIP, NAL, CIP, CAZ, KAN, TOB, GEN, STR, SPT, SUL, DOX, RIF

^a Abréviations utilisées pour les molécules d'antibiotiques: AMX, amoxicilline; PIP, piperacilline; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; NAL, acide nalidixique; CIP, ciprofloxacine; AMK, amikacine; KAN, kanamycine; GEN, gentamicine; TOB, tobramycine; STR, streptomycine; SPT, spectinomycine; SUL, sulfamides; TMP, triméthoprime; DOX, doxycycline; CST, colistine; RIF, rifampicine.

^b En orange : résistances apportées par l'îlot SGI1 (ou PGI1)

Les essais de conjugaison ont été à nouveau réalisés après avoir introduit le plasmide IncA/C de *E. aerogenes* 409 dans *E. coli* K12-C600 et le plasmide IncA/C de *P. vulgaris* 835 dans *E. aerogenes* BOL par conjugaison.

Des transconjugants (*E. coli* K12-C600-S1C3 et *E. aerogenes* BOL-S1A1) ont été alors obtenus après conjugaison entre la souche de *S. Typhimurium* DT104 GOS donatrice de SGII et les souches réceptrices *E. coli* K12-C600 (pA/C) et *E. aerogenes* BOL (pA/C) (Tableau 9). Ces transconjugants avaient tous intégré SGII au niveau de leur site d'attachement *attB* (extrémité 3' du gène *trmE*).

De même, après conjugaison avec la souche de *S. Typhimurium* DT104 GOS donatrice de SGII, les 10 souches d'entérobactéries porteuses d'un plasmide IncA/C avaient toutes intégré le SGII au niveau de leur site d'attachement *attB* (extrémité 3' du gène *trmE*) (Tableau 9).

Le transfert de SGII d'une autre souche de *S. Typhimurium* DT104 ST8BAZJU à une souche de *E. aerogenes* 409 a aussi été obtenu. De même, SGII-V, présent initialement dans la souche de *P. mirabilis* VB1248, a été transféré chez *E. aerogenes* 409. Ces îlots ont aussi été intégrés au niveau du site *attB* de *E. aerogenes* 409. Enfin, la conjugaison entre *P. mirabilis* ESC (PGII-PmESC) et *E. aerogenes* 409 a permis d'obtenir un transconjugant *E. aerogenes* 409-PESCA22. Le PGII-PmESC était présent au site d'attachement *attB* de *E. aerogenes* 409.

Tous ces transconjugants ont été obtenus en une seule expérience de conjugaison (Siebor et al. 2016).

Tableau 10 : Souches utilisées pour les conjugaisons, méthodes utilisées pour sélectionner les transconjugants sans îlot de résistance SGI1 (ou PGI1) avec le plasmide IncA/C.

Souches réceptrices et porteuses de l'îlot	Souches donatrices du plasmide IncA/C	Sélection des transconjugants sans îlot (mg/l)	Nombre d'essais	S026	Site <i>attB</i> (<i>trmE</i> intact)	Jonction de gauche	Jonction de droite	Forme circulaire	Plasmide IncA/C	Phénotype de résistance ^{a,b}
<i>Salmonella</i> Typhimurium ST8BAZJU (SGI1)	<i>E. aerogenes</i> 409	1 ^{ère} sélection : CAZ (4) + RIF (50) 2 ^{ème} sélection : à partir des colonies sensibles au CHL	1	-	+	-	-	-	+	AMX, CAZ, KAN, SPT, STR, SUL, TMP, SXT, RIF
<i>Salmonella</i> Typhimurium STGOS (SGI1)	<i>E. aerogenes</i> 409	Une seule sélection : CAZ (4) + RIF (50)	1	-	+	-	-	-	+	AMX, CAZ, KAN, GEN, SPT, STR, SUL, TMP, SXT, RIF
<i>P. mirabilis</i> PmSCO (SGI1-H)	<i>E. aerogenes</i> 409	Une seule sélection : CAZ (0,5) + CST (15)	2	-	+	-	-	-	+	AMX, CAZ, CHL, DOX, KAN, NAL, OFX, STR, SPT, SUL, TMP, SXT
<i>P. mirabilis</i> Pm1LENAR (SGI0)	<i>E. aerogenes</i> BOL (pA/C)	1 ^{ère} sélection : CHL (50) + CST (15) 2 ^{ème} sélection : résistant CHL (50)	1	-	+	-	-	-	+	AMX, CAZ, CHL, DOX, KAN, STR, SPT, SUL, TMP, SXT
<i>P. mirabilis</i> Pm6MARLU (PGI1-PmEsc)	<i>E. aerogenes</i> 409	Une seule sélection : CAZ (0.5) + CST (15)	2	-	+	-	-	-	-	AMX, DOX, CST
<i>E. aerogenes</i> 409-S1A1 (SGI1)	<i>P. vulgaris</i> 835	Une seule sélection : KAN (30) + RIF (50)	2	-	+	-	-	-	+	AMX, CAZ, CHL, KAN, NAL, OFX, SUL, TMP, SXT, RIF
<i>E. coli</i> K12 C600 S1C3 (SGI1)	<i>E. aerogenes</i> 409	Une seule sélection : CAZ (4) + RIF (50)	2	-	+	-	-	-	+	AMX, CAZ, KAN, SUL, TMP, SXT, RIF

^aAbréviations utilisées pour les molécules d'antibiotiques: AMX, amoxicilline; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; NAL, acide nalidixique; OFX, ofloxacin; KAN, kanamycine; GEN, gentamicine; STR, streptomycine; SPT, spectinomycine; SUL, sulfamides; TMP, triméthoprim; DOX, doxycycline; CST, colistine; RIF, rifampicine.

^ben vert : résistances aux antibiotiques conférées par le plasmide IncA/C

2. Excision des îlots de résistance SGI1 (ou PGI1) de souches d'entérobactéries

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux souches d'entérobactéries donatrices de SGI1 (ou PGI1) afin de savoir si elles pouvaient totalement perdre leur îlot après conjugaison avec une entérobactérie porteuse d'un plasmide IncA/C.

Pour chaque conjugaison effectuée entre une entérobactérie donatrice d'un plasmide IncA/C (soit *E. aerogenes* 409, soit *E. aerogenes* BOL (pA/C), soit *P. vulgaris* 835) et une entérobactérie porteuse d'un îlot [soit *S. Typhimurium* DT104 ST8BAZJU ou STGOS avec SGI1, soit *P. mirabilis* (PmSCO) avec SGI1-H (SGI1 incomplet), soit *P. mirabilis* (Pm1LENAR) avec SGI0 et soit *P. mirabilis* (Pm6MARLU) avec PGI1-PmESC], des transconjugants porteurs d'un plasmide IncA/C ont été obtenus. A noter que pour les souches PmSCO (SGI1-H) et Pm6MARLU (PGI1-PmESC), une deuxième expérience de conjugaison a été nécessaire pour obtenir des transconjugants puisque la première expérience avait échoué.

Le phénotype des 2 transconjugants STGOS Δ SGI1 et PmSCO Δ SGI1-H montrait la perte des résistances liées à l'îlot et l'acquisition d'une BLSE. Pour le transconjugant Pm6MARLU Δ PGI1-PmESC, le phénotype montrait la perte des marqueurs de résistance du plasmide IncA/C et l'absence de BLSE. Le plasmide a été perdu au cours de la conservation du transconjugant.

Pour les conjugaisons entre les souches ST8BAZJU et *E. aerogenes* 409 et entre les souches Pm1LENAR et *E. aerogenes* BOL (pA/C), les transconjugants exprimaient les 2 phénotypes (un phénotype avec les marqueurs de la résistance de l'îlot et un phénotype sans les marqueurs de la résistance de l'îlot) au sein d'une même colonie. Pour ces deux

conjugaisons, une deuxième étape de sélection par antibiotique a été effectuée et a permis d'obtenir des transconjugants complètement excisés de l'îlot (Tableau n°10).

Pour tous les transconjugants obtenus, l'îlot n'a été retrouvé ni sous forme intégrée (PCRs des jonctions négatives), ni sous forme circulaire (PCRs du site *attP* négatives) alors que les témoins positifs, porteurs de l'îlot étaient tous positifs. De plus, ces transconjugants avaient tous un site *attB* intact [PCRs du site *attB* positives (entre le gène *trmE* et l'autre gène en aval *int_{ret}* ou *hipB*)]. Enfin, à l'exception du transconjugant *Pm6MARLUPGI1-PmESC*, les transconjugants portaient tous le plasmide IncA/C (PCRs *repA* positives) et exprimaient un phénotype de BLSE.

Enfin, après conjugaison avec *E. aerogenes* 409 ou *P. vulgaris* 835, les souches de *E. coli* K12 C600-S1C3 et de *E. aerogenes* 409-SGI1, dans lesquelles SGI1 avait été précédemment introduit, avaient aussi perdu leur îlot. Pour ces deux souches, les transconjugants sans îlot ont été obtenus après la deuxième expérience de conjugaison. Cette perte du SGI1 a été confirmée comme décrit précédemment.

D. Discussion

Dans ces essais de mobilisation des îlots de résistance, nous avons montré le transfert de l'îlot SGI1 et des îlots apparentés SGI1-V ou PGI1-*PmESC* d'une souche d'entérobactérie donatrice à une souche d'entérobactérie porteuse d'un plasmide IncA/C par simple conjugaison.

Notre travail confirme que la présence d'un plasmide IncA/C est requise pour le transfert de l'îlot (Doublet et al. 2005 ; Douard et al. 2010 ; Doublet et al. 2008b ; Kiss, Nagy, and Olasz 2012 ; Harmer et al. 2016). Contrairement aux études précédentes, le plasmide IncA/C

n'a pas été inséré dans la bactérie donatrice de l'îlot : c'est la bactérie réceptrice de l'îlot qui portait le plasmide IncA/C. Selon Carraro *et al.*, la souche donatrice de l'îlot a dans un premier temps acquis le plasmide IncA/C de la souche réceptrice. Dans un second temps, ce plasmide IncA/C a permis alors de transférer l'îlot dans la souche réceptrice. Ces deux étapes ont pu se produire grâce à l'expression de TraG_S de SGI1. En effet, cette protéine permet à l'îlot d'échapper au système d'exclusion du plasmide IncA/C (Carraro et al. 2017).

Ces résultats démontrent pour la première fois que SGI1 peut être transféré à d'autres entérobactéries que *S. enterica* ou *E. coli* : *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. stuartii*, *S. marcescens*. Nous avons également démontré le transfert de SGI1-V ou PGI1-*PmESC* qui s'intègrent au niveau de l'extrémité 3' du gène chromosomique *trmE* (site *attB*). Ces résultats confirment les travaux de Doublet *et al.* qui suggéraient que de nombreuses bactéries possédant un site *attB* potentiel pouvaient intégrer un îlot (Doublet et al. 2007). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a pu mettre en évidence la présence de ces îlots *in vivo* dans des bactéries autres que *S. enterica*, *P. mirabilis* et *M. morganii*. Ainsi, une étude a recherché ces îlots dans 116 souches de *E. coli* et 43 souches de *Shigella spp.*. Aucune de ces souches n'était porteuse de l'îlot (Amar et al. 2008).

Enfin, cette étude met en évidence que non seulement les SGI1 peuvent être mobilisés mais aussi les îlots apparentés SGI1-V et PGI1-*PmESC*. Le dérivé SGI1-V peut-être aussi transféré malgré la présence de modifications majeures au niveau des ORFs du squelette dont la fonction est inconnue (exceptée S025) : insertion de 3 ORFs dans S014, mutations au niveau des ORFs: S021, S022 et S025 et délétion de S023 et S024 (Siebor and Neuwirth 2011). Nos résultats montrent que S024 n'est pas indispensable pour le transfert de SGI1 et confirment que S023 n'est pas essentielle pour le transfert de SGI1. En effet, il a déjà été montré que le dérivé SGI2 pouvait être mobilisé en présence d'un plasmide InA/C bien qu'il présente une ORF S023 non fonctionnelle (insertion de la région MDR dans S023) (Harmer et

al. 2016 ; Levings, Djordjevic, and Hall 2008). Les modifications des ORFs S014, S021, S022 et S025 n'empêchent pas non plus le transfert de SGI1. Nous pouvons émettre deux hypothèses : soit ces ORFs ne sont pas indispensables pour le transfert de SGI1, soit ces ORFs restent fonctionnelles en dépit des modifications.

PGI1-*PmESC* peut lui aussi être mobilisé alors qu'il possède un squelette très différent de celui de SGI1. Tout d'abord, le gène *int* présente 20% de différences avec celui de SGI1 (Siebor and Neuwirth 2014). Dans des études préalables, il a été montré que cette intégrase était indispensable à l'excision de l'îlot et à sa mobilisation dans une autre cellule en présence d'un plasmide IncA/C (Doublet et al. 2005). Malgré ces différences, l'intégrase de PGI1-*PmESC* reste fonctionnelle puisqu'elle peut exciser PGI1-*PmESC* et ré-intégrer PGI1-*PmESC* au niveau du site *attB* du chromosome d'une autre bactérie. Le gène *xis* présente aussi 23% de différences par rapport à celui de SGI1. Ce gène n'est pas indispensable pour l'excision et le transfert de SGI1 mais joue un rôle important puisque le taux de transfert est diminué en son absence (Doublet et al. 2005 ; Kiss et al. 2015). Les gènes *traN* (P004) et *traG* (P009) présentent respectivement 67 et 70% d'identité avec ceux du SGI1. Il n'est pas retrouvé de gène *traH* (S012) dans le PGI1. Il a été montré que ces gènes ne sont pas indispensables au transfert de SGI1 mais le facilitent (Kiss, Nagy, and Olasz 2012). De plus, la présence de TraGs est nécessaire pour échapper au système d'exclusion du plasmide IncC (Carraro et al. 2017). Dans notre étude, PGI1-*PmESC* a pu être mobilisé et entrer dans la cellule avec le plasmide InA/C. Ceci suggère que la protéine TraG (P009) reste fonctionnelle. L'absence d'ORFs homologues à certaines ORFs de SGI1 (S003, S004, S007 à S010, S012 à S014 et S023 à S024) sur PGI1 suggère que ces ORFs ne sont pas essentielles au transfert de PGI1 ou sont remplacées par d'autres ORFs spécifiques de PGI1 (Siebor and Neuwirth 2014).

La principale limite de notre étude est que nous n'avons pas calculé le taux de transfert des îlots de type SGI1 et les îlots apparentés SGI1-V et PGI1-*PmESC*. Ainsi, nous ne pouvons pas déterminer si le taux de transfert diffère entre ces îlots.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence l'excision complète des îlots SGI1 et des îlots apparentés SGI1-H, SGI0, PGI1-*PmESC* des souches cliniques de *S. enterica*, de *P. mirabilis* et d'entérobactéries chez lesquelles SGI1 avait été introduit *in vitro* en présence d'un plasmide IncA/C. Ces résultats confirment ceux de Kiss *et al.*. Ces auteurs montrent que le plasmide IncA/C permet d'exciser SGI1 grâce à la présence notamment de son complexe activateur AcaCD (Kiss *et al.* 2015). Nous n'avons par contre pas déterminé le taux d'excision en fonction des îlots notamment du fait d'une deuxième sélection antibiotique pour séparer les transconjugants sans îlot des bactéries avec îlot qui pouvaient co-exister au sein d'une même colonie.

Plusieurs auteurs ont suggéré qu'il existait une incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncA/C. En effet, les souches décrites avec un plasmide IncA/C ne portent pas d'îlot SGI1 et *vice-versa* (Lindsey *et al.* 2009 ; Le Hello *et al.* 2011). De plus, lors des expériences de conjugaison, la co-acquisition de l'îlot de résistance et du plasmide IncA/C par les transconjugants était un phénomène très rare (Doublet *et al.* 2005 ; Douard *et al.* 2010 ; Carraro *et al.* 2014). Enfin, Harmer *et al.* ont mis en évidence que SGI1 et SGI2 déstabilisent le plasmide InC (pRMH760) et que SGI2 déstabilise aussi le plasmide IncA (pRA1) confirmant cette incompatibilité. Contrairement à notre étude, ils n'ont pas mis en évidence de perte de l'îlot mais uniquement la perte progressive du plasmide IncA ou IncC (Harmer *et al.* 2016). En revanche, SGI1-K qui présente une délétion entre S005 et S009, ne déstabilise pas le plasmide InC (pRMH760) laissant penser que les gènes présents entre S005 et S009 pourraient jouer un rôle dans cette incompatibilité (Figure 28) (Harmer *et al.* 2016). Dans nos

travaux, nous avons excisé un îlot SGI1-H qui présente aussi cette délétion. Ainsi, nous montrons que SGI1-H peut en revanche être déstabilisé par un plasmide IncA/C.

Dans notre étude, il a été aussi observé que pour certaines souches (ST8BAZJU, Pm1LENAR), les transconjugants possédaient à la fois le plasmide IncA/C et à la fois SGI1 ou SGI0. Après une deuxième sélection, seuls les transconjugants excisés de l'îlot étaient présents. Ces résultats confirment que le plasmide IncA/C et SGI1 peuvent être présents ensemble mais sont alors moins stables que séparément (Kiss et al. 2015 ; Huguet et al. 2016).

Ainsi, ces résultats montrent qu'en présence d'un plasmide IncA/C, SGI1 et les îlots apparentés SGI1-H, SGI0 et PGI1-PmESC ne sont pas aussi stables que les îlots SGI1-F, -I, -K et SGI2 (Harmer et al. 2016). Les résultats de notre étude ne sont pas en contradiction avec ceux de Huguet *et al.*. En effet, ils ont réalisé des études de stabilité de l'îlot en présence d'un plasmide IncA/C et sans pression antibiotique, et ont montré que la majorité des bactéries conservaient l'îlot (40%) et que seulement 23% étaient uniquement porteuses du plasmide IncA/C. Ils ont aussi démontré que la stabilité de l'îlot en présence du plasmide IncA/C était directement liée à la présence du système toxine/antitoxine SgiAT et ceci d'autant plus sous pression antibiotique sélectionnant le plasmide IncA/C. Par contre, sous pression antibiotique sélectionnant l'îlot de résistance, comme dans notre étude, le système toxine/antitoxine SgiAT ne semblait pas jouer de rôle particulier : dans 50% des cas le plasmide IncA/C était présent avec SGI1 et dans 50% des cas SGI1 était seul (Huguet et al. 2016).

E. Conclusion

Notre étude a démontré *in vitro* que SGI1 et les îlots apparentés (SGI1-H, SGI1-V, SGI0 ou PGI1-PmESC) et le plasmide IncA/C étaient échangeables entre deux souches d'entérobactéries. Cette étude suggère que dans les milieux riches en entérobactéries comme

le tube digestif ou dans l'environnement naturel (ex : eaux usées) de tels échanges pourraient se produire. Devant cette observation, une question est émise : pourquoi ne trouve-t-on pas de SGI1 ou des îlots apparentés dans les autres entérobactéries ?

VI. Troisième étude : SGI1 et virulence

A. Etude rétrospective de 2011 à 2016 des patients infectés par une salmonelle mineure avec ou sans îlot de résistance

1. Objectifs

Cette étude avait pour objectif d'évaluer si la présence d'un îlot de résistance chez les salmonelles mineures avait un impact clinique par la recherche d'une éventuelle relation entre les îlots de résistance et la virulence des souches. A ce jour, aucune étude n'a été menée. En effet, seules des études visant à déterminer le lien entre la multirésistance (dont la pentarésistance) de *S. Typhimurium* et sa pathogénicité ont été conduites. Cependant, aucune de ces études n'a recherché la présence effective de SGII (Helms et al. 2002 ; Varma et al. 2005 ; Martin et al. 2004). L'implication éventuelle de la résistance aux antibiotiques sur la sévérité des infections à *S. enterica* a également été étudiée. Cette étude a fait l'objet d'une soumission en 1^{er} auteur (article n°3).

2. Matériels et méthodes

a. Méthodologie de l'étude

De janvier 2011 à octobre 2016, tous les patients du CHU de Dijon infectés par une souche de salmonelle mineure conservée au laboratoire de bactériologie ont été inclus.

Le recueil des informations cliniques a été effectué rétrospectivement à partir des dossiers de patient. D'une part, les informations liées au patient ont été recueillies : l'âge, le sexe, le statut immunitaire et la notion de voyage à l'étranger. Les patients étaient considérés immunodéprimés s'ils souffraient de pathologies sous-jacentes telles que : cancer, infection par le VIH, drépanocytose, immunodépression par un traitement immunosuppresseur. D'autre part, les informations liées à l'infection ont été collectées telles que la présence d'une infection invasive (infection dans un site normalement stérile et/ou bactériémie), d'un sepsis, d'un syndrome inflammatoire (hyperleucocytose ou augmentation de la CRP [protéine C réactive]), de leucocytes et de sang dans les selles mais aussi la nécessité d'une réhydratation hydrique par voie intra-veineuse et la durée d'hospitalisation.

b. Identification des souches de *S. enterica*.

Les souches de *S. enterica* ont été identifiées grâce à des tests biochimiques par galerie Api20E de Biomérieux®. Les souches ont été sérotypées (sérums poly et monovalents dans notre laboratoire ou au Centre national de référence des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* à l'Institut Pasteur de Paris). Pour les souches de *S. Typhimurium*, la recherche du lysotype DT104 a été effectuée par PCR selon la méthode précédemment décrite (Annexes 6 et 10). Les amorces sont citées dans l'annexe 4 (Pritchett et al. 2000).

c. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Les antibiogrammes ont été réalisés selon la méthode recommandée par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM).

Tableau 11 : Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez les 100 souches de salmonelles mineures étudiées ^a

Antibiotiques	Pourcentage de résistance
Amoxicilline	37
Amoxicilline –acide clavulanique	17
Céfotaxime	2
Acide nalidixique	9
Ofloxacine	9
Kanamycine	3
Streptomycine	49
Spectinomycine	13
Sulfamides	52
Triméthoprime	9
Chloramphénicol	12
Doxycycline	61

^a Antibiogramme réalisé selon les recommandations du CASFM

Les molécules testées étaient : amoxicilline, amoxicilline –acide clavulanique, céfotaxime, acide nalidixique, ofloxacin, chloramphénicol, kanamycine, spectinomycine, streptomycine, sulfamides, triméthoprim et doxycycline.

d. Détection de l'îlot de résistance

La recherche de l'îlot de résistance a été effectuée par amplification du gène *sgiA* (S026) qui est très conservé au sein des différents îlots, selon la même méthode que dans la première étude (cf paragraphe IV.B.2).

e. Analyse statistique

Pour l'analyse univariée, la comparaison des médianes a été réalisée grâce au test de Kruskal-Wallis et la comparaison des pourcentages a été effectuée par le test exact de Fisher. Pour l'analyse multivariée, un test de régression logistique a été effectué après s'être assuré de la robustesse de la variance. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. Le logiciel Stata[®] a été employé pour analyser ces résultats.

3. Résultats

a. Prévalence et caractéristiques des souches de salmonelles mineures porteuses de l'îlot de résistance

Entre 2011 et 2016, 100 patients ont été inclus dans cette étude. Sur les 100 souches de *S. enterica*, 22 sérotypes étaient représentés. Les pourcentages de résistance figurent dans le tableau 11.

Tableau 12 : Caractéristiques des souches isolées des patients infectés par une salmonelle mineure

Sérotypes	SGI1 positif n (%)	SGI1 négatif n (%)
<i>S. Typhimurium</i> (n=36)	7 (19,4)	29 (80,6)
DT104 (n=9)	5 (55,6)	4 (44,4)
Non DT104 (n=27)	2 (7,4)	25 (92,6)
<hr/>		
Autres sérotypes (n=64)	5 (7,8)	59 (92,2)
<i>S. 4, [5], 12 : i-</i> (n=19)	0	19 (100)
<i>S. Enteritidis</i> (n=14)	0	14 (100)
<i>S. Paratyphi B</i> var Java (n=2)	0	2 (100)
<i>S. Dublin</i> (n=5)	0	5 (100)
Sérotypes moins fréquents ^a (n=24)	5 ^b (20,8)	19 (79,2)
<hr/>		
Phénotypes ^c	SGI1 positif n (%)	SGI1 négatif n (%)
Multi-sensible (n=21)	0 (0)	21 (100)
Résistant ≥ 1 antibiotique (n=79)	12 (15,2)	67 (84,8)
Dont penta-résistant (ACSSuT) ^d (n=9)	6 (67)	3 (33)

^a Autres sérotypes (n=24): *S. Ahmadi* (n =1). *S. Braenderup* (n = 1). *S. Chester* (n =2). *S. Eastbourne* (n =1). *S. Eboko* (n=1). *S. Hadar* (n =1). *S. Hessarek* (n=2); *S. Infantis* (n =2); *S. Kedougou* (n =1); *S. Kentucky* (n = 2); *S. Napoli* (n=1); *S. Panama* (n=1); *S. Rissen* (n=1); *S. Schwarzengrund* (n =2); *S. Singapore* (n=1); *S. St Paul* (n =3); et le nouveau variant 6, 7, – (n=1)

^b Autres sérotypes avec SGI (n =5): *S. Infantis* (n= 1), *S. Kentucky* (n=2), *S. St Paul* (n=2)

^c Les phénotypes ont été déterminés en réalisant des antibiogrammes selon les recommandations du CASFM.

^d ACSSuT : Amoxicilline, Chloramphénicol, Streptomycine, Sulfamides et Tétracyclines

Douze souches (12%) portaient un îlot. Ces souches appartenaient aux sérotypes suivants : Infantis (n=1), Kentucky (n=2), St Paul (n=2) et Typhimurium (n = 7 dont 5 de lysotype DT104) (Tableau 12). La plupart des îlots de résistance étaient présents chez *S. Typhimurium*. Il existait une relation positive entre la présence d'un îlot de résistance et le lysotype DT104 ($p = 0,001$). Le tiers des souches avec îlot (n=4) appartenait au clone de *S. Typhimurium* DT104 penta-résistant (ACSSuT). De même, la présence de l'îlot de résistance était très souvent associée au phénotype de penta-résistance (ACSSuT) ($p < 0,001$) (Tableau 13). Malgré le peu de données sur la notion de voyage à l'étranger, il a été observé que 4 patients avaient voyagé au Maroc et étaient infectés par une souche de *S. enterica* avec îlot. Parmi ces 4 patients, un frère et une sœur étaient infectés par une *S. St Paul* et deux autres patients par une *S. Kentucky*.

Tableau 13 : Implication des îlots de résistance dans la sévérité de la maladie

Variabes	SGI1 positif	SGI1 Négatif	Valeur de p ^e
N ^a	12	88	
Age (années) ^b	13,9 (56,9)	18,4 (54,2)	p=0,62
Sex ratio H/F ^a	5/7	42/46	p=0,77
Immunodépression ^a	2 (16,7)	15 (17,0)	p=1,00
Infection invasive ^a	2 (16,7)	13 (14,8)	p=1,00
Bactériémie ^a	2 (16,7)	10 (11,4)	p=0,63
Sepsis ^a	2 (16,7)	13 (14,8)	p=1,00
Fièvre ou hypothermie ^a	5 (41,7)	53 (63,9)	p=0,21
Données manquantes ^c	0	5	
Syndrome inflammatoire ^a	11 (100)	71 (96,0)	p=1,00
Données manquantes ^c	1	14	
Selles sanglantes ^a	2 (16,7)	20 (23,5)	p=0,73
Données manquantes ^c	0	3	
Leucocytes dans les selles ^a	2 (16,7)	36 (43,9)	p=0,11
Données manquantes ^c	0	6	
Nécessité de réhydratation intra-veineuse ^a	5 (45,5)	41 (65,1)	p=0,31
Données manquantes ^c	1	25	
Durée d'hospitalisation ^b	2,5 (5)	4 (6)	p=0,39
Infection avec le sérotype Typhimurium ^a	7 (58,3)	29 (33,0)	p=0,11
DT104 phage type ^a	5 (41,6)	4 (4,5)	p=0,001
Infection par <i>Salmonella</i> ayant au moins une résistance ^a	12 (100)	67 (76,1)	p =0,07
Infection par <i>Salmonella</i> penta – résistante (ACSSuT) ^{a, d}	6 (50)	3 (3,4)	p < 0,001

^a Les valeurs correspondent au nombre de patients (%).

^b Les valeurs correspondent à des médianes (intervalle interquartile).

^c Données non présentes dans le dossier du patient

^d ACSSuT : Amoxicilline, Chloramphénicol, Streptomycine, Sulfamides et Tétracyclines

^e L'analyse statistique univariée a été effectuée par le test exact de Fisher pour comparer les nombres de patients et par le test de Kruskal-Wallis pour comparer les médianes. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

b. Implication de l'îlot de résistance dans la sévérité de la maladie

Du point de vue clinique, il n'a pas été observé davantage d'infections invasives dans la population infectée par des *S. enterica* avec îlot de résistance que dans celle infectée par des *S. enterica* sans îlot. Ainsi, ni l'analyse univariée, ni l'analyse multivariée ajustée sur l'âge, le sexe et sur le statut immunitaire n'ont pu mettre en évidence de relation entre la présence de l'îlot de résistance et une infection invasive [ORa = 1,35 (IC_{95%} : 0,31 – 5,86)], ou une bactériémie [ORa = 1,82 (IC_{95%} : 0,39 – 8,46)], ou un sepsis [ORa = 1,28 (IC_{95%} : 0,21 – 7,68)]. Néanmoins, les selles des patients infectés par des *S. enterica* avec îlot ont tendance à contenir moins de leucocytes (16,7% vs 43,9%) (p = 0,11) (Tableau 13).

c. Rôle de l'antibiorésistance sur la sévérité de la maladie

La proportion de *S. enterica* sensible à tous les antibiotiques était de 21 % (n = 21) (Tableau 11). Dans notre étude, les patients infectés par une souche résistante de *S. enterica* avec ou sans îlot de résistance développaient significativement moins d'infections invasives [ORa = 0,16 (IC_{95%} : 0,03 – 0,72)], de bactériémies [ORa = 0,10 (IC_{95%} : 0,02 – 0,55)] et de sepsis [ORa = 0,20 (IC_{95%} : 0,05 – 0,80)] que les patients infectés par une souche sensible (analyse multivariée ajustée sur l'âge, le sexe ou le statut immunitaire). L'analyse univariée est rapportée dans le Tableau 14. Devant ces résultats surprenants, une hypothèse sera émise dans la discussion.

Tableau 14 : Implication de l'antibiorésistance dans la sévérité de la maladie^a

Variabes	Infection par une souche multi-sensible (n = 21)	Infection par une souche ayant au moins une résistance (n = 79)	Analyse univariée valeur de p ^d
Age (années) ^a	22,3 (53,7)	15,8 (54)	0,26
Sex ratio (H/F) ^b	12/9	35/44	0,28
Immunodépression ^b	1 (4,8)	16 (20,3)	0,11
Infection invasive ^b	6 (28,6)	9 (11,4)	0,08
Bactériémie ^b	6 (28,6)	6 (7,6)	0,02
Sepsis ^b	6 (28,6)	9 (11,4)	0,08
Syndrome inflammatoire ^b	19 (100)	63 (95,5)	1,00
Données manquantes ^c	2	13	
Fièvre ou hypothermie ^b	13 (65)	45 (60)	0,80
Données manquantes ^c	1	4	

^a Les valeurs correspondent à des médianes (intervalle interquartile).

^b Les valeurs correspondent au nombre de patients (%).

^c Données non présentes dans le dossier du patient

^d L'analyse statistique univariée a été effectuée par le test exact de Fisher pour comparer les nombres de patients et par le test de Kruskal-Wallis pour comparer les médianes. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

d. Facteurs de risque de développer une infection invasive par une salmonelle mineure

Les patients âgés présentaient plus d'infections invasives ($p = 0,03$), de sepsis ($p = 0,01$) et de syndromes inflammatoires ($p = 0,04$) que les sujets jeunes (Tableau 15). Les sujets immunodéprimés présentaient également plus d'infections invasives ($p = 0,003$), de bactériémies ($p = 0,03$) et de sepsis ($p = 0,02$) (Tableau 16). Ces patients étaient plus âgés que les patients immunocompétents ($p = 0,02$). L'analyse multivariée ajustée sur l'âge et le sexe confirme que les immunodéprimés développaient significativement plus d'infections invasives [ORa = 6,30 (IC_{95%} : 1,62 – 24,46)] et plus de sepsis [ORa = 3,79 (IC_{95%} : 1,03 – 13,91)]. Bien que la relation ne fût pas significative, il semblerait que les patients immunodéprimés aient aussi davantage de bactériémies [ORa = 4,17 (IC_{95%} : 0,99 – 17,57)].

Tableau 15 : Implication de l'âge des patients dans la sévérité de la maladie

Variables (n : nombre de patients)	Médianes de l'âge ^a	iqr ^a	Valeurs de p ^b
Infection invasive			
Non (n = 85)	12,7	53,5	p = 0,03
Oui (n =15)	55,6	61,4	
Bactériémie			
Non (n = 88)	15,5	53,6	p = 0,08
Oui (n = 12)	43,1	64,6	
Sepsis			
Non (n = 85)	12,7	48,8	p = 0,01
Oui (n = 15)	57,1	46,1	
Fièvre ou hypothermie			
Non (n = 37)	29	58	p = 0,24
Oui (n = 58)	9,1	51,7	
Syndrome inflammatoire			
Non (n = 3)	2,6	1,7	p = 0,04
Oui (n = 82)	24,3	56,6	

^a Données présentées en années

^b L'analyse statistique univariée a été effectuée par le test de Kruskal-Wallis pour comparer les médianes d'âge. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

Tableau 16 : Implication de l'immunodépression dans la sévérité de la maladie

Variables	Immunodépression		Valeurs de p ^d
	Oui (n= 17)	Non (n = 83)	
Age (années) ^a	54,2 (35,7)	9,7 (54,4)	p = 0,02
Infection invasive ^b	7 (41,2)	8 (9,6)	p = 0,003
Bactériémie ^b	5 (29,4)	7 (8,4)	p = 0,03
Sepsis ^b	6 (35,3)	9 (10,8)	p = 0,02
Fièvre or hypothermie ^b	7 (50,0)	51 (63,0)	p = 0,39
Données manquantes ^c	3	2	
Syndrome inflammatoire ^b	16 (100)	66 (95,7)	p = 1,00
Données manquantes ^c	1	14	

^a Les valeurs correspondent à des médianes (intervalle interquartile).

^b Les valeurs correspondent au nombre de patients (%).

^c Données non présentes dans le dossier du patient

^d L'analyse statistique univariée a été effectuée par le test exact de Fisher pour comparer les nombres de patients et par le test de Kruskal-Wallis pour comparer les médianes. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives

4. Discussion

Notre étude est la première à évaluer la prévalence des îlots de résistance chez *S. enterica* sans critère de sélection et sur une période consécutive. Bien qu'il soit difficile de comparer notre étude aux précédentes, la prévalence des îlots était plutôt élevée (12%) mais restait comparable à celle retrouvée au Pays-Bas (7,9%) (Vo et al. 2006) (cf paragraphe II.D.3). D'autres auteurs rapportent des taux plus élevés probablement du fait d'une sélection des souches sur la résistance. Ainsi une étude australienne évaluée à 8/39 soit 20,5% la prévalence d'îlot de résistance parmi les souches avec au moins une résistance (Levings et al. 2005). Une autre étude internationale observe un taux égal à 19% parmi des souches penta-résistantes (ACSSuT) et porteuses d'un intégron de classe 1 d'origine inconnue (Krauland et al. 2009). Dans notre étude, les souches penta-résistantes étaient très souvent porteuses d'îlots (deux tiers). Cependant, considérer uniquement les souches avec penta-résistance sous-estime largement le nombre de souches avec îlot puisque dans notre étude la moitié des souches avec îlot n'était pas penta-résistantes. Comme dans les travaux précédents, il est observé que la plupart des souches avec îlot (13/17 soit 76,4%) appartenait au sérotype Typhimurium (Vo et al. 2006 ; Krauland et al. 2009). Pour ceux qui se sont intéressés uniquement aux souches de *S. Typhimurium*, les prévalences étaient de 69/193 soit 35,8% en Slovaquie et de 57% en France (Majtánová, Majtán, and Majtán 2010; Bugarel et al. 2011). En revanche, cette prévalence était plus faible dans notre étude : 7/29, soit 19,4%. Enfin, nous avons confirmé le lien entre les îlots de résistance et le lysotype DT104 puisqu'une association forte a été retrouvée $p = 0,001$. Ces résultats vont dans le sens de deux études qui évoquent ce lien. Une première étude française sur des souches de *S. Typhimurium* du bétail montre que 138 souches sur 143 avec îlot, soit 96,5%, appartiennent au lysotype DT104 (Targant et al. 2010b). Une deuxième a estimé par une approche Bayésienne que seulement 4% des souches

de *S. Typhimurium* DT104 humaines isolées en Ecosse entre 1990 et 2004 n'étaient pas porteuses de l'îlot (Mather et al. 2011). Il est important de souligner que les souches de *S. enterica* n'étaient *a priori* pas reliées entre-elles à l'exception de 2 fratries (4 cas). Un frère et une sœur étaient infectés par une souche de *S. St Paul* avec îlot. C'est la première fois qu'un îlot de résistance est décrit dans le sérotype St Paul.

Concernant la résistance, il est observé quelques différences par rapport aux chiffres du rapport européen de l'EFSA (European Food Safety Authority de 2014). Ainsi, dans notre étude, le pourcentage de souches résistantes à l'acide nalidixique était plus faible (9% vs 30%) alors que les pourcentages de souches résistantes à l'ampicilline (37% vs 29,1%), aux cyclines (61% vs 40%) et aux sulfamides (52% vs 38%) étaient plus élevés (European Food Safety Authority 2016). Le pourcentage de souches penta-résistantes (ACSSuT) était plus élevé (9%) que celui des Etats-Unis (3,4%) (Michael and Schwarz 2016). Deux souches (2%) étaient résistantes aux céfotaxime par production d'une BLSE. Ce pourcentage de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération était comparable au rapport européen de l'EFSA (1,1%) et à celui des Etats-Unis (2,5%) (European Food Safety Authority 2016; Michael and Schwarz 2016).

Du point de vue clinique, nos résultats confirment que les personnes âgées et les personnes immunodéprimées développent plus d'infections invasives (Crump et al. 2015 ; Asmar and Abdel-Haq 2016). Cette étude souligne notamment le fort risque de développer une infection invasive à salmonelle mineure par les personnes immunodéprimées puisque l'odds ratio ajusté sur l'âge et le sexe est égal à 6,30 (IC_{95%} : 1,62 – 24,46). En revanche, notre étude objective que les patients infectés par une souche ayant au moins une résistance acquise développent significativement moins d'infections invasives (9/79, soit 11,4%) [ORa = 0,16 (IC_{95%} : 0,03 – 0,72)] que les patients infectés par une souche multisensible (6/21, soit 28,6%). Ces résultats sont opposés à ceux observés dans les études précédentes qui observent

un excès de mortalité ou un taux d'hospitalisation plus élevé chez les patients infectés par une souche multirésistante (Helms et al. 2002 ; Varma et al. 2005 ; Martin et al. 2004). Nos résultats pourraient être expliqués par le coût de l'antibiorésistance. En effet, il a été démontré que l'antibiorésistance diminue la croissance de *S. Typhimurium* et limite le développement de l'infection chez les poulets, les souris ou chez *C. elegans* (Andersson and Hughes 2010; Paulander et al. 2007).

Enfin, il n'a pas été mis en évidence d'implication de l'îlot de résistance sur la sévérité de la maladie. Pourtant, certaines études ont montré que les souches avec îlot de résistance étaient plus invasives après exposition de *S. enterica* aux protozoaires du rumen chez les vaches. Cette virulence est en partie attribuée à la présence de l'ORF S013 (S. A. Carlson et al. 2007 ; Ogunleye and Carlson 2012; Rasmussen et al. 2005). D'autres auteurs ont montré que la région MDR de l'îlot jouait un rôle direct sur la virulence de *S. Typhimurium* DT104 chez *C. elegans* (Sahu et al. 2013). Enfin, Golding *et al.*, ont observé que la présence d'îlot modifie l'expression de gènes chromosomiques. Une régulation négative de l'îlot de résistance sur certains gènes aboutit à une réduction du chimiotactisme et de l'expression des flagelles favorisant ainsi un échappement de *S. enterica* à la réponse immunitaire de l'hôte (Golding et al. 2007). Ces résultats pourraient expliquer le fait que les selles des patients infectés par une souche avec îlot ont tendance à avoir moins de leucocytes (16,7%) que celles de ceux infectés par une souche sans îlot (43,9%). Mais notre étude reste limitée du fait du nombre de cas (n=100) et du nombre de souches avec îlot (n= 12) ; il serait intéressant de confirmer ces résultats en réalisant une étude plus large.

5. Conclusion

Notre étude rapporte une prévalence de souches de *S. enterica* avec îlot relativement élevée (12%). Ces souches appartenaient à différents sérotypes et présentaient différents phénotypes de résistance. Le tiers des souches avec îlot appartenait au clone de *S. Typhimurium* DT104 penta-résistant (ACSSuT). Notre étude donne un aperçu de la dissémination des îlots de résistance au sein des souches cliniques qui est probablement le reflet de la situation chez l'animal. Dans notre étude, la présence d'îlot de résistance ne semble pas influencer sur la sévérité des infections chez les patients. Cependant, il est important de confirmer ces résultats par une étude multicentrique et prospective.

B. Comparaison de la survie de *C. elegans* en présence d'une souche avec îlot et de sa souche isogénique excisée de l'îlot

1. Objectifs

Cette étude a pour but de répondre à la question suivante : « l'îlot de résistance confère-t-il de la virulence à *S. Typhimurium* DT104 ou à *P. mirabilis* ? » Pour cela, nous avons choisi de réaliser des études de survie avec le modèle *C. elegans* déjà utilisé dans les travaux de Sahu *et al.* (Sahu et al. 2013). Le travail de comparaison a été réalisé avec des couples de souches isogéniques : avec et sans îlot (souches obtenues par excision cf chapitre V).

2. Matériels et méthodes

a. Souches utilisées

Les couples suivants ont été utilisés pour l'analyse de la virulence :

- la souche de *S. Typhimurium* DT104 (ST8BAZJU) avec un îlot de type SGII et sa souche isogénique excisée de l'îlot (ST8BAZJU Δ SGII) (Tableau 10)
- la souche de *P. mirabilis* (PmSCO) avec SGII-H dont le squelette incomplet et sa souche isogénique excisée de l'îlot (PmSCO Δ SGII) (Tableau 10)

La souche de *E. coli* OP50 a été utilisée comme témoin pour chaque étude de survie.

Une à deux colonies de ces souches ont étéensemencées dans 10 ml de bouillon Luria Bertani (LB) (Annexe 11) et incubées à 37°C pendant 12 h. Ces cultures ont été conservées à 4°C et ont été reprises jusqu'à la fin des essais de survie.

La souche mutante *glp-4* de *C. elegans* a été utilisée pour les essais de virulence. Cette souche a l'avantage, contrairement à la souche sauvage N2, de se multiplier à 15°C et d'être stérile à 25°C ce qui facilite le comptage des nématodes au cours des essais de survie. *S. enterica* est aussi pathogène chez la souche *glp-4* que chez la souche N2 (Tenor et al. 2004). Ces souches ont été fournies par le centre de référence de *C. elegans* (CGC : *Caenorhabditis* genetics center). Les techniques de culture et de synchronisation utilisées dans notre étude se sont basées sur les techniques expliquées dans le chapitre du « wormbook » sur l'élevage de *C. elegans* (Stiernagle 2006).

b. Synchronisation de *C. elegans*

Il est possible de synchroniser *C. elegans* pour que les nématodes aient le même âge. Pour cela, 6 boîtes de pétri contenant une gélose de milieu pour nématodes (NGM) ont été préalablementensemencées au râteau avec 100 µl de culture de *E. coli* OP50 et incubée à 37°C pendant 12 h. Puis *C. elegans* (*glp-4*) a été cultivé sur ces géloses pendant 5 jours à 15°C (Annexe 11). Cette culture fraîche de 5 jours permettait d'obtenir un nombre suffisant d'œufs de *C. elegans*. Ces œufs ont été récupérés en lavant chaque gélose avec 4 ml d'eau stérile. Les suspensions de nématodes ont été chacune mise dans un tube dans lequel 1,5 ml d'une solution de Javel à 2,6% de chlore actif (1 ml) et de soude 1 M (0,5 ml) a été ajoutée pour décontaminer les œufs, et tuer les larves et les vers adultes. Après 10 minutes de contact et avec agitation toutes les 2 minutes au vortex, la suspension a été centrifugée à 1300 g pendant 90 secondes afin d'obtenir un culot d'œufs. Les œufs ont été lavés avec 5 ml d'eau stérile et centrifugés à 1300 g pendant 90 secondes puis le surnageant a été éliminé. Cette étape a été répétée une fois.

Pour les trois premiers essais de survie avec *S. Typhimurium* pris en compte dans l'étude, les culots d'œufs obtenus ont été incubés sous agitation pendant 24 h à température ambiante dans 250 ml de milieu liquide M9 favorable à leur éclosion afin de les amener au stade larvaire L1 (Annexe 11). Le milieu a été mis pendant 15 minutes dans la glace afin que les larves se déposent au fond. Puis le surnageant a été retiré. Le milieu décanté a été centrifugé pendant 2 minutes et 30 secondes à 1150 g pour concentrer les larves. Le culot a été récupéré etensemencé dans 250 mL de milieu S-basal contenant le culot d'une culture fraîche de 2 l de *E. coli* OP50 préalablement incubée pendant 12 h à 37°C (Annexe 11). Cette culture de larves de *C. elegans* a été incubée sous agitation pendant 72 h à température ambiante afin que les larves deviennent des vers adultes. Ces adultes ont été récupérés après centrifugation à 1150 g pendant 2 minutes et 30 secondes. L'obtention de ces vers adultes en quantité suffisante étant

difficile par cette technique nous avons modifié le protocole pour les essais suivants une fois les œufs décontaminés et lavés. Ainsi, le culot d'œufs a été ensemencé sur des géloses (au lieu d'être ensemencé en milieu liquide). Ces géloses NGM ont été au préalable ensemencées au râteau par 100 µL de la culture de *E. coli* OP50 en bouillon et incubées 12h auparavant. La culture d'œufs a été incubée à 27°C pendant 96 h pour obtenir des vers adultes.

c. Essais de survie

Pour chacune des méthodes, des géloses NGM ont été ensemencées au râteau avec 50 µl de culture conservée à 4°C de chacune des souches à tester et incubées à 37°C pendant 12 h. Dix vers ont été transférés à l'aide de cure-dents en bois stériles. Ainsi pour chaque essai de survie, le couple de souches isogéniques avec et sans îlot et le témoin *E. coli* OP50 ont été testés en parallèle. Les boîtes contenant les géloses NGM ensemencées par chacune de ces 3 souches ont été numérotées de 1 à 3 afin que l'essai soit réalisé en aveugle. Ces géloses NGM ont été incubées à 27°C jusqu'à la fin de l'essai. Le nombre de vers vivants, décédés ou disparus a été compté 2 fois par jour les 3 premiers jours, puis une fois par jour jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de vers vivants. Les vers étaient considérés comme décédés s'ils ne bougeaient pas pendant 24 h même après stimulation.

Cinq essais de survie ont été réalisés avec un total de 125 vers testés pour chacune des souches du couple isogénique de *S. Typhimurium* DT104 (ST8BAZJU) et pour le témoin *E. coli* OP50. Pour le couple isogénique de *P. mirabilis* PmSCO et le témoin, 4 essais de survie ont été réalisés, avec un total de 110 vers testés par souche.

d. Analyse statistique

Les courbes de survie ont été obtenues par la méthode de Kaplan Meier. La comparaison de survie de *C. elegans* entre les différentes souches testées a été réalisée par le test de Log rank pour l'analyse univariée et par le test de Cox pour l'analyse multivariée pour l'ajustement en fonction des essais (variabilité inter-essais) et des boîtes (plusieurs boîtes utilisées pour une même souche entraînant une variabilité intra-essai). Pour valider cette analyse qui se base sur l'hypothèse de la proportionnalité des risques instantanés (hazard ratio), la méthode des résidus de Schoenfeld a été utilisée pour vérifier cette hypothèse. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel Stata[®]. Les vers disparus ont été considérés dans l'analyse de survie comme une censure.

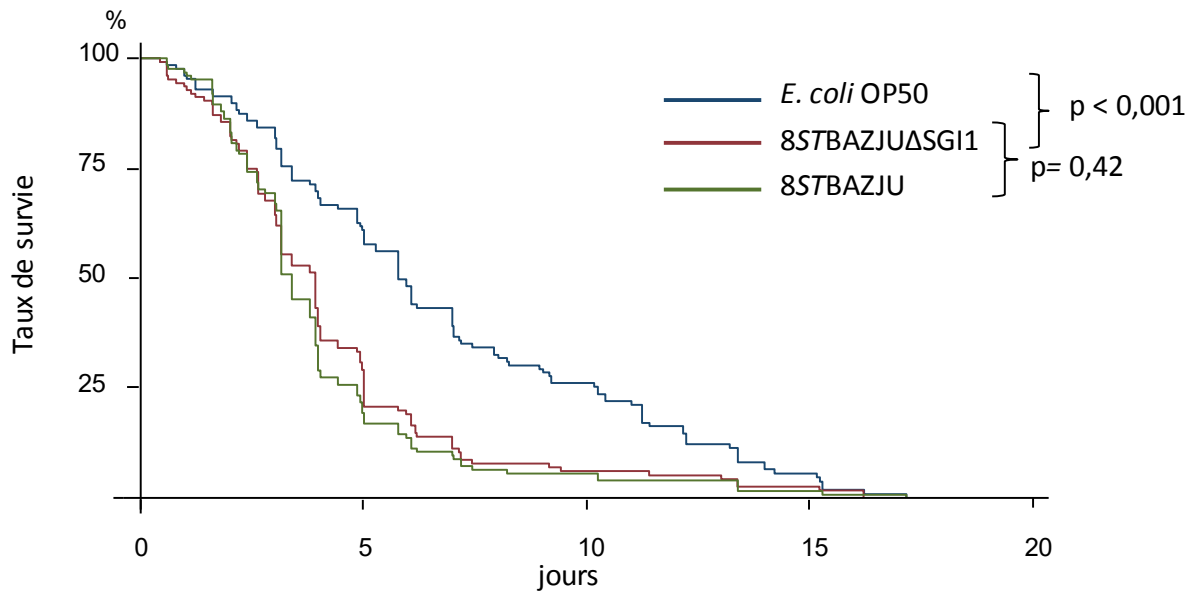


Figure 49 : Courbes de survie de *C. elegans* avec *S. Typhimurium* 8STBAZJU avec et sans SGII et le témoin *E. coli* OP50

La valeur de p a été obtenue par le test de Log rank et est considérée comme statistiquement significative si $p < 0,05$.

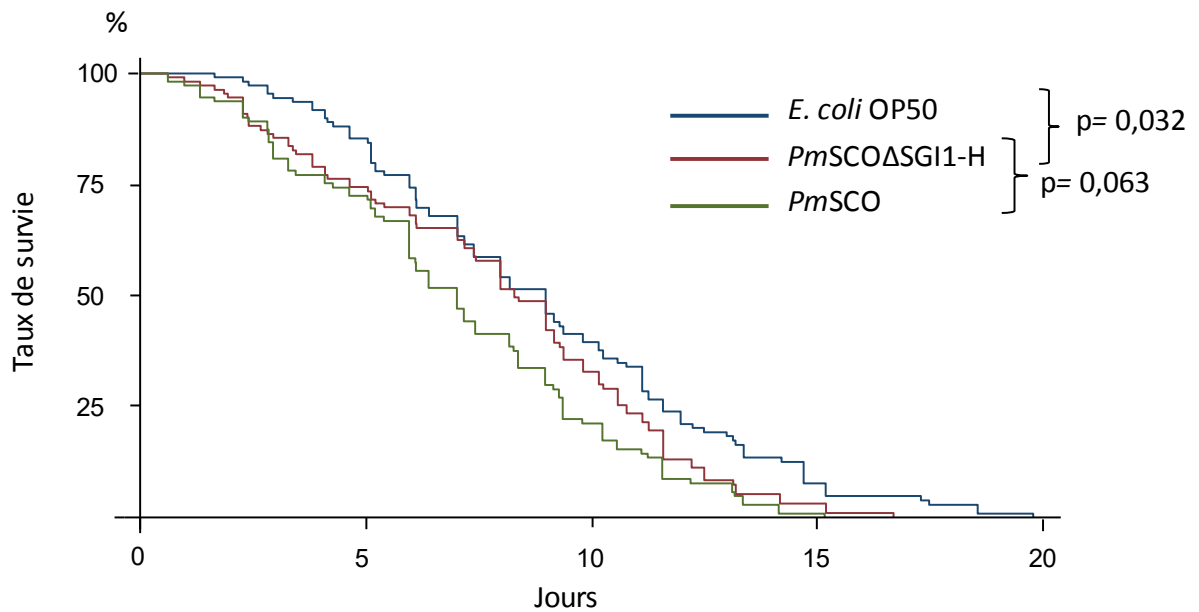


Figure 50: Courbes de survie de *C. elegans* avec *P. mirabilis* *PmSCO* avec et sans SGII-H et le témoin *E. coli* OP50

La valeur de p a été obtenue par le test de Log rank et est considérée comme statistiquement significative si $p < 0,05$.

3. Résultats

C. elegans nourri par *S. Typhimurium* DT104 (ST8BAZJUΔSGI1) avait une durée de vie significativement plus courte [médiane = 3,9 jours (IC_{95%}: 3,3 – 4,5)] que s'il était nourri par le témoin *E. coli* OP50 [médiane = 5,8 jours (IC_{95%}: 5,2 – 6,4)] ($p < 0,001$). En revanche, il n'a pas été mis en évidence de différence significative de survie de *C. elegans* entre ceux nourris par la souche ST8BAZJU [médiane = 3,4 jours (IC_{95%}: 3,0 – 3,8)] et ceux nourris par la souche ST8BAZJUΔSGI1 [médiane = 3,9 jours (IC_{95%}: 3,3 – 4,5)] ($p = 0,42$) (Figure 49). Ces résultats statistiques ont été obtenus après analyse multivariée par ajustement sur les essais et sur le nombre de boîtes. Ceci est important car il a été observé une variabilité inter-essai ($p < 0,001$) et une variabilité intra-essai (variabilité en fonction de la boîte) ($p = 0,008$) au cours des essais de survie avec le couple de *S. Typhimurium*. A noter que 10 vers ont été portés disparus (4 pour *E. coli* OP50, 5 pour ST8BAZJUΔSGI1 et 1 pour ST8BAZJU avec SGI1).

En ce qui concerne les essais de survie de *C. elegans* avec *P. mirabilis*, la durée de vie de *C. elegans* est aussi significativement plus courte lorsque les vers sont nourris par *PmSCO*ΔSGI1-H [médiane = 8,3 jours (IC_{95%}: 7,2 – 9,3)] que lorsqu'ils sont nourris par *E. coli* OP50 [médiane = 9,0 jours (IC_{95%}: 7,8 – 10,1)] ($p = 0,032$) (Figure 50). Il a été constaté au microscope que les vers nourris par *P. mirabilis* avaient leurs organes complètement dégradés jusqu'à ce qu'ils ne soient plus visibles au moment de leur décès. En ce qui concerne la comparaison de survie entre *C. elegans* nourris par *PmSCO* et ceux nourris par *PmSCO*ΔSGI1-H, il a été mis en évidence que la durée de vie de *C. elegans* avait tendance à être plus courte en présence de SGI1-H [médiane = 7,0 jours (IC_{95%}: 6,1 – 8,0)] qu'en son absence [médiane = 8,3 jours (IC_{95%}: 7,2 – 9,3)] ($p = 0,063$). Ces résultats statistiques ont été aussi obtenus après analyse multivariée. De même que pour les essais de survie avec *S.*

Typhimurium, il existait aussi une variabilité inter-essai ($p < 0,001$) mais il n'y avait pas de variabilité intra-essai ($p = 0,77$). Enfin, 10 vers ont aussi été portés disparus (2 pour *E. coli* OP50, 3 pour *PmSCO*ΔSGII-H et 5 pour *PmSCO* avec SGII-H).

4. Discussion

Dans notre étude, il a été observé pour la première fois que *P. mirabilis* était pathogène pour *C. elegans*. En effet, les vers mouraient plus vite en sa présence. Il a déjà été observé que *P. penneri* était pathogène pour *C. elegans* (Drzewiecka 2016). Le mécanisme de cette pathogénicité de *P. mirabilis* sur *C. elegans* reste à étudier. Elle pourrait être en partie liée à la sécrétion par *P. mirabilis* de protéases (ex : hyaluronidase) qui dégraderait les tissus de *C. elegans*. En effet, au cours de ces essais de survie avec *C. elegans*, il a été objectivé que les organes étaient complètement dégradés. Il serait intéressant d'étudier si *P. mirabilis* est capable de pénétrer dans le tube digestif de *C. elegans* sous forme intacte (non altéré par le broyeur) et de s'y multiplier comme *S. Typhimurium* (Aballay, Yorgey, and Ausubel 2000). La virulence de *P. mirabilis* semble toutefois moins élevée chez *P. mirabilis* (médiane = 8,3 jours) que chez *S. Typhimurium* (médiane = 5,1 jours) (Aballay, Yorgey, and Ausubel 2000).

Nous avons également mis en évidence qu'en présence de SGII-H, *P. mirabilis* avait tendance à tuer plus rapidement *C. elegans*. Cette observation est en adéquation avec des études précédentes menées sur *S. enterica* dans le modèle bovin qui montrent une plus grande virulence chez les veaux. Cette virulence serait notamment liée à la présence de S013 et d'un autre gène de SGII non identifié (S. A. Carlson et al. 2007; S. A. Carlson, McCuddin, and Wu 2005; Rasmussen et al. 2005; Ogunleye and Carlson 2012). Une autre étude avait observé que la région MDR de SGII était aussi impliquée dans la virulence de *S. Typhimurium* sur *C. elegans* (Sahu et al. 2013).

Notre étude suggère que SGI1-H confère de la virulence à *P. mirabilis* comme précédemment décrit pour SGI1 chez *S. enterica* dans le même modèle. La région S005 à S009 n'interviendrait donc pas dans la virulence.

En ce qui concerne les essais de survie avec *S. Typhimurium*, notre étude confirme que *S. Typhimurium* tue plus rapidement *C. elegans* que *E. coli* OP50. En revanche, contrairement aux travaux de Sahu et al., nous n'avons pas observé d'influence de SGI1 sur la durée de survie de *C. elegans* (Sahu et al. 2013).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat différent par rapport à l'étude précédente. La première hypothèse serait que la souche étudiée ST8BAZJU aurait des propriétés intrinsèques de virulence (hors îlot) tellement importante que la virulence apportée par SGI1 serait négligeable en regard de la virulence de la souche. Ainsi, dans notre étude la médiane de survie de *C. elegans* avec ST8BAZJU était beaucoup plus faible (3,9 jours) que celle observée dans une étude précédente (5,1 jours) (Aballay, Yorgey, and Ausubel 2000). Il est important de souligner que cette souche a été isolée chez un enfant de 15 ans immunodéprimé (traitement par corticoïdes et tacrolimus à la suite d'une greffe de moelle osseuse). Ce patient a eu une infection ostéo-articulaire de l'épaule dans les suites d'une bactériémie en dépit d'un traitement de 21 jours par ceftriaxone. Il serait intéressant de réaliser d'autres essais de survie de *C. elegans* avec une autre souche de *S. Typhimurium* isolée par exemple au cours d'une diarrhée.

La seconde hypothèse serait que les vers soient décédés trop rapidement pour mettre en évidence une différence de survie. Dans nos expériences avec *S. Typhimurium*, il est observé que la médiane de survie de *E. coli* OP50 est relativement courte (5,8 jours) par rapport à celle de nos essais avec *P. mirabilis* (9 jours) et celle observée dans une autre étude (9,9 jours). Au cours des premiers essais, le transfert des vers adultes du milieu liquide aux géloses était

laborieux et a pu abimer les vers. La manipulation des vers est délicate et pourrait expliquer en partie les variabilités inter-essais et intra-essai observées.

5. Conclusion

S. enterica et *P. mirabilis* sont des pathogènes de *C. elegans*. Chez *P. mirabilis*, la présence d'un îlot aurait tendance à augmenter sa virulence. En revanche, nous n'avons pas confirmé le lien entre virulence et présence de SGII chez *S. Typhimurium*. D'autres études sont nécessaires pour approfondir le rôle exact des îlots de résistance dans l'expression du pouvoir pathogène de *S. enterica* en étudiant notamment d'autres souches et d'autres sérotypes.

VII. Discussion générale

« Les îlots de résistance de type SGI1 (*Salmonella* Genomic Island 1) et apparentés dans des souches humaines cliniques de *P. mirabilis* et *S. enterica* » est un sujet vaste et peut-être un peu ambitieux. Ainsi ce travail est loin d'être exhaustif mais il a essayé d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes. Est-il nécessaire de s'intéresser à ces îlots en clinique humaine ? Jouent-ils un rôle dans la résistance des souches humaines cliniques ou sont-ils des curiosités ? Exercent-ils une fonction dans la pathogénèse des souches au cours d'une infection chez l'homme ?

La réponse à la première question est plutôt facile: « oui, il est nécessaire de s'y intéresser! ». Objectivement, les chiffres montrent que ces îlots sont fréquemment rencontrés dans les souches humaines cliniques. En effet, la prévalence varie de 5 à 16% chez *P. mirabilis* ayant acquis au moins une résistance en fonction des deux hôpitaux étudiés. Chez *S. enterica*, sa prévalence est de 12% quel que soit le sérotype et le profil de résistance au CHU de Dijon. Ces chiffres de prévalence sont loin d'être représentatifs de ce qui se passe dans le monde car ils représentent un faible nombre de souches humaines isolées dans seulement deux sites hospitaliers français. Néanmoins, ils ont l'avantage d'être issus d'études portant sur des souches ne provenant pas de collection contrairement à tous les travaux réalisés jusqu'alors. Nous rappelons d'ailleurs que le critère de penta-résistance, utilisé dans les études précédentes n'est pas un bon marqueur pour la recherche d'îlot (Krauland et al. 2009). Comme précédemment décrit, nous avons observé que cette prévalence est particulièrement importante chez *S. Typhimurium* DT104 (5/9) confirmant la présence d'un clone porteur de cet îlot (R. M. Hall 2010).

Les profils génotypiques des souches de *P. mirabilis* suggèrent qu'il pourrait aussi exister des souches clonales porteuses d'îlots comme évoqué précédemment (Schultz et al. 2015). Toutefois, ces premiers résultats doivent être confirmés par des analyses génotypiques plus discriminantes menées à plus grande échelle. La présence de ces clones pourrait-être le reflet d'un avantage procuré par l'îlot à la bactérie pour sa survie dans l'environnement (Juhas et al. 2009). La variété des profils génotypiques des souches de *P. mirabilis* en dehors des clones suggère un transfert horizontal des îlots.

Dans notre étude, il a été observé que les PGI1 étaient répandus chez *P. mirabilis* (un tiers des souches avec îlot). Ont-ils une spécificité d'hôte ? Il est prématuré de répondre car la description de cet îlot est très récente et seulement 4 publications en font état. A ce jour, PGI1 n'a pas encore été recherché chez *S. enterica* et sa recherche apportera un élément de réponse : soit PGI1 est spécifique de *P. mirabilis*, soit il est aussi présent chez *S. enterica* comme SGI1 est présent chez *P. mirabilis*.

Le rôle joué par les îlots dans la résistance est en revanche incontestable. Le premier îlot décrit était associé à une penta-résistance (ACSSuT). Les conséquences en médecine humaine étaient peu importantes pour la prise en charge thérapeutique des infections graves dans les pays développés. Les premiers variants ne portaient pas de déterminants génétiques de la résistance aux molécules d'intérêt de l'arsenal antibactérien. Manifestement une évolution s'est opérée avec les descriptions successives de SGI1-S, -V, -X, PGI1-*PmPEL* et maintenant SGI1-K7 qui portent les gènes *rmtC*, *bla*_{VEB-6}, *qnrA1*, *qnrB2*, *bla*_{NDM-1} ou *bla*_{CTX-M-15} pouvant conduire à de réelles impasses thérapeutiques (Wilson and Hall 2010; Siebor and Neuwirth 2011; Lei et al. 2014; Girlich et al. 2015).

De nombreuses régions MDR complexes possédant des structures génétiques retrouvées préalablement sur des plasmides sont de plus en plus souvent rapportées (Siebor and Neuwirth 2011; Girlich et al. 2015). Ces travaux ainsi que les nouveaux variants décrits dans notre

étude montrent la grande plasticité de cette région. Notre étude souligne également le rôle essentiel joué par les IS26 dans l'évolution de ces régions MDR et dans l'acquisition de gènes de résistance en provenance de plasmides présents dans des clones d'entérobactéries répandus comme *E. coli* ST131 ou *K. pneumoniae* ST307 (Villa et al. 2017 ; Woodford et al. 2009). Il est ainsi capital de s'intéresser à ces îlots en médecine humaine.

Les îlots sont des structures qui assurent une stabilité certaine à ces gènes de résistance et leur offre l'opportunité d'un transfert. En effet, nous avons montré que SGI1 et les îlots apparentés étaient capables d'être transférés d'une entérobactérie à une autre en présence d'un plasmide IncA/C. Ils peuvent aussi être complètement excisés de la cellule en présence de pression de sélection antibiotique favorable au plasmide IncA/C. Ces îlots sont instables en présence du plasmide IncA/C et peuvent alors diffuser au sein d'autres entérobactéries. A ce jour, ils n'ont pour autant pas été décrits *in vivo* dans d'autres entérobactéries que *S. enterica*, *P. mirabilis* et *M. morganii*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela. Tout d'abord, ces îlots n'ont peut-être pas été assez recherchés dans les entérobactéries. L'autre hypothèse serait que les plasmides IncA/C très prévalent chez *S. enterica*, ont une faible prévalence chez les autres entérobactéries (Lindsey et al. 2009). Ou alors ces îlots ne seraient peut-être pas stables chez celles-ci. Cette hypothèse devra être vérifiée par repiquages successifs sans pression de sélection antibiotique des souches de *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. stuartii* et *S. marcescens* dans lesquelles nous avons transféré SGI1 ou PGI1. Enfin, ces îlots pourraient ne pas apporter suffisamment de bénéfice à ces autres entérobactéries.

Concernant un éventuel lien entre îlot et virulence, nos résultats sont mitigés. En effet, nous n'avons pas pu observer une telle relation dans notre étude rétrospective. Cette étude est limitée par le nombre de patients. Une augmentation de la pathogénicité de *S. Typhimurium* DT104 en présence de SGI1 n'a pas non plus été mise en évidence dans nos essais sur le

modèle *C. elegans* contrairement aux résultats observés par Sahu et al (Sahu et al. 2013). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats différents. Il est possible que la souche étudiée dans notre étude ait eu des propriétés intrinsèques de virulence particulièrement importantes en regard de celles apportées par l'îlot. Une autre hypothèse serait que le plasmide inséré dans la souche excisée de l'îlot apporte une virulence. Il a été montré que SGII régulait l'expression de certains gènes chromosomiques de *S. enterica* (Golding et al. 2007). Il est possible que plusieurs facteurs environnementaux ou présents *in vivo* interagissent aussi dans l'expression de ces gènes notamment ceux codant pour des facteurs de virulence. Cette relation entre îlot et virulence de *S. enterica* serait ainsi plus complexe. Les essais réalisés avec *P. mirabilis* suggèrent que ces îlots pourraient toutefois conférer plus de virulence aux souches porteuses de ces îlots. Cette dernière étude nous encourage à poursuivre les travaux pour répondre à la dernière question.

Une question reste sans réponse : quelle est l'origine des îlots de résistance ? La présence d'ORFs homologues entre SGII et PGII nous permettent d'évoquer l'hypothèse d'une origine ancestrale commune. En effet, certaines ORFs [S020 (P018), S025 (P022), S026 (P023) et S027 (P024)] étaient très conservées (>90% d'identité) ce qui suggère que ces ORFs sont essentielles pour ces îlots. Ainsi, les ORFs S025 et S026 codent pour un système toxine/antitoxine qui favorise la stabilité de l'îlot en présence du plasmide IncA/C (Huguet et al. 2016). S027 est une résolvasse qui permet l'intégration de la région MDR dans ces îlots. Néanmoins, il existe des îlots sans région MDR. A l'origine les îlots ne portaient-ils pas de région MDR ou ont-ils perdu cette région MDR par accident ou pour des raisons de coût pour la bactérie ? La présence d'une résolvasse conservée dans tous les îlots nous évoque qu'ils sont programmés pour porter des gènes de résistance.

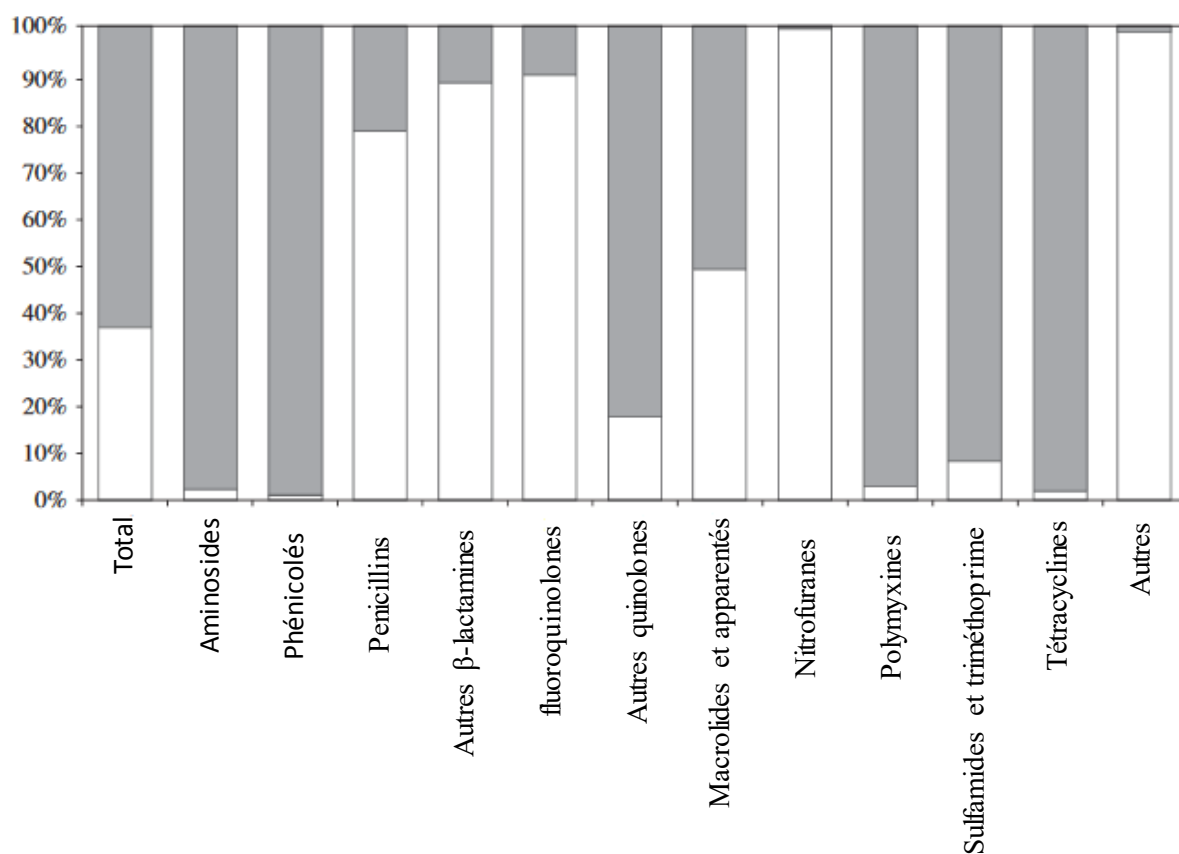


Figure 51 : Répartition des ventes de classes d'antibiotiques entre l'homme (en blanc) et l'animal (en gris) en France en 2005 (D'après Moulin et al. 2008)

Lorsque ces gènes ne sont pas utiles à la bactérie celle-ci pourrait se délester de sa région MDR. En revanche, en présence de pression de sélection antibiotique ces îlots pourraient alors acquérir à nouveau des gènes de résistance (Brewer et al. 2013; Carraro et al. 2017).

La présence d'homologies de certaines ORFs du squelette de ces îlots avec celles des ICEs appartenant à la famille SXT/R391 et celles des plasmides IncA/C supports de la résistance nous conforte dans l'hypothèse que les îlots sont adaptés à véhiculer des gènes de résistance (Harada et al. 2010; Li et al. 2016; Aogáin, Rogers, and Crowley 2016; Lindsey et al. 2009). Les points communs entre ces trois éléments génétiques nous suggèrent qu'ils sont étroitement liés. Des auteurs ont souligné l'importance de la relation entre les îlots SGI1 et les plasmides IncA/C chez *S. enterica* (Lindsey et al. 2009). Il est remarquable que ces îlots sont non seulement retrouvés chez *S. enterica* mais aussi chez *P. mirabilis* qui lui-même peut-être porteur d'ICE. A ce jour, il n'existe pas d'étude de prévalence de ces ICEs qui sont encore peu décrits. *P. mirabilis* pourrait être le fil conducteur de ces trois éléments génétiques. D'ailleurs dans la mythologie grecque *Proteus* était un dieu de la mer versatile possédant la capacité de se modifier à l'infini.

Si l'origine des îlots de résistance reste inconnue son lien avec la médecine vétérinaire doit être évoqué. En effet, le premier îlot décrit ainsi que de nombreux variants portent des déterminants de la résistance au chloramphénicol, aux sulfamides, à la streptomycine et aux tétracyclines. Ce sont des antibiotiques largement utilisés chez l'animal alors qu'ils sont très peu administrés chez l'homme (Figure 51) (Moulin et al. 2008). Un lien avec l'environnement doit également être évoqué devant la présence de gènes *mer* dans les variants SGI1-K et PGI1. Ces gènes permettent la survie des bactéries présentes dans des milieux naturellement riches en mercure (régions volcaniques) ou contaminés par du mercure (sites industriels). Plusieurs auteurs suggèrent que ces îlots pourraient avoir une origine aquatique. En effet, les gènes *floR* et *tetA(G)* ont été décrits dans des plasmides portés par *Photobacterium damsela*

qui est un pathogène des poissons ou encore l'ensemble *aacCA5-aadA7* a été décrit chez *Vibrio fluvialis* (D. A. Boyd et al. 2002; Doublet et al. 2004c). De plus, ces îlots sont retrouvés chez *S. enterica* présent dans l'environnement aquatique notamment chez les poissons comme *S. Paratyphi B* variant Java dT+ qui est notamment responsable d'infection chez l'aquariophile (Gaulin, Vincent, and Ismaïl 2005; Djordjevic et al. 2009). L'acquisition des îlots de résistance par des bactéries aquatiques ne serait pas surprenante puisque ce milieu est connu pour être un réservoir de la résistance (Schwartz et al. 2003). Enfin, l'environnement hospitalier est également concerné puisque la présence du gène *qacH* détectée dans notre étude confère la résistance aux ammoniums quaternaires utilisés à grande échelle pour la désinfection dans les établissements de santé.

Seules des études menées sur un panel de souches humaines, animales et environnementales permettront d'établir le lien entre ces 3 écosystèmes et la présence d'îlots chez *S. enterica* et *P. mirabilis*.

VIII. Conclusion générale et perspectives

Ce travail a confirmé que l'étude des îlots SGI1 et des îlots apparentés dans les souches humaines cliniques est indispensable. Notre travail est un préambule et de nombreuses questions restent en suspens :

- Quelle est leur prévalence dans les souches cliniques humaines dans le monde ?
- Quelle est leur prévalence dans les souches animales ?
- Quelle est leur prévalence dans les souches environnementales ?
- Quel avantage l'îlot procure-t-il à *P. mirabilis* et *S. enterica* ?
- Pourquoi ces îlots transmissibles *in vitro* à d'autres entérobactéries n'ont-ils été détectés que chez *P. mirabilis* et *S. enterica* ?
- Virulence et présence d'un îlot de résistance sont-ils liés ?
- Quel est l'écosystème dans lequel *P. mirabilis* et *S. enterica* co-habitent et/ou échangent des îlots ?

L'établissement de collaborations entre des équipes possédant des compétences en bactériologie clinique environnementale ou vétérinaire et des équipes spécialisées en génétique bactérienne est envisagé afin d'approfondir les connaissances sur les îlots de résistance.

IX. Bibliographie

- Aballay, Alejandro, Peter Yorgey, and Frederick M. Ausubel. 2000.** “*Salmonella* Typhimurium Proliferates and Establishes a Persistent Infection in the Intestine of *Caenorhabditis elegans*.” *Current Biology* 10 (23): 1539–42. doi:10.1016/S0960-9822(00)00830-7.
- Aballay, Alejandro, and Frederick M. Ausubel. 2001.** “Programmed Cell Death Mediated by Ced-3 and Ced-4 Protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella* Typhimurium-Mediated Killing.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5): 2735. doi:10.1073/pnas.041613098.
- Aballay, Alejandro, and Frederick M Ausubel. 2002.** “*Caenorhabditis elegans* as a Host for the Study of Host–pathogen Interactions.” *Current Opinion in Microbiology* 5 (1): 97–101. doi:10.1016/S1369-5274(02)00293-X.
- Aballay, Alejandro, Eliana Drenkard, Layla R Hilbun, and Frederick M Ausubel. 2003.** “*Caenorhabditis elegans* Innate Immune Response Triggered by *Salmonella enterica* Requires Intact LPS and Is Mediated by a MAPK Signaling Pathway.” *Current Biology* 13 (1): 47–52. doi:10.1016/S0960-9822(02)01396-9.
- Ahmed, Ashraf M., et Tadashi Shimamoto. 2003.** « MsDNA-St85, a Multicopy Single-Stranded DNA Isolated from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 with the Genomic Analysis of Its Retron ». *FEMS Microbiology Letters* 224 (2):291-97.
- Ahmed, Ashraf M., Amjad I. A. Hussein, and Tadashi Shimamoto. 2007.** “*Proteus mirabilis* Clinical Isolate Harboring a New Variant of *Salmonella* Genomic Island 1 Containing the Multiple Antibiotic Resistance Region.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (2): 184–90. doi:10.1093/jac/dkl471.
- Ahn, Jin Young, Hea Won Ann, Yongduk Jeon, Mi Young Ahn, Dong Hyun Oh, Yong Chan Kim, Eun Jin Kim, et al. 2017.** “The Impact of Production of Extended-Spectrum β -Lactamases on the 28-Day Mortality Rate of Patients with *Proteus mirabilis* Bacteremia in Korea.” *BMC Infectious Diseases* 17. doi:10.1186/s12879-017-2431-8.
- Allen, Chris A., Paula J. Fedorka-Cray, Andrés Vazquez-Torres, Mitsu Suyemoto, Craig Altier, L. Reeni Ryder, Ferric C. Fang, and Stephen J. Libby. 2001.** “In Vitro and In Vivo Assessment of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Virulence.” *Infection and Immunity* 69 (7): 4673–77. doi:10.1128/IAI.69.7.4673-4677.2001.
- Altun, Z.F., L.A. Herndon, C.A. Wolkow, C. Crocker, R. Lints, and D.H. Hall. 2002.** “WormAtlas.” ed.s. <http://www.wormatlas.org>.
- Amar, Corinne F. L., Catherine Arnold, Alan Bankier, Paul H. Dear, Beatriz Guerra, Katie L. Hopkins, Ernesto Liebana, Dik J. Mevius, and E. John Threlfall. 2008.** “Real-Time PCRs and Fingerprinting Assays for the Detection and Characterization of *Salmonella* Genomic Island-1 Encoding Multidrug Resistance: Application to 445 European Isolates of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Proteus*.” *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 14 (2): 79–92. doi:10.1089/mdr.2008.0812.
- Andersson, Dan I., and Diarmaid Hughes. 2010.** “Antibiotic Resistance and Its Cost: Is It Possible to Reverse Resistance?” *Nature Reviews Microbiology* 8 (4): 260–71. doi:10.1038/nrmicro2319.
- Anjum, Muna F., Suman Choudhary, Victoria Morrison, Lucy C. Snow, Muriel Mafura, Peter Slickers, Ralf Ehricht, and Martin J. Woodward. 2011.**

- “Identifying Antimicrobial Resistance Genes of Human Clinical Relevance within *Salmonella* Isolated from Food Animals in Great Britain.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (3): 550–59. doi:10.1093/jac/dkq498.
- Aogáin, M. Mac, T. R. Rogers, and B. Crowley. 2016.** “Identification of Emergent *bla*_{CMY-2}-Carrying *Proteus mirabilis* Lineages by Whole-Genome Sequencing.” *New Microbes and New Infections* 9 (January): 58. doi:10.1016/j.nmni.2015.11.012.
- Arlet, Guillaume, Timothy J. Barrett, Patrick Butaye, Axel Cloeckaert, Michael R. Mulvey, and David G. White. 2006.** “*Salmonella* Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins: Prevalence and Epidemiology.” *Microbes and Infection* 8 (7): 1945–54. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.029.
- Armbruster, Chelsie E., and Harry L. T. Mobley. 2012.** “Merging Mythology and Morphology: The Multifaceted Lifestyle of *Proteus mirabilis*.” *Nature Reviews. Microbiology* 10 (11): 743–54. doi:10.1038/nrmicro2890.
- Asmar, Basim I., and Nahed Abdel-Haq. 2016.** “Nontyphoidal *Salmonella* Infection in Children: Relation to Bacteremia, Age, and Infecting Serotype.” *Infectious Diseases (London, England)* 48 (2): 147–51. doi:10.3109/23744235.2015.1094823.
- Bellanger, Xavier, Sophie Payot, Nathalie Leblond-Bourget, and Gérard Guédon. 2014.** “Conjugative and Mobilizable Genomic Islands in Bacteria: Evolution and Diversity.” *FEMS Microbiology Reviews* 38 (4): 720–60. doi:10.1111/1574-6976.12058.
- Bennett, P M. 2008.** “Plasmid Encoded Antibiotic Resistance: Acquisition and Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria.” *British Journal of Pharmacology* 153 (Suppl 1): S347–57. doi:10.1038/sj.bjp.0707607.
- Beutlich, Janine, Silke Jahn, Burkhard Malorny, Elisabeth Hauser, Stephan Hühn, Andreas Schroeter, Maria Rosario Rodicio, et al. 2011.** “Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in European *Salmonella* Genomic Island 1-Positive *Salmonella enterica* Isolates from Different Origins.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (16): 5655–64. doi:10.1128/AEM.00425-11.
- Bi, Shuilian, He Yan, Miaorui Chen, Zhigang Zhang, Lei Shi, and Hua Wang. 2011.** “New Variant *Salmonella* Genomic Island 1-U in *Proteus mirabilis* Clinical and Food Isolates from South China.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (5): 1178–79. doi:10.1093/jac/dkr030.
- Bolton, Declan J., Claire Ivory, and David McDowell. 2013.** “A Study of *Salmonella* in Pigs from Birth to Carcass: Serotypes, Genotypes, Antibiotic Resistance and Virulence Profiles.” *International Journal of Food Microbiology* 160 (3): 298–303. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.001.
- Boyd, D. A., G. A. Peters, L. Ng, and M. R. Mulvey. 2000.** “Partial Characterization of a Genomic Island Associated with the Multidrug Resistance Region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104.” *FEMS Microbiology Letters* 189 (2): 285–91.
- Boyd, D. A., G. A. Peters, A. Cloeckaert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey. 2001.** “Complete Nucleotide Sequence of a 43-Kilobase Genomic Island Associated with the Multidrug Resistance Region of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 and Its Identification in Phage Type DT120 and Serovar Agona.” *Journal of Bacteriology* 183 (19): 5725–32. doi:10.1128/JB.183.19.5725-5732.2001.
- Boyd, D. A., Axel Cloeckaert, Elisabeth Chaslus-Dancla, and Michael R. Mulvey. 2002.** “Characterization of Variant *Salmonella* Genomic Island 1 Multidrug Resistance Regions from Serovars Typhimurium DT104 and Agona.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6): 1714–22. doi:10.1128/AAC.46.6.1714-1722.2002.
- Boyd, D. A., Xiaolu Shi, Qing-hua Hu, Lai King Ng, Benoit Doublet, Axel Cloeckaert, and Michael R. Mulvey. 2008.** “*Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), Variant SGI1-

- I, and New Variant SGI1-O in *Proteus mirabilis* Clinical and Food Isolates from China.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (1): 340–44. doi:10.1128/AAC.00902-07.
- Brewer, Matt T., Nalee Xiong, Kristi L. Anderson, and Steve A. Carlson. 2013.** “Effects of Subtherapeutic Concentrations of Antimicrobials on Gene Acquisition Events in *Yersinia*, *Proteus*, *Shigella*, and *Salmonella* Recipient Organisms in Isolated Ligated Intestinal Loops of Swine.” *American Journal of Veterinary Research* 74 (8): 1078–83. doi:10.2460/ajvr.74.8.1078.
- Bugarel, Marie, Sophie A. Granier, François-Xavier Weill, Patrick Fach, and Anne Brisabois. 2011.** “A Multiplex Real-Time PCR Assay Targeting Virulence and Resistance Genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium.” *BMC Microbiology* 11 (1): 151. doi:10.1186/1471-2180-11-151.
- Burrus, Vincent, Guillaume Pavlovic, Bernard Decaris, and Gérard Guédon. 2002.** “Conjugative Transposons: The Tip of the Iceberg.” *Molecular Microbiology* 46 (3): 601–10. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03191.x.
- Carattoli, Alessandra, Alessia Bertini, Laura Villa, Vincenzo Falbo, Katie L. Hopkins, and E. John Threlfall. 2005.** “Identification of Plasmids by PCR-Based Replicon Typing.” *Journal of Microbiological Methods* 63 (3): 219–28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- Carattoli, Alessandra. 2009.** “Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (6):227–38. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>.
- Carlson, S. A., M. Browning, K. E. Ferris, and B. D. Jones. 2000.** “Identification of Diminished Tissue Culture Invasiveness among Multiple Antibiotic Resistant *Salmonella* Typhimurium DT104.” *Microbial Pathogenesis* 28 (1): 37–44. doi:10.1006/mpat.1999.0322.
- Carlson, S. A, Ruth M Willson, Amy J Crane, and Kathleen E Ferris. 2000b.** “Evaluation of Invasion-Conferring Genotypes and Antibiotic-Induced Hyperinvasive Phenotypes in Multiple Antibiotic Resistant *Salmonella* Typhimurium DT104.” *Microbial Pathogenesis* 28 (6): 373–78. doi:10.1006/mpat.2000.0355.
- Carlson, S. A., D. K. Meyerholz, T. J. Stabel, and B. D. Jones. 2001.** “Secretion of a Putative Cytotoxin in Multiple Antibiotic Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Phagetype DT104.” *Microbial Pathogenesis* 31 (4): 201–4. doi:10.1006/mpat.2001.0461.
- Carlson, S. A, W. C Stoffregen, and S. R Bolin. 2002.** “Abomasitis Associated with Multiple Antibiotic Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Phagetype DT104.” *Veterinary Microbiology* 85 (3): 233–40. doi:10.1016/S0378-1135(01)00508-9.
- Carlson, S. A., Zoe P. McCuddin, and Max T. Wu. 2005.** “SlyA Regulates the Collagenase-Mediated Cytopathic Phenotype in Multiresistant *Salmonella*.” *Microbial Pathogenesis* 38 (4): 181–87. doi:10.1016/j.micpath.2005.01.004.
- Carlson, S. A., Vijay K. Sharma, Zoe P. McCuddin, Mark A. Rasmussen, and Sharon K. Franklin. 2007.** “Involvement of a *Salmonella* Genomic Island 1 Gene in the Rumen Protozoan-Mediated Enhancement of Invasion for Multiple-Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.” *Infection and Immunity* 75 (2): 792–800. doi:10.1128/IAI.00679-06.
- Carraro, Nicolas, and Vincent Burrus. 2014.** “Biology of Three ICE Families: SXT/R391, ICEBs1, and ICES_{t1}/ICES_{t3}.” *Microbiology Spectrum* 2 (6). doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0008-2014.

- Carraro, Nicolas, Dominick Matteau, Peng Luo, Sébastien Rodrigue, and Vincent Burrus. 2014.** “The Master Activator of IncA/C Conjugative Plasmids Stimulates Genomic Islands and Multidrug Resistance Dissemination.” *PLoS Genetics* 10 (10): e1004714. doi:10.1371/journal.pgen.1004714.
- Carraro, Nicolas, Dominick Matteau, Vincent Burrus, and Sébastien Rodrigue. 2015.** “Unraveling the Regulatory Network of IncA/C Plasmid Mobilization: When Genomic Islands Hijack Conjugative Elements.” *Mobile Genetic Elements* 5 (3): 34–38. doi:10.1080/2159256X.2015.1045116.
- Carraro, Nicolas, Romain Durand, Nicolas Rivard, Charley Anquetil, Catherine Barrette, Malika Humbert, and Vincent Burrus. 2017.** “*Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) Reshapes the Mating Apparatus of IncC Conjugative Plasmids to Promote Self-Propagation.” *PLoS Genetics* 13 (3). doi:10.1371/journal.pgen.1006705.
- Chart, H. 2003.** “The Pathogenicity of Strains of *Salmonella* Paratyphi B and *Salmonella* Java.” *Journal of Applied Microbiology* 94 (2): 340–48. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01863.x.
- Chou, M. L., H. S. Wang, S. C. Huang, and N. Lee. 1988.** “Neonatal Meningitis Due to *Proteus mirabilis*: Report of 3 Cases.” *Changgeng Yi Xue Za Zhi* 11 (1): 66–73.
- Chu, C., B. Doublet, Y. -L. Lee, A. Cloeckert, C. -S. Chiou, S. -W. Chen, C. -W. Lin, and C. -H. Chiu. 2012.** “*Salmonella* Genomic Island 1-J Variants Associated with Change in the Antibiotic Resistance Gene Cluster in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Virchow Isolated from Humans, Taiwan, 2004–2006.” *Clinical Microbiology and Infection* 18 (1): 47–53. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03464.x.
- Cirillo, J. D., S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1994.** “Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* Enhances Invasion.” *Infection and Immunity* 62 (8): 3254–61.
- Cloeckert, Axel, Karine Praud, Benoît Doublet, Marie Demartin, and François-Xavier Weill. 2006.** “Variant *Salmonella* Genomic Island 1-L Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Salmonella enterica* Serovar Newport.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (11): 3944–46. doi:10.1128/AAC.00697-06.
- Corsi Ann K. Chalfie Martin. 2015.** *A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans*. The *C. elegans* Research Community. Wormbook. doi/10.1895/wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org>.
- Crump, John A., Felicita M. Medalla, Kevin W. Joyce, Amy L. Krueger, R. Michael Hoekstra, Jean M. Whichard, Ezra J. Barzilay, and Emerging Infections Program NARMS Working Group. 2011.** “Antimicrobial Resistance among Invasive Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (3): 1148–54. doi:10.1128/AAC.01333-10.
- Crump, John A., Maria Sjölund-Karlsson, Melita A. Gordon, and Christopher M. Parry. 2015.** “Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections.” *Clinical Microbiology Reviews* 28 (4): 901–37. doi:10.1128/CMR.00002-15.
- Darby, Creg. 2005.** “Interactions with Microbial Pathogens.” *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, September, 1–15. doi:10.1895/wormbook.1.21.1.
- de Champs, C., C. Chanal, D. Sirot, R. Baraduc, J. P. Romaszko, R. Bonnet, A. Plaidy, et al. 2004.** “Frequency and Diversity of Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in Hospitals of the Auvergne, France: A 2 Year Prospective Study.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (3): 634–39. doi:10.1093/jac/dkh395.

- Dhanji, Hiran, Rajesh Patel, Robert Wall, Michel Doumith, Bharat Patel, Russell Hope, David M. Livermore, and Neil Woodford. 2011.** “Variation in the Genetic Environments of *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* from the Faeces of Travellers Returning to the United Kingdom.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (5): 1005–12. doi:10.1093/jac/dkr041.
- Dixon, Nyssa, Randal C. Fowler, A. Yoshizumi, Tsukasa Horiyama, Y. Ishii, Lucas Harrison, Chelsie N. Geyer, Ellen Smith Moland, Kenneth Thomson, and Nancy D. Hanson. 2016.** “IMP-27, a Unique Metallo- β -Lactamase Identified in Geographically Distinct Isolates of *Proteus mirabilis*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (10): 6418. doi:10.1128/AAC.02945-15.
- Djordjevic, Steven P., Amy K. Cain, Nick J. Evershed, Linda Falconer, Renee S. Levings, Diane Lightfoot, and Ruth M. Hall. 2009.** “Emergence and Evolution of Multiply Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B d-Tartrate-Utilizing Strains Containing SGII.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (6): 2319–26. doi:10.1128/AAC.01532-08.
- Douard, Gregory, Karine Praud, Axel Cloeckaert, and Benoît Doublet. 2010.** “The *Salmonella* Genomic Island 1 Is Specifically Mobilized in *trans* by the IncA/C Multidrug Resistance Plasmid Family.” *PloS One* 5 (12): e15302. doi:10.1371/journal.pone.0015302.
- Doublet, Benoît, Renaud Lailier, Danièle Meunier, Anne Brisabois, David Boyd, Michael R. Mulvey, Elisabeth Chalus-Dancla, and Axel Cloeckaert. 2003.** “Variant *Salmonella* Genomic Island 1 Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Salmonella enterica* Serovar Albany.” *Emerging Infectious Diseases* 9 (5): 585–91.
- Doublet, Benoît, Patrick Butaye, Hein Imberechts, David Boyd, Michael R. Mulvey, Elisabeth Chalus-Dancla, and Axel Cloeckaert. 2004a.** “*Salmonella* Genomic Island 1 Multidrug Resistance Gene Clusters in *Salmonella enterica* Serovar Agona Isolated in Belgium in 1992 to 2002.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (7): 2510–17. doi:10.1128/AAC.48.7.2510-2517.2004.
- Doublet, Benoît, Patrick Butaye, Hein Imberechts, Jean-Marc Collard, Elisabeth Chalus-Dancla, and Axel Cloeckaert. 2004b.** “*Salmonella* Agona Harboring Genomic Island 1-A.” *Emerging Infectious Diseases* 10 (4): 756. doi:10.3201/eid1004.030417.
- Doublet, Benoît, François-Xavier Weill, Laetitia Fabre, Elisabeth Chalus-Dancla, and Axel Cloeckaert. 2004c.** “Variant *Salmonella* Genomic Island 1 Antibiotic Resistance Gene Cluster Containing a Novel 3'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase Gene Cassette, Aac(3)-Id, in *Salmonella enterica* Serovar Newport.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (10): 3806–12. doi:10.1128/AAC.48.10.3806-3812.2004.
- Doublet, Benoît, David Boyd, Michael R. Mulvey, and Axel Cloeckaert. 2005.** “The *Salmonella* Genomic Island 1 Is an Integrative Mobilizable Element.” *Molecular Microbiology* 55 (6): 1911–24. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04520.x.
- Doublet, Benoît, George R. Golding, Michael R. Mulvey, and Axel Cloeckaert. 2007.** “Potential Integration Sites of the *Salmonella* Genomic Island 1 in *Proteus mirabilis* and Other Bacteria.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (4): 801–3. doi:10.1093/jac/dkl540.
- Doublet, Benoît, Karine Praud, Sophie Bertrand, Jean-Marc Collard, François-Xavier Weill, and Axel Cloeckaert. 2008a.** “Novel Insertion Sequence- and Transposon-Mediated Genetic Rearrangements in Genomic Island SGII of *Salmonella enterica* Serovar Kentucky.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (10): 3745–54. doi:10.1128/AAC.00525-08.

- Doublet, Benoît, George R. Golding, Michael R. Mulvey, and Axel Cloeckaert. 2008b.** “Secondary Chromosomal Attachment Site and Tandem Integration of the Mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1.” *PLoS ONE* 3 (4). doi:10.1371/journal.pone.0002060.
- Doublet, Benoît, Karine Praud, François-Xavier Weill, and Axel Cloeckaert. 2009a.** “Association of IS26-Composite Transposons and Complex In4-Type Integrons Generates Novel Multidrug Resistance Loci in *Salmonella* Genomic Island 1.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63 (2): 282–89. doi:10.1093/jac/dkn500.
- Doublet, Benoît, Chishih Chu, Cheng-Hsun Chiu, Yi-Chin Fan, and Axel Cloeckaert. 2009b.** “Truncated Tni Module Adjacent to the Complex Integron of *Salmonella* Genomic Island 1 in *Salmonella enterica* Serovar Virchow.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2): 824–27. doi:10.1128/AAC.01015-08.
- Drzewiecka, Dominika. 2016.** “Significance and Roles of *Proteus spp.* Bacteria in Natural Environments.” *Microbial Ecology* 72 (4): 741. doi:10.1007/s00248-015-0720-6.
- Eguale, T., J. Marshall, B. Molla, A. Bhatiya, W.a. Gebreyes, E. Engidawork, D. Asrat, and J.s. Gunn. 2014.** “Association of Multicellular Behaviour and Drug Resistance in *Salmonella enterica* Serovars Isolated from Animals and Humans in Ethiopia.” *Journal of Applied Microbiology* 117 (4): 961–71. doi:10.1111/jam.12579.
- Endimiani, Andrea, Francesco Luzzaro, Gioconda Brigante, Mariagrazia Perilli, Gianluigi Lombardi, Gianfranco Amicosante, Gian Maria Rossolini, and Antonio Toniolo. 2005.** “*Proteus mirabilis* Bloodstream Infections: Risk Factors and Treatment Outcome Related to the Expression of Extended-Spectrum Beta-Lactamases.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7): 2598–2605. doi:10.1128/AAC.49.7.2598-2605.2005.
- “Enquête Nationale de Prévalence Des Infections Nosocomiales et Des Traitements Anti-Infectieux En Établissements de Santé, France, Mai-Juin 2012 / 2013 / Maladies Infectieuses / Rapports et Synthèses / Publications et Outils / Accueil.” 2017.** Accessed July 24. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-France-mai-juin-2012>.
- European Food Safety Authority. 2016.** “The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2014.” *EFSA Journal* 2016 14(2) (2:4380). doi:10.2903/j.efsa.2016.4380.
- Evans, S., and R. Davies. 1996.** “Case Control Study of Multiple-Resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 Infection of Cattle in Great Britain.” *The Veterinary Record* 139 (23): 557–58.
- Feasey, Nicholas A., Clemens Masesa, Chikondi Jassi, E. Brian Faragher, Jane Mallewa, Macpherson Mallewa, Calman A. MacLennan, Chisomo Msefula, Robert S. Heyderman, and Melita A. Gordon. 2015.** “Three Epidemics of Invasive Multidrug-Resistant *Salmonella* Bloodstream Infection in Blantyre, Malawi, 1998-2014.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 61 Suppl 4 (November): S363-371. doi:10.1093/cid/civ691.
- Franco, Alessia, Pimlapas Leekitcharoenphon, Fabiola Feltrin, Patricia Alba, Gessica Cordaro, Manuela Iurescia, Rita Tolli, et al. 2015.** “Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* *Infantis* Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014.” *PLoS ONE* 10 (12). doi:10.1371/journal.pone.0144802.

- Gaulin, Colette, Chantal Vincent, and Johanne Ismail. 2005.** “Sporadic Infections of *Salmonella* Paratyphi B, Var. Java Associated with Fish Tanks.” *Canadian Journal of Public Health = Revue Canadienne De Sante Publique* 96 (6): 471–74.
- Gillings, Michael R., William H. Gaze, Amy Pruden, Kornelia Smalla, James M. Tiedje, and Yong-Guan Zhu. 2015.** “Using the Class 1 Integron-Integrase Gene as a Proxy for Anthropogenic Pollution.” *The ISME Journal* 9 (6): 1269–79. doi:10.1038/ismej.2014.226.
- Girlich, Delphine, Laurent Dortet, Laurent Poiriel, and Patrice Nordmann. 2015.** “Integration of the *bla*_{NDM-1} Carbapenemase Gene into *Proteus* Genomic Island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (1): 98–102. doi:10.1093/jac/dku371.
- Girlich, Delphine, Rémy A. Bonnin, Pierre Bogaerts, Morgane De Laveleye, Daniel T. Huang, Laurent Dortet, Philippe Glaser, Youri Glupczynski, and Thierry Naas. 2017.** “Chromosomal Amplification of the *bla*_{OXA-58} Carbapenemase Gene in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (2). doi:10.1128/AAC.01697-16.
- Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. J. Angulo. 1998.** “Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 Infections in the United States.” *The New England Journal of Medicine* 338 (19): 1333–38. doi:10.1056/NEJM199805073381901.
- Golding, George R., Adam B. Olson, Benoît Doublet, Axel Cloeckert, Sara Christianson, Morag R. Graham, and Michael R. Mulvey. 2007.** “The Effect of the *Salmonella* Genomic Island 1 on *in vitro* Global Gene Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2.” *Microbes and Infection* 9 (1): 21–27. doi:10.1016/j.micinf.2006.10.004.
- Gordon, Melita A. 2008.** “*Salmonella* Infections in Immunocompromised Adults.” *Journal of Infection* 56 (6): 413–22. doi:10.1016/j.jinf.2008.03.012.
- Grahnquist, L., B. Lundberg, and K. Tullus. 1992.** “Neonatal *Proteus* Meningoencephalitis. Case Report.” *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 100 (8): 734–36.
- Hall, R. M., and C. M. Collis. 1998.** “Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria: The Role of Gene Cassettes and Integrons.” *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 1 (2): 109–19.
- Hall, R. M. 2010.** “*Salmonella* Genomic Islands and Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica*.” *Future Microbiology* 5 (10): 1525–38. doi:10.2217/fmb.10.122.
- Hamidian, Mohammad, Kathryn E. Holt, and Ruth M. Hall. 2015a.** “The Complete Sequence of *Salmonella* Genomic Island SGI1-K.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (1): 305–6. doi:10.1093/jac/dku331.
- Hamidian, Mohammad, Kathryn E. Holt, and Ruth M. Hall. 2015b.** “Genomic Resistance Island AGI1 Carrying a Complex Class 1 Integron in a Multiply Antibiotic-Resistant ST25 *Acinetobacter baumannii* Isolate.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (9): 2519–23. doi:10.1093/jac/dkv137.
- Harada, Sohei, Yoshikazu Ishii, Tomoo Saga, Kazuhiro Tateda, and Keizo Yamaguchi. 2010.** “Chromosomally Encoded *bla*_{CMY-2} Located on a Novel SXT/R391-Related Integrating Conjugative Element in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (9): 3545. doi:10.1128/AAC.00111-10.
- Harmer, Christopher J., Robert A. Moran, and Ruth M. Hall. 2014.** “Movement of IS26-Associated Antibiotic Resistance Genes Occurs via a Translocatable Unit That Includes a Single IS26 and Preferentially Inserts Adjacent to Another IS26.” *MBio* 5 (5): e01801-14. doi:10.1128/mBio.01801-14.

- Harmer, Christopher J., and R. M. Hall. 2015.** “The A to Z of A/C Plasmids.” *Plasmid* 80 (July): 63–82. doi:10.1016/j.plasmid.2015.04.003.
- Harmer, Christopher J., and R. M. Hall. 2016.** “IS26-Mediated Formation of Transposons Carrying Antibiotic Resistance Genes.” *MSphere* 1 (2): e00038-16. doi:10.1128/mSphere.00038-16.
- Harmer, Christopher J., Mohammad Hamidian, Stephanie J. Ambrose, and R. M. Hall. 2016.** “Destabilization of IncA and IncC Plasmids by SGI1 and SGI2 Type *Salmonella* Genomic Islands.” *Plasmid* 87–88 (November): 51–57. doi:10.1016/j.plasmid.2016.09.003.
- Havelaar, Arie H., Martyn D. Kirk, Paul R. Torgerson, Herman J. Gibb, Tine Hald, Robin J. Lake, Nicolas Praet, et al. 2015.** “World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010.” *PLoS Medicine* 12 (12): e1001923. doi:10.1371/journal.pmed.1001923.
- He, Susu, Alison Burgess Hickman, Alessandro M. Varani, Patricia Siguier, Michael Chandler, John P. Dekker, and Fred Dyda. 2015.** “Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition.” *MBio* 6 (3): e00762-15. doi:10.1128/mBio.00762-15.
- Helms, Morten, Pernille Vastrup, Peter Gerner-Smidt, and Kåre Mølbak. 2002.** “Excess Mortality Associated with Antimicrobial Drug-Resistant *Salmonella* Typhimurium.” *Emerging Infectious Diseases* 8 (5): 490–95. doi:10.3201/eid0805.010267.
- Helms, Morten, Steen Ethelberg, Kåre Mølbak, and DT104 Study Group. 2005.** “International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992-2001.” *Emerging Infectious Diseases* 11 (6): 859–67. doi:10.3201/eid1106.041017.
- Herrero-Fresno, Ana, Inke Wallrodt, Pimlapas Leekitcharoenphon, John Elmerdahl Olsen, Frank M. Aarestrup, and Rene S. Hendriksen. 2014.** “The Role of the *St313-Td* Gene in Virulence of *Salmonella* Typhimurium ST313.” *PLoS ONE* 9 (1). doi:10.1371/journal.pone.0084566.
- Huguet, Kevin T., Mathieu Gonnet, Benoît Doublet, and Axel Cloeckert. 2016.** “A Toxin Antitoxin System Promotes the Maintenance of the IncA/C-Mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1.” *Scientific Reports* 6 (August): 32285. doi:10.1038/srep32285.
- Jacobsen, S. M., D. J. Stickler, H. L. T. Mobley, and M. E. Shirtliff. 2008.** “Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*.” *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 26–59. doi:10.1128/CMR.00019-07.
- Jones, Timothy F., L. Amanda Ingram, Paul R. Cieslak, Duc J. Vugia, Melissa Tobin-D’Angelo, Sharon Hurd, Carlota Medus, Alicia Cronquist, and Frederick J. Angulo. 2008.** “Salmonellosis Outcomes Differ Substantially by Serotype.” *Journal of Infectious Diseases* 198 (1): 109–14. doi:10.1086/588823.
- Juhas, Mario, Van Der Meer, Jan Roelof, Muriel Gaillard, Rosalind M. Harding, Derek W. Hood, and Derrick W. Crook. 2009.** “Genomic Islands: Tools of Bacterial Horizontal Gene Transfer and Evolution.” *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2): 376–93. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x.
- Kim, Shukho, Sung-Hun Kim, Jungmin Kim, Ji-Hyun Shin, Bok-Kwon Lee, and Mi-Sun Park. 2011.** “Occurrence and Distribution of Various Genetic Structures of Class 1 and Class 2 Integrons in *Salmonella enterica* Isolates from Foodborne Disease Patients in Korea for 16 Years.” *Foodborne Pathogens and Disease* 8 (2): 319–24. doi:10.1089/fpd.2010.0646.
- Kingsley, Robert A., Chisomo L. Msefula, Nicholas R. Thomson, Samuel Kariuki, Kathryn E. Holt, Melita A. Gordon, David Harris, et al. 2009.** “Epidemic Multiple

- Drug Resistant *Salmonella* Typhimurium Causing Invasive Disease in Sub-Saharan Africa Have a Distinct Genotype.” *Genome Research* 19 (12): 2279–87. doi:10.1101/gr.091017.109.
- Kiss, János, Béla Nagy, and Ferenc Olsz.** 2012. “Stability, Entrapment and Variant Formation of *Salmonella* Genomic Island 1.” *PLoS ONE* 7 (2). doi:10.1371/journal.pone.0032497.
- Kiss, János, Péter Pál Papp, Mónika Szabó, Tibor Farkas, Gábor Murányi, Erik Szakállas, and Ferenc Olsz.** 2015. “The Master Regulator of IncA/C Plasmids Is Recognized by the *Salmonella* Genomic Island SGI1 as a Signal for Excision and Conjugal Transfer.” *Nucleic Acids Research* 43 (18): 8735–45. doi:10.1093/nar/gkv758.
- Krauland, Mary G., Jane W. Marsh, David L. Paterson, and Lee H. Harrison.** 2009. “Integron-Mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates.” *Emerging Infectious Diseases* 15 (3): 388. doi:10.3201/eid1503.081131.
- Labrousse, Arnaud, Sophie Chauvet, Carole Couillault, C. Léopold Kurz, and Jonathan J. Ewbank.** 2000. “*Caenorhabditis elegans* Is a Model Host for *Salmonella* Typhimurium.” *Current Biology* 10 (23): 1543–45. doi:10.1016/S0960-9822(00)00833-2.
- Le Hello, Simon, Rene S. Hendriksen, Benoît Doublet, Ian Fisher, Eva Møller Nielsen, Jean M. Whichard, Brahim Bouchrif, et al.** 2011. “International Spread of an Epidemic Population of *Salmonella enterica* Serotype Kentucky ST198 Resistant to Ciprofloxacin.” *The Journal of Infectious Diseases* 204 (5): 675–84. doi:10.1093/infdis/jir409.
- Le Hello, Simon Le, François-Xavier Weill, Véronique Guibert, Karine Praud, Axel Cloeckert, and Benoît Doublet.** 2012. “Early Strains of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Sequence Type 198 from Southeast Asia Harbor *Salmonella* Genomic Island 1-J Variants with a Novel Insertion Sequence.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (10): 5096–5102. doi:10.1128/AAC.00732-12.
- Le Hello, Simon, Amany Abdelrehim Bekhit, Sophie Granier, Himel Barua, Janine Beutlich, Magdalena Maria Zajac, Sebastian Münch, et al.** 2013. “The Global Establishment of a Highly-Fluoroquinolone Resistant *Salmonella enterica* Serotype Kentucky ST198 Strain.” *Frontiers in Microbiology* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00395.
- Leekitcharoenphon, Pimlapas, Rene S. Hendriksen, Simon Le Hello, François-Xavier Weill, Dorte Lau Baggesen, Se-Ran Jun, David W. Ussery, et al.** 2016. “Global Genomic Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104.” *Applied and Environmental Microbiology* 82 (8): 2516–26. doi:10.1128/AEM.03821-15.
- Lei, Chang-Wei, An-Yun Zhang, Bi-Hui Liu, Hong-Ning Wang, Zhong-Bin Guan, Chang-Wen Xu, Qing-Qing Xia, Han Cheng, and Dong-Dong Zhang.** 2014. “Molecular Characteristics of *Salmonella* Genomic Island 1 in *Proteus mirabilis* Isolates from Poultry Farms in China.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (12): 7570–72. doi:10.1128/AAC.03992-14.
- Lei, Chang-Wei, An-Yun Zhang, Bi-Hui Liu, Hong-Ning Wang, Li-Qin Yang, Zhong-Bin Guan, Chang-Wen Xu, Dong-Dong Zhang, and Yong-Qiang Yang.** 2015. “Two Novel *Salmonella* Genomic Island 1 Variants in *Proteus mirabilis* Isolates from Swine Farms in China.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (7): 4336–38. doi:10.1128/AAC.00120-15.

- Lett, M. C. 1988.** “Tn3-like Elements: Molecular Structure, Evolution.” *Biochimie* 70 (2): 167–76.
- Levings, Renee S., Steven P. Djordjevic, and R. M. Hall. 2008.** “SGI2, a Relative of *Salmonella* Genomic Island SGI1 with an Independent Origin.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (7): 2529–37. doi:10.1128/AAC.00189-08.
- Levings, Renee S., Diane Lightfoot, Sally R. Partridge, R. M. Hall, and Steven P. Djordjevic. 2005.** “The Genomic Island SGI1, Containing the Multiple Antibiotic Resistance Region of *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium DT104 or Variants of It, Is Widely Distributed in Other *S. Enterica* Serovars.” *Journal of Bacteriology* 187 (13): 4401–9. doi:10.1128/JB.187.13.4401-4409.2005.
- Levings, Renee S., Sally R. Partridge, Steven P. Djordjevic, and R. M. Hall. 2007.** “SGI1-K, a Variant of the SGI1 Genomic Island Carrying a Mercury Resistance Region, in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (1): 317–23. doi:10.1128/AAC.01229-06.
- Li, Xinyue, Yu Du, Pengcheng Du, Hang Dai, Yujie Fang, Zhenpeng Li, Na Lv, Baoli Zhu, Biao Kan, and Duochun Wang. 2016.** “SXT/R391 Integrative and Conjugative Elements in *Proteus* Species Reveal Abundant Genetic Diversity and Multidrug Resistance.” *Scientific Reports* 6 (November). doi:10.1038/srep37372.
- Liebert, Cynthia A., R. M. Hall, and Anne O. Summers. 1999.** “Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (3): 507–22.
- Lindsey, Rebecca L., Paula J. Fedorka-Cray, Jonathan G. Frye, and Richard J. Meinersmann. 2009.** “Inc A/C Plasmids Are Prevalent in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolates.” *Applied and Environmental Microbiology* 75 (7): 1908–15. doi:10.1128/AEM.02228-08.
- Mahillon, Jacques, and Michael Chandler. 1998.** “Insertion Sequences.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 725–74.
- Mahon, Barbara E., and Patricia I. Fields. 2016.** “Invasive Infections with Nontyphoidal *Salmonella* in Sub-Saharan Africa.” *Microbiology Spectrum* 4 (3). doi:10.1128/microbiolspec.EI10-0015-2016.
- Majtánová, L’ubica, Tomás Majtán, and Viktor Majtán. 2010.** “Detection of the Class 1 Integrons and SGI1 among *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104, U302, DT120, DT193, and Nontypable Human Isolates.” *Japanese Journal of Infectious Diseases* 63 (4): 292–95.
- Malcova, M., H. Hradecka, R. Karpiskova, and I. Rychlik. 2008.** “Biofilm Formation in Field Strains of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Identification of a New Colony Morphology Type and the Role of SGI1 in Biofilm Formation.” *Veterinary Microbiology* 129 (3–4): 360–66. doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.006.
- Martin, Leah J., Murray Fyfe, Kathryn Doré, Jane A. Buxton, Franklin Pollari, Bonnie Henry, Dean Middleton, et al. 2004.** “Increased Burden of Illness Associated with Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Infections.” *Journal of Infectious Diseases* 189 (3): 377–84. doi:10.1086/381270.
- Mather, Alison E., Matthew J. Denwood, Daniel T. Haydon, Louise Matthews, Dominic J. Mellor, John E. Coia, Derek J. Brown, and Stuart W. J. Reid. 2011.** “The Prevalences of *Salmonella* Genomic Island 1 Variants in Human and Animal *Salmonella* Typhimurium DT104 Are Distinguishable Using a Bayesian Approach.” *PloS One* 6 (11): e27220. doi:10.1371/journal.pone.0027220.
- Matiasovicova, J., P. Adams, P. A. Barrow, H. Hradecka, M. Malcova, R. Karpiskova, E. Budinska, L. Pilousova, et I. Rychlik. 2007.** « Identification of Putative Ancestors of the Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Clone

- Harboring the *Salmonella* Genomic Island 1 ». *Archives of Microbiology* 187 (5):415–24. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0205-6>.
- Michael, G. B., and S. Schwarz. 2016.** “Antimicrobial Resistance in Zoonotic Nontyphoidal *Salmonella*: An Alarming Trend?” *Clinical Microbiology and Infection* 22 (12): 968–74. doi:10.1016/j.cmi.2016.07.033.
- Moulin, Gérard, Philippe Cavalié, Isabelle Pellanne, Anne Chevance, Arlette Laval, Yves Millemann, Pierre Colin, and Claire Chauvin. 2008.** “A Comparison of Antimicrobial Usage in Human and Veterinary Medicine in France from 1999 to 2005.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62 (3): 617–25. doi:10.1093/jac/dkn213.
- Mulvey, Michael R., David A. Boyd, Adam B. Olson, Benoît Doublet, and Axel Cloeckert. 2006.** “The Genetics of *Salmonella* Genomic Island 1.” *Microbes and Infection* 8 (7): 1915–22. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.028.
- Murányi, Gábor, Mónika Szabó, Ferenc Olasz, and János Kiss. 2016.** “Determination and Analysis of the Putative AcaCD-Responsive Promoters of *Salmonella* Genomic Island 1.” *PLOS ONE* 11 (10): e0164561. doi:10.1371/journal.pone.0164561.
- Neuwirth, C., E. Siébor, J. M. Duez, A. Péchinot, and A. Kazmierczak. 1995.** “Imipenem Resistance in Clinical Isolates of *Proteus mirabilis* Associated with Alterations in Penicillin-Binding Proteins.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36 (2): 335–42.
- Neuwirth, C., E. Siebor, A. Pechinot, J. M. Duez, M. Pruneaux, F. Garel, A. Kazmierczak, and R. Labia. 2001.** “Evidence of *in Vivo* Transfer of a Plasmid Encoding the Extended-Spectrum Beta-Lactamase TEM-24 and Other Resistance Factors among Different Members of the Family Enterobacteriaceae.” *Journal of Clinical Microbiology* 39 (5): 1985–88. doi:10.1128/JCM.39.5.1985-1988.2001.
- Novick, R P. 1987.** “Plasmid Incompatibility.” *Microbiological Reviews* 51 (4): 381–95.
- Observatoire National de l’Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA). 2015.** “Rapports ONERBA – Onerba.” <http://onerba.org/publications/rapports-onerba/>.
- Ogunleye, Akinlabi O., and S. A. Carlson. 2012.** “Emergence of an SGI1-Bearing *Salmonella enterica* Serotype Kentucky Isolated from Septic Poultry in Nigeria.” *Journal of Infection in Developing Countries* 6 (6): 483–88.
- Osman, K. M., W. M. M. Hassan, and R. a. H. Mohamed. 2014.** “The Consequences of a Sudden Demographic Change on the Seroprevalence Pattern, Virulence Genes, Identification and Characterisation of Integron-Mediated Antibiotic Resistance in the *Salmonella enterica* Isolated from Clinically Diarrhoeic Humans in Egypt.” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 33 (8): 1323–37. doi:10.1007/s10096-014-2072-4.
- Pagani, Laura, Roberta Migliavacca, Lucia Pallecchi, Cecilia Matti, Ernesto Giacobone, Gianfranco Amicosante, Egidio Romero, and Gian Maria Rossolini. 2002.** “Emerging Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Proteus mirabilis*.” *Journal of Clinical Microbiology* 40 (4): 1549–52.
- Partridge, Sally R., Heidi J. Brown, H. W. Stokes, and Ruth M. Hall. 2001.** “Transposons Tn1696 and Tn21 and Their Integrons In4 and In2 Have Independent Origins.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (4): 1263. doi:10.1128/AAC.45.4.1263-1270.2001.
- Partridge, Sally R., Heidi J. Brown, and Ruth M. Hall. 2002.** “Characterization and Movement of the Class 1 Integron Known as Tn2521 and Tn1405.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (5): 1288–94.

- Partridge, Sally R., and Ruth M. Hall. 2003.** “In34, a Complex In5 Family Class 1 Integron Containing orf513 and *dfrA10*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (1): 342–49. doi:10.1128/AAC.47.1.342-349.2003.
- Partridge, Sally R., Guy Tsafnat, Enrico Coiera, and Jonathan R. Iredell. 2009.** “Gene Cassettes and Cassette Arrays in Mobile Resistance Integrons.” *FEMS Microbiology Reviews* 33 (4): 757–84. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x.
- Paulander, Wilhelm, Alexandra Pennhag, Dan I. Andersson, and Sophie Maisnier-Patin. 2007.** “*Caenorhabditis elegans* as a Model To Determine Fitness of Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (2): 766–69. doi:10.1128/AAC.00615-06.
- Peters, Joseph E., and Nancy L. Craig. 2001.** “Tn7: Smarter than We Thought.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (11): 806–14. doi:10.1038/35099006.
- Pilousova, Lenka, Jitka Matiasovicova, Frantisek Sisak, Hana Havlickova, and Ivan Rychlik. 2005.** “Retron Reverse Transcriptase (RrtT) Can Be Lost in Multidrug Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT 104 Strains and Influences Virulence for Mice.” *Veterinary Microbiology* 111 (3–4): 191–97. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.010.
- Ploy, M. C., T. Lambert, J. P. Couty, and F. Denis. 2000.** “Integrons: An Antibiotic Resistance Gene Capture and Expression System.” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 38 (6): 483–87. doi:10.1515/CCLM.2000.070.
- Poulin-Laprade, Dominic, Nicolas Carraro, and Vincent Burrus. 2015.** “The Extended Regulatory Networks of SXT/R391 Integrative and Conjugative Elements and IncA/C Conjugative Plasmids.” *Frontiers in Microbiology* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00837.
- Prestinaci, Francesca, Patrizio Pezzotti, and Annalisa Pantosti. 2015.** “Antimicrobial Resistance: A Global Multifaceted Phenomenon.” *Pathogens and Global Health* 109 (7): 309. doi:10.1179/2047773215Y.0000000030.
- Pritchett, Lori C., Michael E. Konkel, John M. Gay, and Thomas E. Besser. 2000.** “Identification of DT104 and U302 Phage Types among *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolates by PCR.” *Journal of Clinical Microbiology* 38 (9): 3484–88.
- Qin, Shangshang, Hui Qi, Qijing Zhang, Di Zhao, Zhen-Zhen Liu, Hao Tian, Lijuan Xu, et al. 2015.** “Emergence of Extensively Drug-Resistant *Proteus mirabilis* Harboring a Conjugative NDM-1 Plasmid and a Novel *Salmonella* Genomic Island 1 Variant, SGII-Z.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (10): 6601. doi:10.1128/AAC.00292-15.
- Rasmussen, Mark A., S. A. Carlson, Sharon K. Franklin, Zoe P. McCuddin, Max T. Wu, and Vijay K. Sharma. 2005.** “Exposure to Rumen Protozoa Leads to Enhancement of Pathogenicity of and Invasion by Multiple-Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* Bearing SGI1.” *Infection and Immunity* 73 (8): 4668–75. doi:10.1128/IAI.73.8.4668-4675.2005.
- Sahu, Surasri N., Yuda Anriany, Christopher J. Grim, Sungji Kim, Zenas Chang, Sam W. Joseph, and Hediye N. Cinar. 2013.** “Identification of Virulence Properties in *Salmonella* Typhimurium DT104 Using *Caenorhabditis elegans*.” *PLoS ONE* 8 (10). doi:10.1371/journal.pone.0076673.
- Schaffer, Jessica N., and Melanie M. Pearson. 2015.** “*Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections.” *Microbiology Spectrum* 3 (5). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013.
- Schultz, Eliette, Marisa Haenni, Laurent Mereghetti, Eliane Siebor, Catherine Neuwirth, Jean-Yves Madec, Axel Cloeckert, and Benoît Doublet. 2015.** “Survey of Multidrug Resistance Integrative Mobilizable Elements SGI1 and PGI1 in *Proteus mirabilis* in Humans and Dogs in France, 2010–13.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (9): 2543–46. doi:10.1093/jac/dkv154.

- Schultz, Eliette, Olivier Barraud, Jean-Yves Madec, Marisa Haenni, Axel Cloeckaert, Marie-Cécile Ploy, and Benoît Doublet. 2017. "Multidrug Resistance *Salmonella* Genomic Island 1 in a *Morganella morganii* Subsp. *Morganii* Human Clinical Isolate from France." *MSphere* 2 (2): e00118-17. doi:10.1128/mSphere.00118-17.
- Schultz, Eliette, Axel Cloeckaert, Benoît Doublet, Jean-Yves Madec, and Marisa Haenni. 2017. "Detection of SGI1/PGI1 Elements and Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in *Proteae* of Animal Origin in France." *Frontiers in Microbiology* 8 (January). doi:10.3389/fmicb.2017.00032.
- Schwartz, Thomas, Wolfgang Kohlen, Bernd Jansen, and Ursula Obst. 2003. "Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water, and Drinking Water Biofilms." *FEMS Microbiology Ecology* 43 (3): 325–35. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x.
- Siebor, Eliane, and Catherine Neuwirth. 2011. "The New Variant of *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French Clinical Isolate Harbours *bla*_{VEB-6} and *qnrA1* in the Multiple Antibiotic Resistance Region." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (11): 2513–20. doi:10.1093/jac/dkr335.
- Siebor, Eliane, and Catherine Neuwirth. 2013. "Emergence of *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) among *Proteus mirabilis* Clinical Isolates in Dijon, France." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (8): 1750–56. doi:10.1093/jac/dkt100.
- Siebor, Eliane, and Catherine Neuwirth. 2014. "*Proteus* Genomic Island 1 (PGI1), a New Resistance Genomic Island from Two *Proteus mirabilis* French Clinical Isolates." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (12): 3216–20. doi:10.1093/jac/dku314.
- Siebor, Eliane, Claire de Curraize, Lucie Amoureux, and Catherine Neuwirth. 2016. "Mobilization of the *Salmonella* Genomic Island SGI1 and the *Proteus* Genomic Island PGI1 by the A/C2 Plasmid Carrying *bla*_{TEM-24} Harboured by Various Clinical Species of Enterobacteriaceae." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (8): 2167–70. doi:10.1093/jac/dkw151.
- Sifri, Costi D., Jakob Begun, and Frederick M. Ausubel. 2005. "The Worm Has Turned – Microbial Virulence Modeled in *Caenorhabditis elegans*." *Trends in Microbiology* 13 (3): 119–27. doi:10.1016/j.tim.2005.01.003.
- Sinwat, Nuananong, Sunpetch Angkittitrakul, and Rungtip Chuanchuen. 2015. "Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated from Pork, Chicken Meat, and Humans in Northeastern Thailand." *Foodborne Pathogens and Disease* 12 (9): 759–65. doi:10.1089/fpd.2015.1946.
- Stiernagle, Theresa. 2006. "Maintenance of *C. elegans*." *WormBook*. doi:10.1895/wormbook.1.101.1.
- Stokes, H. W., C. Tomaras, Y. Parsons, and R. M. Hall. 1993. "The Partial 3'-Conserved Segment Duplications in the Integrations In6 from PSa and In7 from PDGO100 Have a Common Origin." *Plasmid* 30 (1): 39–50. doi:10.1006/plas.1993.1032.
- Targant, Hayette, Benoît Doublet, Frank M. Aarestrup, Axel Cloeckaert, and Jean-Yves Madec. 2010a. "IS6100-Mediated Genetic Rearrangement within the Complex Class 1 Integron In104 of the *Salmonella* Genomic Island 1." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (7): 1543–45. doi:10.1093/jac/dkq163.
- Targant, Hayette, Cécile Ponsin, Christiane Brunet, Benoît Doublet, Axel Cloeckaert, Jean-Yves Madec, and Danièle Meunier. 2010b. "Characterization of Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolated from Diseased Cattle in France (2002 to 2007)." *Foodborne Pathogens and Disease* 7 (4): 419–25. doi:10.1089/fpd.2009.0414.
- Tenor, Jennifer L, Beth A McCormick, Frederick M Ausubel, and Alejandro Aballay. 2004. "*Caenorhabditis elegans*-Based Screen Identifies *Salmonella* Virulence Factors

- Required for Conserved Host-Pathogen Interactions.” *Current Biology* 14 (11): 1018–24. doi:10.1016/j.cub.2004.05.050.
- Threlfall, E. J., L. R. Ward, and B. Rowe. 1998.** “Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 and Salmonella Bacteraemia.” *Lancet (London, England)* 352 (9124): 287–88.
- Threlfall, E. John. 2000.** “Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104—a Truly International Multiresistant Clone.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 (1): 7–10. doi:10.1093/jac/46.1.7.
- Toleman, Mark A., Peter M. Bennett, and Timothy R. Walsh. 2006.** “ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century?” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (2): 296–316. doi:10.1128/MMBR.00048-05.
- Toleman, Mark A., and Timothy R. Walsh. 2011.** “Combinatorial Events of Insertion Sequences and ICE in Gram-Negative Bacteria.” *FEMS Microbiology Reviews* 35 (5): 912–35. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x.
- Varma, Jay K., Katherine D. Greene, Jessa Ovitt, Timothy J. Barrett, Felicita Medalla, and Frederick J. Angulo. 2005.** “Hospitalization and Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Outbreaks, 1984–2002.” *Emerging Infectious Diseases* 11 (6): 943–46. doi:10.3201/eid1106.041231.
- Villa, Laura, Claudia Feudi, Daniela Fortini, Sylvain Brisse, Virginie Passet, Celestino Bonura, Andrea Endimiani, et al. 2017.** “Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance of the KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 Clone.” *Microbial Genomics* 3 (4). doi:10.1099/mgen.0.000110.
- Vo, An T. T., Engeline van Duijkeren, Ad C. Fluit, and Wim Gaastra. 2007.** “A Novel *Salmonella* Genomic Island 1 and Rare Integron Types in *Salmonella* Typhimurium Isolates from Horses in The Netherlands.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (4): 594–99. doi:10.1093/jac/dk1531.
- Vo, An T. T., Engeline van Duijkeren, Ad C. Fluit, Wim J. B. Wannet, Anjo J. Verbruggen, Henny M. E. Maas, and Wim Gaastra. 2006.** “Antibiotic Resistance, Integrons and *Salmonella* Genomic Island 1 among Non-Typhoidal *Salmonella* Serovars in The Netherlands.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 28 (3): 172–79. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.05.027.
- Wall, P. G., D. Morgan, K. Lamden, M. Ryan, M. Griffin, E. J. Threlfall, L. R. Ward, and B. Rowe. 1994.** “A Case Control Study of Infection with an Epidemic Strain of Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in England and Wales.” *Communicable Disease Report. CDR Review* 4 (11): R130-135.
- Wang, Jann-Tay, Pei-Chen Chen, Shan-Chwen Chang, Yih-Ru Shiau, Hui-Ying Wang, Jui-Fen Lai, I-Wen Huang, Mei-Chen Tan, Tsai-Ling Yang Lauderdale, and Tsar Hospitals. 2014.** “Antimicrobial Susceptibilities of *Proteus mirabilis*: A Longitudinal Nationwide Study from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) Program.” *BMC Infectious Diseases* 14. doi:10.1186/1471-2334-14-486.
- Weill, François-Xavier, Laëtizia Fabre, Bernadette Grandry, Patrick A. D. Grimont, and Isabelle Casin. 2005.** “Multiple-Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Paratyphi B Isolates Collected in France between 2000 and 2003 Is Due Mainly to Strains Harboring *Salmonella* Genomic Islands 1, 1-B, and 1-C.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7): 2793–2801. doi:10.1128/AAC.49.7.2793-2801.2005.
- Wiesner, Magdalena, Mussaret B. Zaidi, Edmundo Calva, Marcos Fernández-Mora, Juan J. Calva, and Claudia Silva. 2009.** “Association of Virulence Plasmid and Antibiotic Resistance Determinants with Chromosomal Multilocus Genotypes in

- Mexican *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains.” *BMC Microbiology* 9 (1): 131. doi:10.1186/1471-2180-9-131.
- Wilson, Neil L., and R. M. Hall. 2010.** “Unusual Class 1 Integron Configuration Found in *Salmonella* Genomic Island 2 from *Salmonella enterica* Serovar Emek.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (1): 513–16. doi:10.1128/AAC.00895-09.
- Woerther, Paul-Louis, Charles Burdet, Elisabeth Chachaty, and Antoine Andremont. 2013.** “Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M.” *Clinical Microbiology Reviews* 26 (4): 744–58. doi:10.1128/CMR.00023-13.
- Woodford, Neil, Alessandra Carattoli, Edi Karisik, Anthony Underwood, Matthew J. Ellington, and David M. Livermore. 2009.** “Complete Nucleotide Sequences of Plasmids PEK204, PEK499, and PEK516, Encoding CTX-M Enzymes in Three Major *Escherichia coli* Lineages from the United Kingdom, All Belonging to the International O25:H4-ST131 Clone.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (10): 4472–82. doi:10.1128/AAC.00688-09.
- Wozniak, Rachel A. F., and Matthew K. Waldor. 2010.** “Integrative and Conjugative Elements: Mosaic Mobile Genetic Elements Enabling Dynamic Lateral Gene Flow.” *Nature Reviews Microbiology* 8 (8): 552–63. doi:10.1038/nrmicro2382.
- Wu, Max T., S. A. Carlson, and David K. Meyerholz. 2002.** “Cytotoxic Effects Observed upon Expression of a Repressed Collagenase Gene Present in *Salmonella* and Related Pathogens: Mimicry of a Cytotoxin from Multiple Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Phagetype DT104.” *Microbial Pathogenesis* 33 (6): 279–87. doi:10.1006/mpat.2002.0535.
- Zong, Zhiyong, Sally R. Partridge, and Jonathan R. Iredell. 2009.** “A *bla*_{VEB-1} Variant, *bla*_{VEB-6}, Associated with Repeated Elements in a Complex Genetic Structure.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (4): 1693–97. doi:10.1128/AAC.01313-08.

X. Annexes

Annexe 1 : Liste des gènes de résistance

Liste des gènes de résistance décrits sur les îlots de résistance de type SGI1 ou PGI1 et les résistances qu'ils confèrent aux molécules fréquemment testées au laboratoire

aacC2 : tobramycine, nétilmicine et gentamicine

aacA4 : kanamycine, tobramycine, nétilmicine et amikacine

aacCA5 : gentamicine

aadA1 : streptomycine et spectinomycine

aadA2 : streptomycine et spectinomycine

aadA5 : streptomycine et spectinomycine

aadA7 : streptomycine et spectinomycine

aadB : kanamycine, tobramycine et gentamicine

aphA1a : kanamycine

aphA6 : kanamycine

bla_{CARB-4} : pénicillines

bla_{CTX-M-15} : β -lactamines (sauf céphamycines et carbapénèmes)

bla_{DHA-1} : pénicillines et leurs inhibiteurs et céphalosporines

bla_{PSE-1} : pénicillines

bla_{NDM-1} : β -lactamines (sauf aztréonam)

bla_{VEB-6} : β -lactamines (sauf céphamycines et carbapénèmes)

cmlA9 (floR2) : chloramphénicol

dfrA1 : triméthoprim

dfrA5 : triméthoprim

dfrA7 : triméthoprim

dfrA10 : triméthoprim

dfrA12- : triméthoprim

dfrA15 : triméthoprim

dfrA25 : triméthoprim

floR : chloramphénicol

lnuF : lincosamides

mphR-mrx-mphA : macrolides

qnrA1 : quinolones

qnrB2 : quinolones

rmtC : amikacine, gentamicine, kanamycine et tobramycine

strA, strB : streptomycine

tetA(G) : tétracyclines

Liste des autres gènes de résistance décrits sur les îlots de résistance de type SGI1 ou PGI1 et les résistances qu'ils confèrent

ble_{MBL} : bléomycine

chrA : chrome

qacH : ammoniums quaternaires

merA : résistance au mercure

tmrB : résistance à la tunicamycine

Annexe 2 : Récapitulatif des îlots de résistance SGI1 ou PGI1 décrits

Type d'îlot	Souche	Origine de la souche	Phénotype de résistance**	Gènes de résistance	Références
SGI1	S. Typhimurium DT104	Humaine Canada	ACSSuT	<i>aadA2, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}, qac/sul1</i>	D. Boyd et al. 2001
SGI1-A	S. Agona	Voyageur de retour de Turquie Belgique	ACSSuTTm	<i>aadA2, dfrA1, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}, qac/sul1</i>	Doublet et al. 2004a D. A. Boyd et al. 2002
SGI1-B	S. Typhimurium DT104	Ecosse	ASu	<i>bla_{PSE-1}, qac/sul1</i>	D. Boyd et al. 2001
SGI1-B2	P. mirabilis	Porcs Chine	ATmSSuE	<i>bla_{PSE-1}, qac/sul1, dfrA15, aadA5, qac/sul1, chrA, mphR – mrx – mph(A)</i>	Lei et al. 2015b
SGI1-C	S. Agona	NR*	SSu	<i>aadA2, qac/sul1</i>	D. Boyd et al. 2002 ; D. Boyd et al. 2001
SGI1-D	S. Agona	NR*	SSuTm	<i>aadA2, dfrA10, qac/sul1</i>	D. Boyd et al. 2002
SGI1-E	S. Typhimurium DT104	Ecosse	ASSuT	<i>aadA2, tetA(G), bla_{PSE-1}, qac/sul1</i>	D. Boyd et al. 2001
SGI1-F	S. Albany	Poisson d'origine Thaïlandaise France	ACSuTTm	<i>dfrA1, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}, qac/sul1</i>	Doublet et al. 2003

* NR : non renseigné

**Molécules inactives (uniquement résistance liée aux gènes présents sur la région de multirésistance) : A : amino-pénicilline ; Ctx : céfotaxime ; Im : imipénème ; C : chloramphénicol ; E : érythromycine ; Li : clindamycine ; Ci : ciprofloxacine ; Ak : amikacine ; G : gentamicine ; K : kanamycine ; S : streptomycine/spectinomycine ; Sp : spectinomycine (uniquement) ; To : tobramycine ; Su : sulfamides ; T : tétracyclines ; Tm : triméthoprime

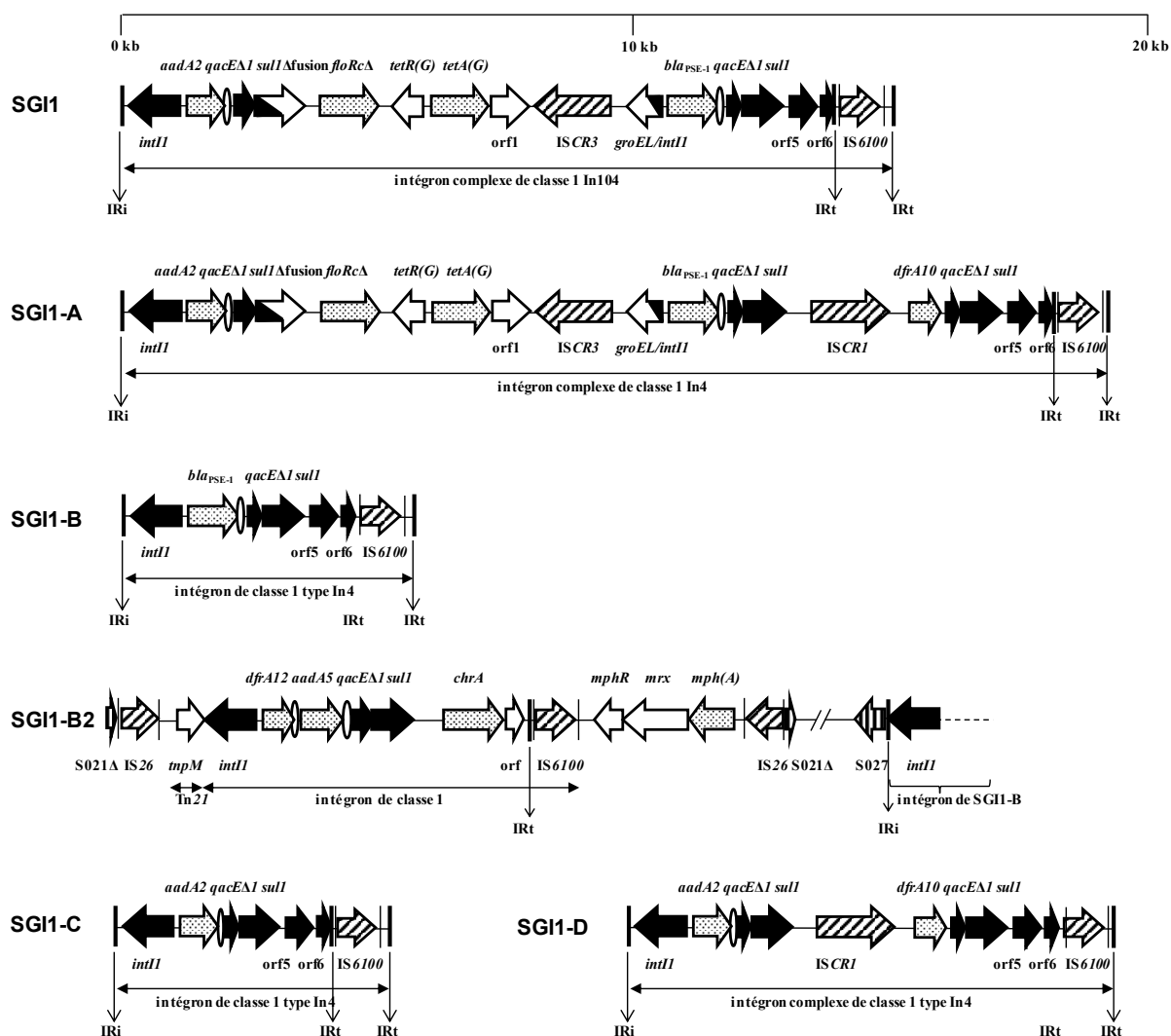
Type d'îlot	Souche	Origine de la souche	Phénotype de résistance**	Gènes de résistance	Références
SGII-G	<i>S. Agona</i>	Volailles Belgique	ASuTm	<i>dfrA10, bla_{PSE-1}, qac/sulI</i>	Doublet al. 2004a
SGII-H	<i>S. Newport</i>	Voyageur de retour d'Egypte France	ACGSSuT	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}</i>	Doublet et al. 2004c
SGII-I	<i>S. Derby</i>	Humaine Malaisie	CSSuTTm	<i>aadA2, floR, tetA(G), dfrA1, qac/sulI</i>	Levings et al. 2005
SGII-K1	<i>S. Kentucky</i>	Epice d'Inde Australie	AGSSuT	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, tetA(G), merA, strB, strA, bla_{TEM-1}</i>	Levings et al. 2007; Doublet et al. 2008a
SGII-K2	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour de Lybie Europe	ASSuT	<i>aadA7Δ, qac/sulI, tetA(G), merA, strB, strAΔ, bla_{TEM-1}</i>	Doublet et al. 2008a
SGII-K3	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour d'Egypte Europe	AGSSuT	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, tetA(G), merA, strB, strA, bla_{TEM-1}</i>	Doublet et al. 2008a
SGII-K4	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour du Soudan Europe	GSSuT	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, tetA(G), merA</i>	Doublet et al. 2008a
SGII-K5	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour d'Egypte Europe	GSSu	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, merA</i>	Doublet et al. 2008a
SGII-K6	<i>S. Newport</i>	Humaine France	AGSSuT	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, tetA(G), merA, strB, strA, bla_{TEM-1}</i>	Doublet et al. 2009a
SGII-L	<i>S. Newport</i>	Egypte	ACSuTTm	<i>floR, dfrA15, qac/sulI, tetA(G), bla_{PSE-1}</i>	Cloekaert et al. 2006
SGII-L1	<i>S. Newport</i>	Humaine France	ACGSSuTTm	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, tetA(G), merA, strB, strA, bla_{PSE-1}, dfrA15, floR</i>	Doublet et al. 2009a
SGII-L2	<i>S. Newport</i>	Humaine France	ACGSSuTTm	<i>aacCA5, aadA7, qac/sulI, tetA(G), merA, strB, strA, bla_{PSE-1}, dfrA15, floR</i>	Doublet et al. 2009a
SGII-M	<i>S. Typhimurium DT104</i>	Cheval Pays-Bas	ACGKSuTTo	<i>aadB, qac/sulI, floR, tetA(G), bla_{PSE-1}</i>	Vo et al. 2007
SGII-O	<i>P. mirabilis</i>	Humaine et dans nourriture Chine	SuTm	<i>dfrA1, qac/sulI</i>	D. A. Boyd et al. 2008

Type d'îlot	Souche	Origine de la souche	Phénotype de résistance**	Gènes de résistance	Références
SGI1-P1 et P2	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour d'Egypte Europe	A	<i>bla</i> _{TEM-1}	Doublet et al. 2008a
SGI1-Q1	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour d'Egypte Europe	aucune	aucun	Doublet et al. 2008a
SGI1-Q2	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour du Kenya Europe	aucune	aucun	Doublet et al. 2008a
SGI1-Q3	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour d'Egypte Europe	aucune	aucun	Doublet et al. 2008a
SGI1-R	<i>S. Paratyphi B dT+</i>	Humaine Australie	ACST	<i>aadA2, qac/sul1*</i> , <i>floR, tetA(G), bla</i> _{PSE-1}	Djordjevic et al. 2009
SGI1-S	<i>S. Virchow</i>	Humaine	AkGKSuTm To	<i>dfrA1, qac/sul1, rmtC, aacC2, merA</i>	Wilson and Hall 2010
SGI1-T	<i>S. Typhimurium</i>	Vache Danemark	CST	<i>aadA2, qac/sul1Δ, floR, tetA(G), bla</i> _{PSE-1Δ}	Targant et al. 2010a
SGI1-U	<i>P. mirabilis</i>	Poulet et humaine Chine	SuTm	<i>dfrA5, sul1</i>	Bi et al. 2011
SGI1-V	<i>P. mirabilis</i>	Humaine France	ACtxKGT NtAkSuTm Ci	<i>aacA4, aadB, dfrA1, qac/sul1, tetA(A)Δ, bla</i> _{VEB-6} , <i>qnrA1</i>	Siebor and Neuwirth 2011
SGI1-W	<i>P. mirabilis</i>	Poulet Chine	SSuLi	<i>aadA2, lnuF, sul1</i>	Lei et al. 2014
SGI1-X	<i>P. mirabilis</i>	Poulet Chine	SuTmCi	<i>dfrA25, qnrB2, sul1</i>	Lei et al. 2014
SGI1-Y	<i>P. mirabilis</i>	Poulet Chine	SuTm	<i>dfrA1, sul1</i>	Lei et al. 2014
SGI1-Z	<i>P. mirabilis</i>	Porcs Chine	aucune	aucune	Lei et al. 2015
SGI1-Zbis	<i>P. mirabilis</i>	Humaine Chine	SSuTm	<i>dfrA12, aadA2, qac/sul1</i>	Qin et al. 2015

Type d'îlot	Souche	Origine de la souche	Phénotype de résistance**	Gènes de résistance	Références
SGI2 (ex SGI1-J1 et J3 et J5)	<i>S. Virchow</i> <i>S. Emek</i>	Humaine Taïwan Eaux usées Australie	CSuTTm	<i>cmlA9, tetA(G), dfrA1, qac/sul1</i>	Levings et al. 2005 Doublet et al. 2009b Chu et al. 2012
SGI2-A (ex SGI1-J2)	<i>S. Emek</i>	Voyageur Australie	SuTm	<i>dfrA1, qac/sul1</i>	Levings, Djordjevic, and Hall 2008
SGI2-B (ex SGI1-J4)	<i>S. Virchow</i>	Humaine Taïwan	Su	<i>sul1</i>	Chu et al. 2012
SGI2-C (ex SGI1-J6)	<i>S. Kentucky</i>	Voyageur de retour de Thaïlande, Indonésie et Inde France	CSSuT	<i>aadA2, qac/sul1, cmlA9, tetA(G)</i>	Le Hello et al. 2012
PGI1	<i>P. mirabilis</i>	Humaine France	AKGToSSu T	<i>aadB, aadA2, qac/sul1, bla_{TEM-135}, aphA1b, aadA1, merA, strB, strA, tetA(A)</i>	Siebor and Neuwirth 2014
PGI1-Hei	<i>S. Heidelberg</i>	NR*	ASuS	<i>qac/sul1, bla_{TEM-135}, strA, strB</i>	Siebor and Neuwirth 2014
PGI1- <i>PmPEL</i>	<i>P. mirabilis</i>	Humaine France	AImKGTon tAkBleSuT m	<i>aacA4, aadB, dfrA1, qac/sul1, tetA(A)Δ, bla_{VEB-6}, aphA6, bla_{NDM-1}, bla_{DHA-1}Δ, ble_{MBL}, merA</i>	Girlich et al. 2015

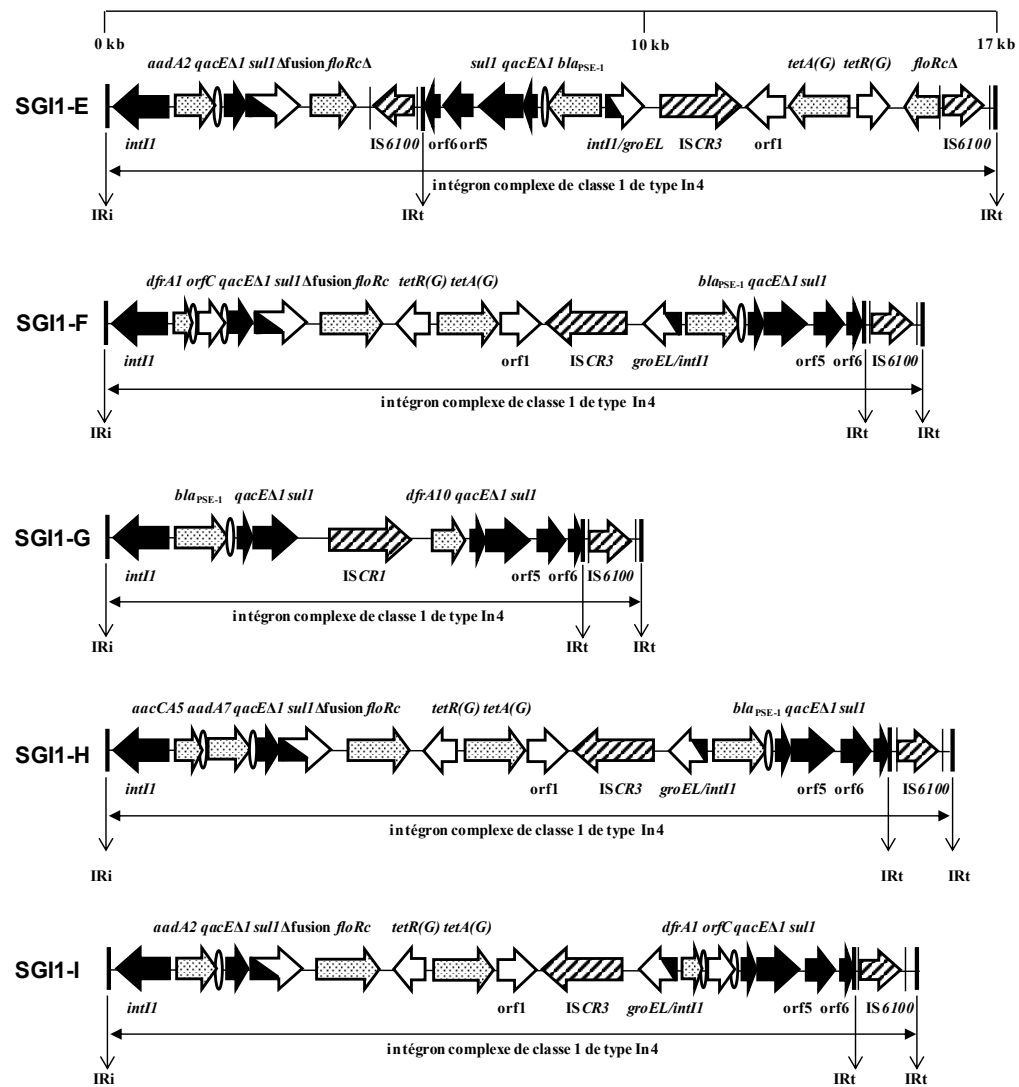
* NR : non renseigné

**Molécules inactives (uniquement résistance liée aux gènes présents sur la région de multirésistance) : A : amino-pénicilline ; Ctx : céfotaxime ; Im : imipénème ; C : chloramphénicol ; E : érythromycine ; Li : clindamycine ; Ci : ciprofloxacine ; Ak : amikacine ; G : gentamicine ; K : kanamycine ; S : streptomycine/spectinomycine ; Sp : spectinomycine (uniquement) ; To : tobramycine ; Su : sulfamides ; T : tétracyclines ; Tm : triméthoprime

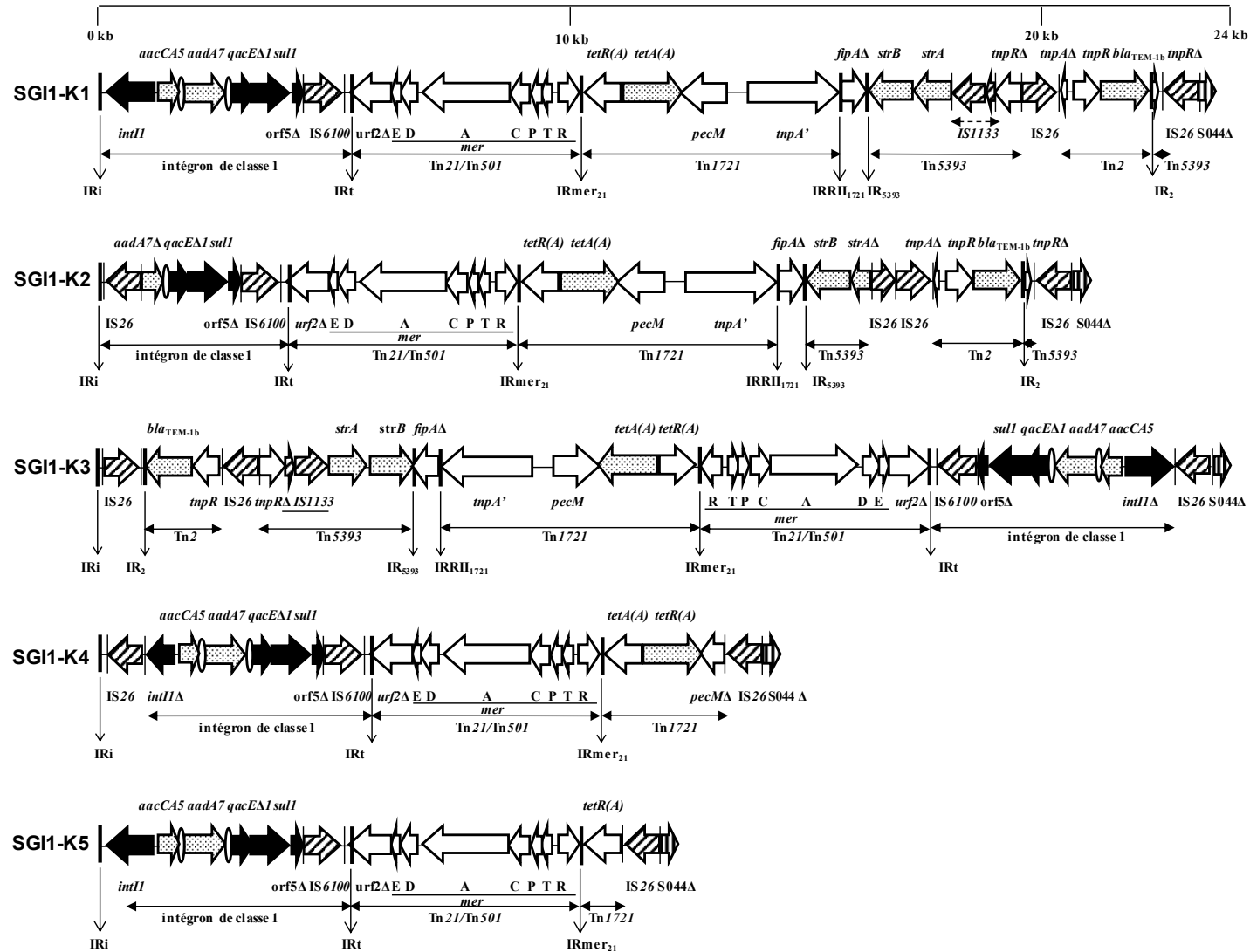
Annexe 3 : Récapitulatif des régions MDR des variants de SGI1

*Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes et des ORFs. Les flèches noires représentent les régions conservées 5'-CS et 3'-CS des intégrons. Les séquences inversées et répétées (IR) des intégrons et des transposons sont indiquées par les barres fines verticales. Les gènes de résistance sont illustrés par les flèches avec des points et les formes ovales représentent les sites *attC*. Les séquences d'insertion sont figurées par les flèches hachurées en biais. Les flèches hachurées verticalement représentent les ORFs du squelette.

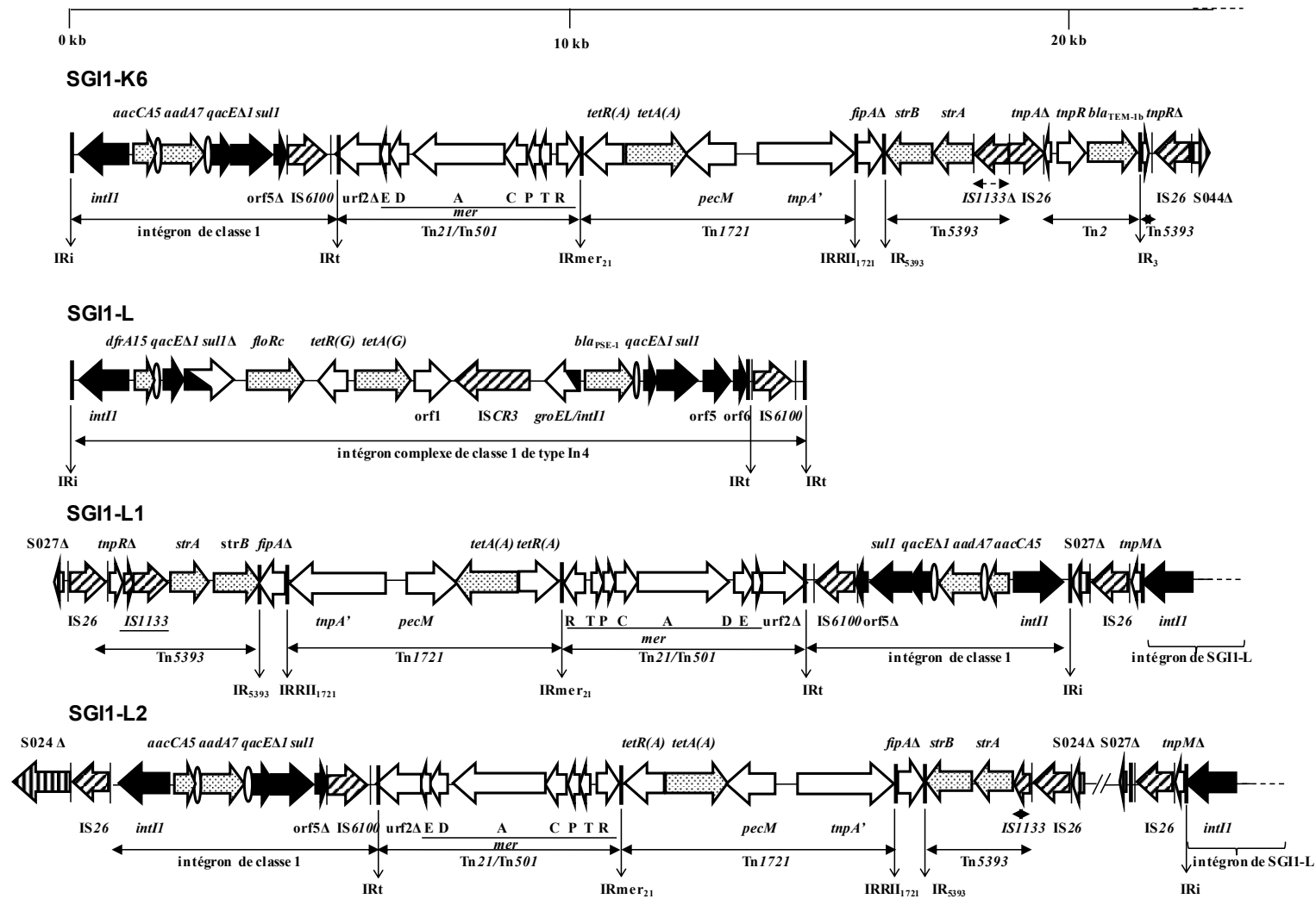
Annexe 3 (suite) : Récapitulatif des régions MDR des variants de SG1*



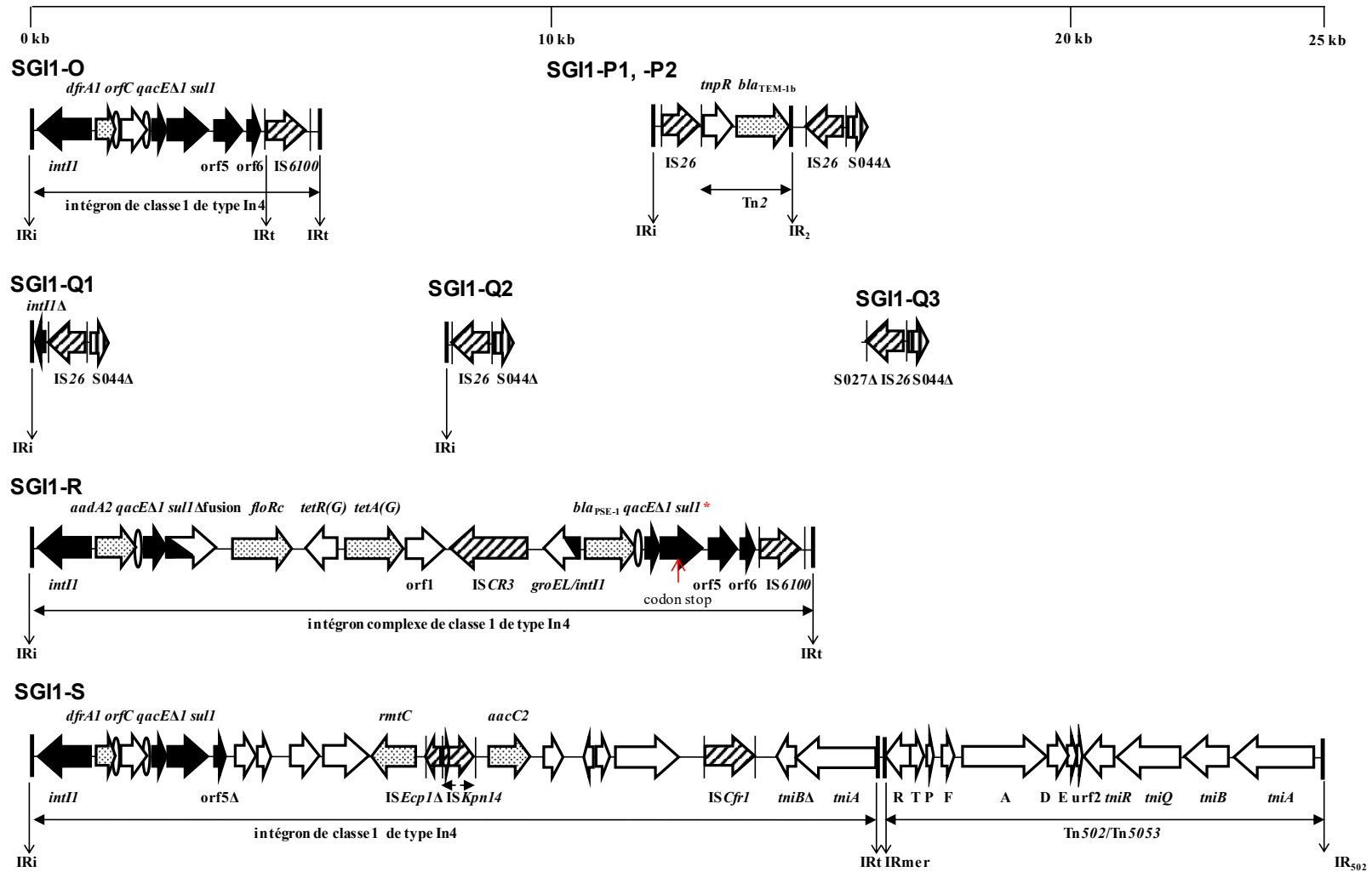
Annexe 3 (suite) : Récapitulatif des régions MDR des variants de SG11*



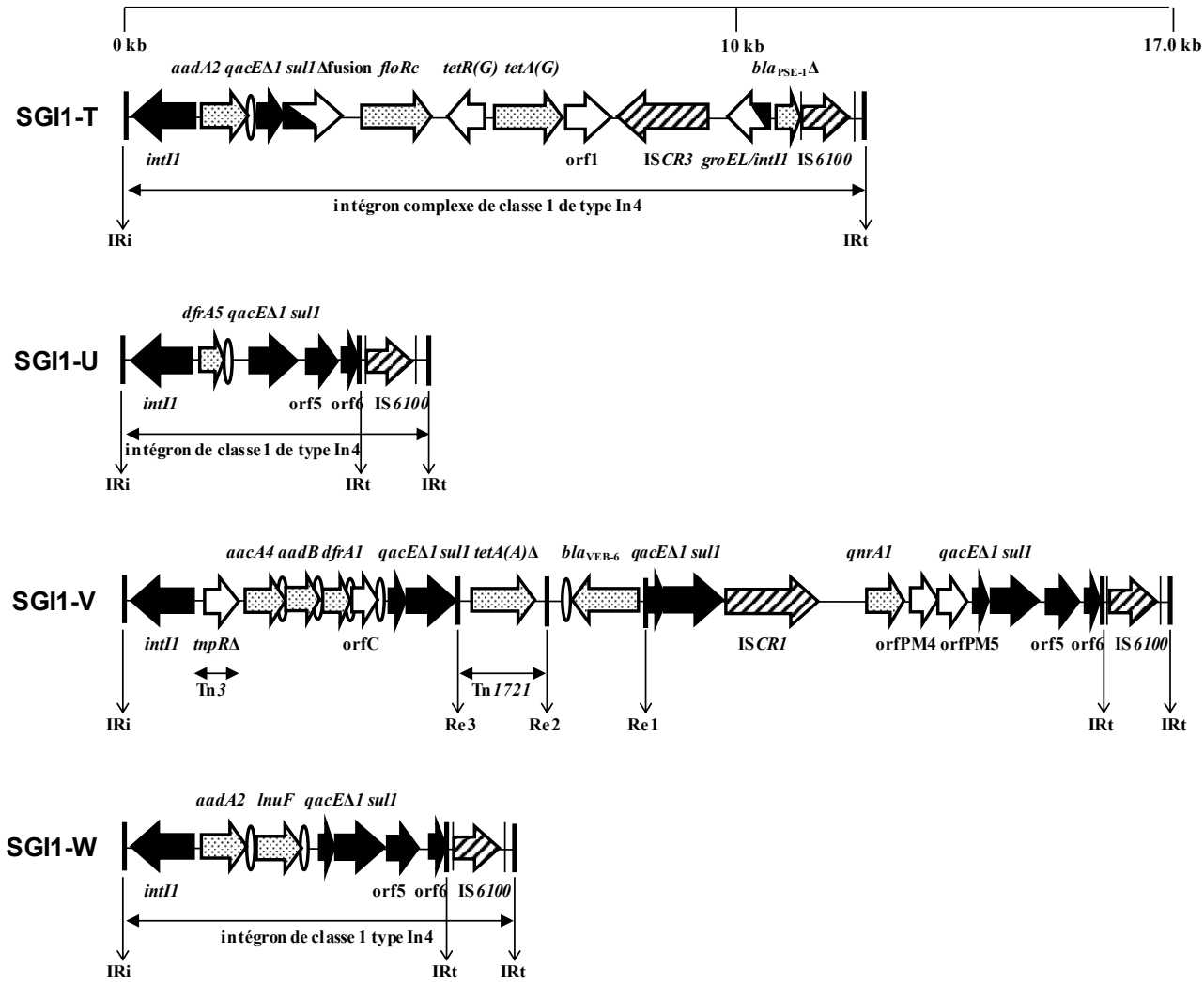
Annexe 3 (suite) Récapitulatif des régions MDR des variants de SGI1*



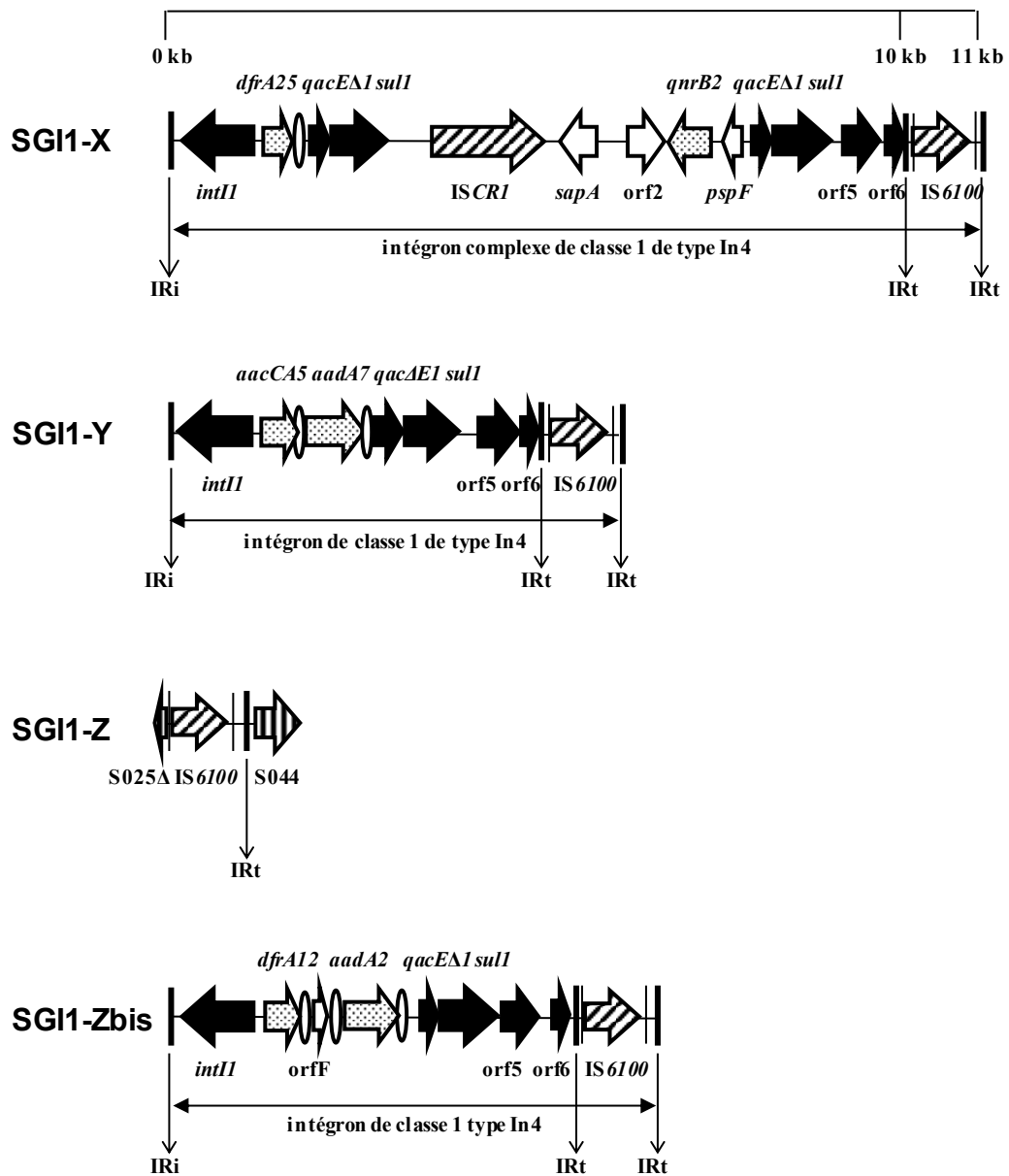
Annexe 3 (suite) : Récapitulatif des régions MDR des variants de SG11*



Annexe 3 (suite) Récapitulatif des régions MDR des variants de SGI1*



Annexe 3 (suite) : Récapitulatif des régions MDR des variants de SGI1*



Annexe 4 : Techniques de biologie moléculaire

- *Extraction de l'ADN bactérien :*

- Extraction par choc thermique

Une demi-ose de bactéries prélevées à partir d'une culture de 24 h à 37°C sur gélose Mueller Hinton est mise en suspension dans 1 ml d'eau pour préparation injectable (EPPI) pour laver les bactéries. Après centrifugation à 20 000 g pendant 5 minutes, le culot bactérien est ré-homogénéisé avec 300 µL d'EPPI. Les bactéries sont alors lysées par choc thermique (10 minutes dans de l'eau bouillante puis 10 minutes dans de la glace). Après centrifugation à 20 000 g pendant 5 minutes, le surnageant contenant l'ADN est conservé à -20°C. Cette méthode a été utilisée pour la réalisation des réactions de polymérisation en chaîne (PCRs).

- Extraction par le kit Gentra® Puregene®, QIAGEN

Les bactéries sont obtenues à partir d'une culture de 12 h à 37°C en bouillon Trypticase Soja. Un millilitre de culture est prélevé et centrifugé. Le culot est lysé en ajoutant 300 µL de solution de lyse cellulaire et en incubant à 80°C pendant 5 minutes. Plusieurs étapes de purification sont réalisées. Un microlitre et demi de RNase A sont ajoutés pour digérer l'ARN présent dans l'extrait. Les protéines sont ensuite précipitées suite à l'ajout de 100 µL de solution de précipitation protéique et d'une centrifugation formant un culot protéique. Le surnageant partiellement purifié est mélangé avec 300 µL d'isopropanol ce qui précipite l'ADN. Le culot d'ADN est rincé par de l'éthanol à 70% puis dissout dans 100 µL de solution d'hydratation d'ADN et incubé une heure à 65°C. L'extrait purifié est congelé à -20°C. Cette méthode a été utilisée pour le séquençage haut débit.

- *Quantification de l'ADN bactérien*

- Dosage de l'ADN par spectrophotométrie

Les concentrations d'ADN sont mesurées par absorbance à la longueur d'onde 260 nm à l'aide du NanoDrop ND-1000, Thermo scientific®. La pureté de l'extrait d'ADN est aussi vérifiée en calculant de ratio d'absorbance 260/280 (protéines, phénols et autres composés organiques absorbant à 280 nm) qui doit être aux alentours de 1,8 et en calculant le ratio 260/230 (autres contaminants qui absorbent à 230 nm) dont la valeur doit avoisiner 2 à 2,2. Cette méthode ne dose pas spécifiquement l'ADN car elle peut être faussée par la présence d'ARN et d'autres contaminants qui absorbent à 260 nm. Elle n'est donc pas très spécifique.

- Dosage de l'ADN par fluorescence

- *Préparation des échantillons :*

Le kit Qubit® dsDNA BR Assay de Invitrogen life technologies a été utilisé. La solution de travail est préparée en ajoutant 199 µL de solution tampon par tube et 1 µL de réactif fluorescent par tube. Deux tubes étalons sont préparés avec 10 µL d'ADN à 0 ng/µL et 10 µL d'ADN à 100 ng/µL afin de tracer la courbe étalon. Selon la concentration attendue en ADN déterminée par spectrophotométrie, 1 à 20 µL d'ADN sont complétés à l'aide de la solution de travail pour obtenir un volume final de 200 µL. Les solutions sont incubées 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- *Dosage par le fluorimètre :*

La gamme d'étalonnage est tracée en mesurant l'intensité de fluorescence des tubes d'ADN à 0 ng/µL et à 100 ng/µL avec l'appareil Qubit®, THERMO SCIENTIFIC®. La fluorescence des tubes échantillons contenant l'ADN est mesurée. L'appareil donne les

résultats en concentration (ng/μL) en tenant compte de la dilution effectuée dans le tube. Cette technique est spécifique de l'ADN et a été utilisée pour doser l'ADN bactérien avant le séquençage haut débit.

- *Migration des produits de PCR par électrophorèse et révélation*

Le fragment d'ADN amplifié est détecté après migration par électrophorèse. Pour cela, 5 μL de produit de PCR et 1 μL d'un marqueur de taille sont mélangés avec 2 μL de bleu de dépôt et sont déposés dans des puits d'un gel d'agarose à 1% en tampon TAE 1X (Tris, Acétate, EDTA). Une échelle de 100 pb (BioLabs® 100 pb DNA ladder) ou une échelle 1 kb (BioLabs® 1kb DNA ladder) est choisie en fonction de la taille attendue du produit de PCR. Les produits de PCR sont ensuite soumis à un courant électrique de 140 Volts pendant 30 minutes dans un tampon TAE 1X. Le fragment d'ADN migre en fonction de sa taille. Une fois la migration terminée, le gel est coloré par une solution de bromure d'éthidium (BET) à 1 mg/l pendant 30 minutes. Les bandes d'ADN ainsi que l'échelle sont révélées à 360 nm grâce à un transilluminateur UV (Vilber Lourmat®) et une caméra permettant de prendre une photographie.

- *Purification des produits de PCR*

Les produits de PCR sont purifiés par filtration sur membrane (Amicon®centrifugal filter, Merck®) préalablement humidifiée avec 300 μL d'EPPI. La totalité du produit de PCR (50 μL environ) est ajoutée dans le réservoir contenant la membrane. Après centrifugation de 15 minutes à 15000 g à 18°C, le filtrat contenant les impuretés (sels, dNTPs et amorces en excès) est jeté. L'ADN présent sur la membrane est récupéré avec 30 μL d'EPPI après centrifugation de 2 minutes à 1000 g à 18°C.

- *Méthodes de séquençage*

- Séquençage par la nouvelle génération de séquençage (NGS) à haut débit

- *Préparation de la librairie*

- ✓ *Tagmentation :*

Dix microlitres de tampon de tagmentation d'ADN (TD) sont mélangés avec 5 µL d'ADN à 0,2 ng/µL et 5 µL de mélange de tagmentation d'amplicon (ATM) dans des tubes de PCR. Après homogénéisation, ce mélange réactionnel est activé dans un thermocycleur pendant 5 minutes à 55°C. Puis, la tagmentation est arrêtée par ajout de 5 µL de tampon de neutralisation de la tagmentation (NT) pendant 5 minutes.

- ✓ *Amplification et indexage des fragments d'ADN tagmentés*

Au préalable, il faut s'assurer *via* le logiciel Experiment manager d'Illumina® que les amorces index choisies pour l'ensemble de la librairie soient compatibles entre-elles.

Les fragments d'ADN tagmentés sont amplifiés et indexés par une PCR. Pour cela, 15 µL de master mix de PCR, 5 µL d'index 1 et 5 µL d'index 2 sont ajoutés dans chacun des tubes PCR. Après homogénéisation du milieu réactionnel, la PCR est mise en route selon le programme suivant (Annexe 7).

- ✓ *Lavage des produits de PCR indexés*

Pour purifier les produits de PCR, 30 µL de billes Agentra AmPureXP de Beckman Coulter® et 50 µL de produits PCR sont mises dans chaque puits d'une plaque midi. Ce mélange est homogénéisé par aspiration et refoulement et incubé pendant 5 minutes à température ambiante pour que les produits de PCR se fixent bien sur les billes. La plaque midi est placée sur une plaque aimantée pour maintenir sur le côté les billes magnétiques fixant l'ADN. Une fois les billes regroupées, le surnageant est éliminé et 200 µL d'éthanol à 80% sont ajoutés pour laver l'ADN fixé sur les billes. Le surnageant est à nouveau éliminé.

Une nouvelle étape de lavage à l'alcool est réalisée. Après séchage des billes, l'ADN est élué grâce à 52,5 µL d'un tampon de re-suspension (RSB). Après homogénéisation du mélange et séparation des billes magnétiques grâce à la plaque aimantée, le surnageant contenant l'ADN purifié est récupéré.

✓ *Normalisation de la librairie*

Au préalable, l'additif de normalisation (LNA1) et les billes de normalisation (LNB1) sont mélangées selon les proportions suivantes : (44 µL de LNA1 + 8 µL de LNB1) X N échantillons. 45 µL de ce mélange est distribué dans chaque puits d'une plaque midi. Puis, 20 µL de chaque échantillon d'ADN pré-traité sont ajoutés dans chaque puits. La plaque midi est alors agitée pendant 30 minutes à 1800 rpm (rotation par minute) pour que l'ADN se fixe sur les billes magnétiques. Ces billes sont retenues à l'aide de la plaque magnétique. L'excès d'ADN présent dans le surnageant est éliminé. Les billes sont alors lavées avec 45 µL de tampon de lavage de normalisation (LNW1). La plaque contenant les échantillons d'ADN est agitée à nouveau 5 minutes à 1800 rpm. Les billes avec l'ADN fixé sont retenues par la plaque aimantée et le surnageant est éliminé. Cette étape est répétée une fois. Enfin, 30 µL de soude 0,1 N, préparée extemporanément, est utilisée pour l'éluion de l'ADN. La plaque est agitée pendant 5 minutes à 1800 rpm puis est mise sur la plaque aimantée. Le surnageant contenant l'ADN est alors récupéré. Dans un tube de stockage, 30 µL de tampon de stockage (LNS1) sont mélangés avec les 30 µL d'ADN normalisé.

✓ *Mélange des librairies*

Le volume des librairies dans le mélange est proportionnel à la taille et au nombre des génomes bactériens étudiés. Il faut un volume final minimal de 24 µL.

✓ *Dénaturation du mélange des librairies*

Un volume de 24 μL du mélange des libraries est ajouté à 576 μL de tampon d'hybridation (HT1). Puis, 4,1 μL d'un contrôle interne PhiX à 20 pM est ajouté. Le mélange homogénéisé est dénaturé par la chaleur dans un bloc chauffant à 96°C pendant 2 minutes puis est refroidi dans de la glace. 600 μL du mélange dénaturé sont introduits dans une cartouche (MiSeq[®] v2 RGT kit 300 cycle) d'Illumina[®].

- *Séquençage par la méthode des terminateurs réversibles*

La cartouche avec la librairie dénaturée est insérée dans le séquenceur. Le séquençage est en « paired-end », c'est-à-dire que les deux extrémités des fragments d'ADN sont séquencées. A la fin du séquençage, il est important de vérifier la densité des clusters (doit-être comprise entre 800 et 1200 K/ mm^2) et la qualité des lectures en regardant le score de Phred. Ainsi, nous avons considéré que le séquençage était de bonne qualité si 85% des lectures avaient un score de Phred > 30 (une probabilité d'erreur d'identification de base < 1/1000).

➤ Séquençage par la méthode de Sanger

- *Réaction de séquençage*

Cette méthode utilise le principe des terminateurs irréversibles (ddNTPs marqués par un fluorochrome). Les produits de PCR utilisés pour la réaction de séquençage sont ajustés à une concentration en ADN égale à 1 ng/100 pb. Pour la réaction de séquençage, la composition du milieu réactionnel et le programme du thermocycleur sont détaillés dans l'annexe 8.

- *Purification des produits d'extension*

Les produits d'extension obtenus sont purifiés en ajoutant 2 μL d'EDTA 125 mM (chélateur des ions Mg^{2+}), 2 μL d'acétate de sodium 3 M (pH = 5,2) (stabilisant de l'ADN sous forme bicaténaire) et 50 μL d'éthanol absolu glacé qui précipite l'ADN. Le mélange est

incubé pendant 15 minutes puis centrifugé pendant 15 minutes à 18 000 g à 4°C. Le culot contenant l'ADN est repris par 70 µL d'éthanol à 70% puis centrifugé à nouveau pendant 10 minutes à 18 000 g à 4°C. Puis il est séché à température ambiante à l'abri de la lumière pendant au moins 30 minutes pour évaporer l'éthanol résiduel. Puis, 10 µL de formamide sont ajoutés sous hotte chimique pour resolubiliser l'ADN.

- Séquençage

Les produits d'extension sont séparés en fonction de leur taille. Le séquenceur (16 capillaires) 3130 XL (Applied®) traduit les signaux en séquence.

➤ Analyse des séquences

Les séquences obtenues (2 fichiers par souche) par le séquençage haut débit sont téléchargées dans le serveur web <http://galaxy.prabi.fr/> pour être analysées. L'outil trimmomatic est paramétré pour sélectionner uniquement les lectures de plus de 50 pb avec un score de Phred >30 et pour supprimer la 1ère base de chaque lecture. Les lectures sont alignées sur la séquence de référence de *P. mirabilis* HI4320 (AM942759) avec l'outil BWA. Ensuite, un filtre est appliqué pour ne sélectionner que les lectures qui n'alignent pas avec la séquence de référence. Les lectures filtrées sont coupées par l'outil Velvet en paramétrant un K-mer égal à 29. L'assemblage réalisé avec Velvetg est paramétré pour obtenir des contigs d'une profondeur au moins égale à 50X et de plus de 200 pb. Les contigs retenus sont alors alignés un à un à l'aide de nucleotide blast à des séquences de la base de données NCBI dans le serveur web <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Pour assembler les contigs, des PCR longues sont effectuées en utilisant des amorces hybridant des régions non répétées. Les produits de PCR obtenus sont séquencés par la méthode de Sanger. Le logiciel Bioedit permet de lire et analyser les chromatogrammes et de corriger les séquences obtenues. Enfin, le

logiciel Integrative Genomics Viewer - Broad Institute® permet de vérifier que les lectures sont bien alignées sur la séquence obtenue de l'îlot de résistance et qu'il n'y a pas de double population, notamment au niveau des régions répétées.

Annexe 5 : Liste des principales amorces utilisées

Type de recherche		Amorce	Séquence de l'amorce (5' – 3')
Recherche de l'îlot SGI (ou PGI)		S026 F	TGGCTACTGCGGAACAAC
		S026 R	TACCTGACTGCCTTCTAG
Recherche des intégrons de classe 1		L1	GGCATCCAAGCAGCAAGC
		R1	AAGCAGACTTGACCTGAT
Recherche des îlots de type SGI (complet ou incomplet)		S005 R	GTTTAACGATGCGGGATC
		S010 F	ATGTATGCCTTAGAGCCG
Recherche des îlots de type PGI		C1599 outR	CATGCCTGGACGATTGAC
		C1598 F	AGAATGGTGGCCTTGCTG
Recherche de la forme intégrée des îlots SGI (ou PGI) (jonctions)	Amorces de l'intégrase de SGI (ou PGI)	<i>intSGI</i> outR2 <i>IntPGI</i> -outR2	GTTCGTAGTCGCGCTTTG GCTCGTAGTCGCGCTTTG
	Amorces de S044 (ou P025)	<i>S044</i> -outF2 <i>P025</i> -outF2	ACACCTGACGAGCTGAAG ACCTCGCAACCTTCAGTG
Recherche de la forme intégrée des îlots SGI (ou PGI) (jonctions) et du site <i>attB</i> intact	Amorces du gène <i>trmE</i>	<i>trmE-Cfreundii</i> -mF <i>trmE-Eaerogenes</i> -mF <i>trmE-Ecloacae</i> -mF <i>trmE-Ecoli</i> -mF <i>trmE-Koxytoca</i> -mF <i>trmE-Kpneumoniae</i> -mF <i>trmE-Pmirabilis</i> -mF <i>trmE-Pvulgaris</i> -mF <i>trmE-Pstuartii</i> -mF <i>thdF-S. Typhimurium</i> <i>trmE-Smarcescens</i> -mF	TCTGCGCGATGCCAGCGA TGACCCGGCGGAGATCTG CTAAACTGCCGATCACCG CCGCGTGCTGTTTATGGT CATCTCAAGCAGAGCATG CCGCGTGCTGTTTATGGT TAGAGTCCTCTTTATGGT AAGAGATTGAGCAAGCAG GCTTGATAGCACCACCAC TAACAAGGCGGATATCAC TCACTTATTCGCCTGTCTG

Annexe 5 (suite) : Liste des principales amorces utilisées

Type de recherche		Amorce	Séquence de l'amorce (5' – 3')
Recherche de la forme intégrée des îlots SGI (ou PGI) (jonctions) et du site <i>attB</i> intact	Amorces du gène chromosomique en aval de <i>trmE</i>	<i>mdtL-Cfreundii</i> -outR <i>mdtL-Eaerogenes</i> -outR <i>mdtL-Ecloacae</i> -outR <i>tnaA-Ecoli</i> -outR <i>nanA-Koxytoca</i> -outF <i>mdtL-Kpneumoniae</i> -outR <i>hipB-Pmirabilis</i> -R <i>PIN-Pvulgaris</i> -outF <i>Transf-Pstuartii</i> -outR <i>Int-ret-Sal</i> -outR <i>iucD-Smarcescens</i> -outR	AATAGCGAAGGCCACCAC GTCCAGCGTATCGCGCAG CACCGGGATGATGCAGGT CTGTCCGGTCAGTAAATCG CATCGTCTGATCGACAGC GGCGATATGTAATTGCGC CCACTCCTCTTTCCATTC ATGATAGACATGTTGTTGC TTGTGCATTCGGCTCTTC AGTTCTTCGAGTTCCAGC GATAATTTGCTGCTCGGTG
Recherche de la forme circulaire – 1 ^{ère} PCR		<i>IntSGI</i> -outR <i>S044</i> -outF <i>IntPGI</i> -outR <i>P025</i> -outF	GTAGTAATCGTAAAAGCTCG GAAGAGGTAGAGCAGTAC GTAGTATTCGTAAAAGCTCG GAAGAGGTAGAGCAGTAC
Recherche de la forme circulaire – 2 ^{ème} PCR		<i>IntSGI</i> -outR2 <i>S044</i> -outF2 <i>IntPGI</i> -outR2 <i>P025</i> -outF2	GTTCGTAGTCGCGCTTTG ACACCTGACGAGCTGAAG GCTCGTAGTCGCGCTTTG ACCTCGCAACCTTCAGTG
Recherche du plasmide IncA ou IncC		<i>repA</i> -F <i>repA</i> -R	GAGAACCAAAGACAAAGACTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT
Recherche du lysotype DT104		DT104-F DT104-R	GTCAGCAGTGTATGGAGCGA AGTAGCGCCAGGACTCGTTA
Contrôle interne positif		INVA-1 INVA-2	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT AGACGACTGGTACTGATCGATAAT

Annexe 6 : PCR classique (amplification d'un fragment d'ADN ≤ 1 kb)

Milieu réactionnel :

Réactif	Volume (μ L)	Concentration finale
dNTP à 1,25 mM	8	0,2 mM
Tampon Taq 10X	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
Amorce sens (10 μ M)	1,25	0,25 μ M
Amorce antisens (10 μ M)	1,25	0,25 μ M
Taq DNA Polymérase (5 UI/ μ L)	0,25	0,025 UI/ μ L
EPPI	Qsp 50	
ADN	1	

Programme du thermocycleur :

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	10 minutes	30
Dénaturation	94°C	1 minute	
Hybridation	50°C	1 minute 30	
Elongation	72°C	1 minute 30	
Elongation finale	72°C	10 minutes	

Annexe 7 : PCR longue (amplification d'un fragment d'ADN entre 1 et 5 kb)

Milieu réactionnel :

Réactif	Volume (μL)	Concentration finale
dNTP à 1,25 mM	12	0,3 mM
Tampon Taq 10X	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
Amorce sens (10 μM)	1,25	0,25 μM
Amorce antisens (10 μM)	1,25	0,25 μM
Taq DNA Polymérase (5 UI/ μL)	0,5	0,05 UI/ μL
EPPI	Qsp 50	
ADN	1	

Programme du thermocycleur :

Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	10 minutes	} 35
Dénaturation	94°C	1 minute	
Hybridation	50°C	1 minute 30	
Elongation	72°C	7 minutes	
Elongation finale	72°C	10 minutes	

Annexe 8 : Programme du thermocycleur pour réaliser l'amplification des fragments d'ADN tagmentés et les indexer en vue de préparer la librairie d'ADN pour le séquençage haut débit

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Préchauffage	72°C	3 minutes	} 12
Dénaturation initiale	95°C	30 secondes	
Dénaturation	95°C	10 secondes	
Hybridation	55°C	10 secondes	
Elongation	72°C	30 secondes	
Elongation finale	72°C	5 minutes	

Annexe 9 : Réaction de séquençage par la méthode de Sanger

Milieu réactionnel :

Réactif	Volume (μL)	Concentration finale
Tampon 5X Applied [®]	4	1X
Bigdye v 1.1 Applied [®] (dNTP + ddNTP + Taq)	2	
Amorce (10 μM) Sigma [®]	0,25	0,125 μM
EPPI	Qsp 20	
Produit de PCR purifié	1	

Programme du thermocycleur :

Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96°C	1 minute	} 25
Dénaturation	96°C	10 secondes	
Hybridation	50°C	10 secondes	
Elongation	60°C	4 minutes	

Annexe 10 : Programme du thermocycleur pour la recherche du lysotype DT104 par PCR

Programme du thermocycleur :

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96°C	1 minute	} 30
Dénaturation	96°C	30 secondes	
Hybridation	60°C	30 secondes	
Elongation	72°C	35 secondes	
Elongation finale	72°C	30 secondes	

Annexe 11 : Milieux utilisés pour la culture de *C. elegans* (D'après Stiernagle 2006)

- Milieu liquide de Luria Bertani (LB) :

10 g de Bacto-tryptone (Becton Dickinson, BD), 5 g d'extrait de levure (Oxoïd) et 5 g de NaCl (Prolabo) sont dissous dans de l'eau pour obtenir 1 l de milieu. Ce milieu est stérilisé par autoclavage.

- Milieu solide NGM (Nematodes growth media) :

Mélanger 3 g de NaCl (Prolabo), 17 g de agar (BD) et 2,5 g de peptone (BD). Ajouter 975 ml d'eau. Cette suspension est stérilisée par autoclavage. Après refroidissement à 55°C pendant 15 minutes, 1 ml de solution de CaCl₂ (Sigma) à 1 M, 1 ml de solution de MgSO₄ (Sigma) à 1M, 1 ml de solution de cholestérol à 5 mg/l et 25 ml d'un tampon de KPO₄ (Merck) sont ajoutés. Ce milieu est alors coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm et de 55 mm de diamètre.

- Milieu liquide M9 :

3 g de KH₂PO₄ (Merck), 6 g de Na₂HPO₄ (Prolabo), 5 g de NaCl et 1 ml d'une solution de MgSO₄ sont mis dans une fiole jaugée de 1 litre qui est complétée par de l'eau. Ce milieu est stérilisé par autoclavage.

- Milieu liquide S-Basal :

5,85 g de NaCl, 6 g de KH₂PO₄, 1 g de K₂HPO₄ (Merck), et 1 ml de solution de cholestérol à 5 mg/l (Sigma) sont mis dans une fiole jaugée de 1 litre qui est complétée par de l'eau. Ce milieu est stérilisé par autoclavage.

XI. Publications

Article n°1 : « Two new *Salmonella* genomic islands 1 from *Proteus mirabilis* and first description of *bla*_{CTX-M-15} on a variant (SGI1-K7)»

Article n°2 : « Mobilization of the *Salmonella* genomic island SGI1 and the *Proteus* genomic island PGI1 by the A/C₂ plasmid carrying *bla*_{TEM-24} harboured by various clinical species of *Enterobacteriaceae* »

Article n°3 : « Does the *Salmonella* Genomic Island 1 SGI1 confer invasiveness properties to human isolates ? »

Two new *Salmonella* genomic islands 1 from *Proteus mirabilis* and first description of blaCTX-M-15 on a variant (SGI1-K7)

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID	JAC-2017-1615.R1
Manuscript Type:	Brief report
Date Submitted by the Author:	24-Jan-2018
Complete List of Authors:	de Curraize, Claire Neuwirth, Catherine; University Hospital, Laboratory of Bacteriology Bador, Julien; University Hospital Chapuis, Angélique; Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Bacteriology Amoureux, Lucie SIEBOR, Eliane; Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Universitaire du Bocage, Laboratoire de Bacteriologie
Keywords:	<i>Proteus mirabilis</i> , plasticity, IS26, qacH, blaCARB-4, blaCTX-M-15, SGI1-K7, <i>Salmonella</i> Genomic Island 1 (SGI1)

SCHOLARONE™
Manuscripts

Two new *Salmonella* genomic islands 1 from *Proteus mirabilis* and first description of *bla*_{CTX-M-15} on a variant (SGI1-K7)

Running title: *bla*_{CTX-M-15} on SGI1-K7

Keywords: *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), SGI1-K7, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CARB-4}, *qacH*, IS26, plasticity, *Proteus mirabilis*

Authors: Claire de Curraize¹, Catherine Neuwirth^{1*}, Julien Bador¹, Angélique Chapuis¹, Lucie Amoureux¹ and Eliane Siebor¹

¹: Laboratory of Bacteriology, Dijon University Hospital, Plateau technique de Biologie, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France and UMR 6249 Chrono-Environnement.

* Corresponding author. Tel: +33-3-80-29-32-60; Fax: +33-3-80-29-32-80;

E-mail: catherine.neuwirth@chu-dijon.fr

1 Abstract

2 Objectives

3 To characterize the structure of *Salmonella* genomic islands 1 (SGI1s) from 2 clinical *Proteus*
4 *mirabilis* isolates: one producing an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and the other
5 a penicillinase.

6 Methods

7 Whole genome sequencing, completed by PCR and Sanger sequencing was performed to
8 determine sequences of SGI1s from *Pm2CHAMA* and *Pm37THOMI* strains.

9 Results

10 Two new variants of SGI1 named SGI1-*Pm2CHAMA* (53.6 kb) and SGI1-K7 (55.1kb) were
11 identified. The backbone of SGI1-*Pm2CHAMA* shared 99.9% identity with that of SGI1. Its
12 MDR region (26.3 kb) harboured two class 1 integrons: an In2-type and an In4-type
13 containing in particular a *qacH* cassette (quaternary ammonium efflux pump). These two
14 integrons framed a complex region (harbouring among others *bla*_{CARB-4}) resulting from
15 transposons insertions mediated by IS26 and successive transposition events of insertion
16 sequences (*ISAbal14* isoform and the new *ISPmi2*). The second variant (SGI1-K7) had the
17 same backbone as SGI1-K. Its MDR region (29.7 kb) was derived from that of SGI1-K and
18 was notably generated by two events mediated by IS26. The first event was an inversion of a
19 large portion of the MDR region of SGI1-K and the second was the insertion of a structure
20 previously reported on plasmids carried by prevalent and successful multidrug resistant clones
21 of Enterobacteriaceae. The second event led to the insertion of the *bla*_{CTX-M-15} gene into SGI1-
22 K7

23 Conclusion

24 This study confirmed the great plasticity of the MDR region of SG11 and its potential key role
25 for the dissemination of clinically significant antibiotic resistance among Enterobacteriaceae.

26

27 **Introduction**

28 In the early eighties, a multidrug resistant clone of *Salmonella* Typhimurium definitive type
29 104 (DT104) emerged from in the United Kingdom and spread all over the world.¹ Most of
30 the isolates carry a genomic island called *Salmonella* Genomic Island **1** (SGI1). Since that
31 time, SGI1 has been described in *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* and *Morganella*
32 *morganii*.^{1,2} SGI1 (42.4 kb) is an integrative mobilizable element made up of a backbone
33 containing 28 open reading frames (ORFs: S001 to S027 and S044) and a multidrug resistant
34 (MDR) region.^{3,4} The MDR region in SGI1 harbours a complex In4-type class 1 integron
35 which contains genetic encoding for multiresistance: ampicillin, chloramphenicol/florfenicol,
36 streptomycin/spectinomycin, sulphonamides and tetracycline resistance (ACSSuT).³ Since the
37 first report, variants of SGI1 (SGI1-A to SGI1-Z) and related islands such as SGI2 and PGI1
38 have been described^{1,5-9}. The backbone is largely conserved among SGI1 variants, but some
39 rearrangements have been reported. For instance, in SGI1-K, there is a deletion of the region
40 spanning from S005 to S009 (2780 bp), which is replaced by an insertion sequence (IS)
41 (IS1359, also named IS*Vch4*) and S044 is truncated by an IS26.⁵ The MDR region is
42 sometimes very complex as a result of various homologous recombinations, loss or exchange
43 of gene cassettes, or IS-element-mediated rearrangements.¹ The MDR region mainly contains
44 genes conferring resistance to old generation of antibiotics or mercuric ions.¹ Nevertheless
45 *rmtC*, which encodes resistance to aminoglycosides, or *qnrA1* and *qnrB2* which encode
46 resistance to fluoroquinolones, has been sporadically reported.^{6,8,10} Concerning genes
47 conferring resistance to broad-spectrum beta-lactams, only *bla*_{VEB-6} [extended spectrum beta-
48 lactamase (ESBL)] and *bla*_{NDM-1} (carbapenemase) have been detected either on SGI1 or

49 **PGI1**.^{6,11} As SGI1 can be mobilized *in vitro* by an A/C plasmid in *Escherichia coli* and other
50 Enterobacteriaceae, it should be regarded as an important vehicle for genes conferring
51 resistance to major antibiotics.^{4,12}

52 Here, we describe two novel SGI1s that harbour resistance genes never before-detected
53 in the MDR region.

54

55 **Materials and methods**

56 ***Bacterial strains***

57 In the context of our continuous survey of *P. mirabilis* with SGI1, the two *Pm2CHAMA* and
58 *Pm37THOMI* isolates that harboured a penicillinase and an ESBL, respectively, were
59 positively screened for the presence of S026 (*sgiA* gene) which is used to detect SGI1-bearing
60 isolates. They were isolated from the urine samples of hospitalized patients at the Dijon
61 university hospital (France) in 2013 and 2014. The API 20E system (bioMérieux, Marcy
62 l'Etoile, France) was used for the biochemical identification of these isolates.

63 ***Susceptibility to antimicrobial agents***

64 Susceptibility to antimicrobial agents was tested using the disk diffusion method on Mueller-
65 Hinton agar in accordance with the CA-SFM/EUCAST guidelines for the following
66 antimicrobial agents: amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ticarcillin, ticarcillin-clavulanic
67 acid, piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam,
68 imipenem, nalidixic acid, ofloxacin, chloramphenicol, kanamycin, spectinomycin,
69 streptomycin, tobramycin, amikacin, gentamicin, sulphonamides, trimethoprim and
70 doxycycline.

71 ***Bacterial DNA preparation, gene amplification and sequencing***

72 Bacterial DNA was extracted with the Gentra[®] Puregene[®] purification kit (Qiagen,
73 Courtaboeuf, France). DNA was then quantified using Qubit[®] (Life Technologies, Payse,
74 United Kingdom). The library was prepared with the Nextera[®]XT kit (Illumina, Eindhoven,
75 Netherlands) following manufacturer instructions. The samples were multiplexed using
76 Illumina-supplied barcodes and paired-end sequencing was performed on the Illumina MiSeq
77 with the 300 cycle (MiSeq[®] Reagent Kit v2) (Illumina, Eindhoven, Netherlands). The reads
78 were assembled using the Velvet tool from the Galaxy web-based platform
79 (<http://www.prabi.fr/spip.php?page=galaxy>). Contigs were analyzed with the Basic Local
80 Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). PCR linkage
81 between genes belonging to non-repeated genetic elements and Sanger sequencing were
82 performed to fill the gap between contigs of interest.

83 *Nucleotide sequence accession number*

84 The nucleotide sequences of SGI1-*Pm2CHAMA* and SGI1-K7 were assigned GenBank
85 accession numbers MF372716 and MF372717, respectively.

86

87 **Results and discussion**

88 *Characterization of SGI1-Pm2CHAMA*

89 *Pm2CHAMA* had acquired resistance to penicillins, spectinomycin, streptomycin,
90 sulphonamides and trimethoprim. It harboured the SGI1-*Pm2CHAMA* of 53.6 kb which was
91 integrated into the specific *attB* attachment site at the 3'-end of the chromosomal *trmE* gene.
92 The backbone was 99.9% identity with that of SGI1 (AF261825) (differences in 41 nt and 20
93 amino acids). The MDR region of 26.3 kb was adjacent to the *res* gene. A 175-bp deletion
94 between the 3'-end of the MDR region and the right-hand of the backbone led to the loss of
95 the 5 bp duplication usually flanking the MDR region and a 5'-truncated S044 (34-bp
96 deletion).

97 The MDR region consisted of two class 1 integrons (Figure 1). The first, an In2-type,
98 contained the *qacH-aadA1* cassette array. The *qacH* gene is known to confer resistance to
99 quaternary ammonium compounds (QACs) by increasing the efflux activity.¹³ It might
100 therefore help *Pm2CHAMA* to survive in the hospital environment, where QACs are widely
101 used as disinfectants. The second class 1 integron was an In4-type containing only *dfrA15*.

102 These two class 1 integrons in direct orientation were separated by a 10.6 kb IS26 flanked
103 region. It contained Tn4352 (*aphA1a*), parts of Tn5393 (*strA* and *strB*) disrupted by an
104 isoform of IS*Aba14* [94% identity with IS*Aba14* (CP001921)]. IS*Aba14* was previously
105 reported in PGI1-*PmPEL*.¹¹ This IS*Aba14* isoform was interrupted by the new IS*Pmi2* of the
106 IS3 family. These IS have been both acquired by transposition as indicated by the presence of
107 direct repeats (CAC for IS*Aba14* and GTCG for IS*Pmi2*). The *strB* gene of Tn5393 was
108 followed by *bla*_{CARB-4} (87% identity with *bla*_{PSE-1}) and a part of the *tns* module of a Tn7-like
109 transposon [(90% identity with Tn7 (DQ176869)]. The *bla*_{CARB-4} is usually a gene cassette,
110 but, in this case, the first 9 bp at the beginning of the cassette and the 119 bp of the *attC* site
111 were missing. This complex region was characterized by the presence of three IS26 in same
112 orientation. This suggested that DNA rearrangements within the region have been generated
113 by IS26 movements. An IS26 next to the In4-type integron might have promoted the
114 recombination with another IS26-bearing element resulting in a cointegrate.¹⁴ Eight-bp direct
115 repeats (CTTCCGGC) were detected next to IS26. Tn4352 might have been generated by
116 incorporation at an existing IS26 of a translocatable unit (TU) made of *aphA1a* and an IS26.
117 The formation of Tn4352 mediated by IS26 was recently reported *in vitro* by Harmer et al.¹⁵

118 **Characterization of SG11-K7**

119 *Pm37THOMI* harboured an ESBL phenotype and was resistant to amoxicillin, amoxicillin-
120 clavulanic acid, ticarcillin, piperacillin, cefotaxime and cefepime. Other acquired resistances
121 were observed: fluoroquinolones, spectinomycin, streptomycin, tobramycin, gentamicin,

122 sulphonamides and trimethoprim. *Pm37THOMI* harboured a 55.1 kb SGI1 variant which was
123 located in a specific site in the 3'-end of the chromosomal *trmE* gene, which we propose to
124 call SGI1-K7. Indeed, its backbone was identical to that of SGI1-K (100 % identity).⁵
125 Moreover, its MDR region (29.7 kb) was derived from that of SGI1-K and resulted from three
126 events (Figure 2).

127 The first one was the inversion of a large part of the MDR region between the integrase gene
128 of the integron containing *aadA7-aacCA5* and *strA* of Tn5393. This inversion was probably
129 due to an intramolecular replicative transposition mediated by the IS26 adjacent to Tn5393.¹⁶
130 Indeed, a second IS26 in opposite orientation was detected at the left of the MDR region.
131 Another event was the deletion of part of Tn5393 (part of *strA*, IS1133 and *tnpR*) and part of
132 *intI1*. This deletion also likely affected target site duplication, which was absent.¹⁶ Finally,
133 another structure which had previously been detected on plasmids from prevalent and
134 successful multiresistant clones of Enterobacteriaceae such as *E. coli* ST131 or *Klebsiella*
135 *pneumoniae* ST307 clones was inserted on the right-hand of the MDR region.^{17,18} It contained
136 *aacC2*, *trmB* (tunicamycin resistance) and *bla*_{CTX-M-15}. The structure harboured a variant of
137 the genetic environment of the *bla*_{CTX-M-15} (257 bp) corresponding to 48 bp upstream
138 *bla*_{CTX-M-15}, plus the 209 bp of the remnant *ISEcp1* as previously described. The promoter of
139 *ISEcp1* was present.¹⁹ There was also a partial *ISKpn11*-like element [86% identity with
140 *ISKpn11* (EU780013)]. This structure in the MDR region contained three copies of IS26 in
141 same orientation including one at each end. No 8-bp target site duplication was detected
142 around the IS26. Therefore, one might suppose that two translocatable units were
143 incorporated successively because of the presence of IS26 next to S044.¹⁵

144 This very first detection of the *bla*_{CTX-M-15} gene on an SGI1 is alarming. Indeed CTX-M-15 is
145 the most widely encountered ESBL among *E. coli* isolates.²⁰ SGI1 might provide stability to
146 *bla*_{CTX-M-15} but also might contribute to its dissemination among Enterobacteriaceae.

147

148 Conclusion

149 This study confirmed the great plasticity of the MDR region and suggested the key role of IS,
150 particularly for IS26 which is widely distributed. These IS promote the accumulation of
151 various resistance genes within the MDR region and lead to a worrisome reduction of
152 therapeutic options.

153

154 Acknowledgements

155 We thank Pr Michael Chandler for his advice on insertion sequences nomenclature and
156 Suzanne Rankin for English corrections.

157 Ethics

158 Not applicable

159 Funding

160 This work was supported by the ADIBAC (Association Dijonnaise des Bactériologistes).

161 Conflict of interests

162 The authors declare that they have no conflict of interest.

163

164 References

- 165 1. Hall RM. *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*.
166 *Future Microbiol* 2010; 5: 1525–38.

- 167 2. Schultz E, Barraud O, Madec J-Y, *et al.* Multidrug Resistance *Salmonella* Genomic Island
168 1 in a *Morganella morganii subsp. morganii* Human Clinical Isolate from France. *mSphere*
169 2017; **2**: e00118-17.
- 170 3. Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, *et al.* Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase
171 genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar
172 Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J*
173 *Bacteriol* 2001; **183**: 5725–32.
- 174 4. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckaert A. The *Salmonella* genomic island 1 is an
175 integrative mobilizable element. *Mol Microbiol* 2005; **55**: 1911–24.
- 176 5. Hamidian M, Holt KE, Hall RM. The complete sequence of *Salmonella* genomic island
177 SG11-K. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 305–6.
- 178 6. Siebor E, Neuwirth C. The new variant of *Salmonella* genomic island 1 (SG11-V) from a
179 *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours *bla*_{VEB-6} and *qnrA1* in the multiple antibiotic
180 resistance region. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2513–20.
- 181 7. Siebor E, Neuwirth C. *Proteus* genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island
182 from two *Proteus mirabilis* French clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3216–
183 20.
- 184 8. Lei C-W, Zhang A-Y, Liu B-H, *et al.* Molecular Characteristics of *Salmonella* Genomic
185 Island 1 in *Proteus mirabilis* Isolates from Poultry Farms in China. *Antimicrob Agents*
186 *Chemother* 2014; **58**: 7570–2.

- 187 9. Lei C-W, Zhang A-Y, Liu B-H, *et al.* Two Novel *Salmonella* Genomic Island 1 Variants in
188 *Proteus mirabilis* Isolates from Swine Farms in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;
189 **59**: 4336.
- 190 10. Wilson NL, Hall RM. Unusual Class 1 Integron Configuration Found in *Salmonella*
191 Genomic Island 2 from *Salmonella enterica* Serovar Emek. *Antimicrob Agents Chemother*
192 2010; **54**: 513–6.
- 193 11. Girlich D, Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Integration of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase
194 gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *J*
195 *Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 98–102.
- 196 12. Siebor E, de Curraize C, Amoureux L, Neuwirth C. Mobilization of the *Salmonella*
197 genomic island SGI1 and the *Proteus* genomic island PGI1 by the A/C2 plasmid carrying
198 *bla*_{TEM-24} harboured by various clinical species of Enterobacteriaceae. *J Antimicrob*
199 *Chemother* 2016; **71**: 2167–70.
- 200 13. Heir E, Sundheim G, Holck AL. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member
201 of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **163**: 49–56.
- 202 14. Harmer CJ, Moran RA, Hall RM. Movement of IS26-Associated Antibiotic Resistance
203 Genes Occurs via a Translocatable Unit That Includes a Single IS26 and Preferentially Inserts
204 Adjacent to Another IS26. *mBio* 2014; **5**: e01801-14.
- 205 15. Harmer CJ, Hall RM. IS26-Mediated Formation of Transposons Carrying Antibiotic
206 Resistance Genes. *mSphere* 2016; **1**: e00038-16.

- 207 16. He S, Hickman AB, Varani AM, *et al.* Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in
208 Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. *mBio* 2015; **6**:
209 e00762-15.
- 210 17. Villa L, Feudi C, Fortini D, *et al.* Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the
211 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genomics* 2017; **3**. Available at:
212 <http://mgen.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000110>.
213 Accessed June 29, 2017.
- 214 18. Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM.
215 Complete Nucleotide Sequences of Plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, Encoding CTX-
216 M Enzymes in Three Major *Escherichia coli* Lineages from the United Kingdom, All
217 Belonging to the International O25:H4-ST131 Clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;
218 **53**: 4472–82.
- 219 19. Dhanji H, Patel R, Wall R, *et al.* Variation in the genetic environments of *bla*_{CTX-M-15} in
220 *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *J Antimicrob*
221 *Chemother* 2011; **66**: 1005–12.
- 222 20. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and
223 International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin*
224 *Microbiol Rev* 2015; **28**: 565–91.

225

Mobilization of the *Salmonella* genomic island SGI1 and the *Proteus* genomic island PGI1 by the A/C₂ plasmid carrying *bla*_{TEM-24} harboured by various clinical species of Enterobacteriaceae

Eliane Siebor, Claire de Curraize, Lucie Amoureux and Catherine Neuwirth*

Laboratory of Bacteriology, University Hospital of Dijon, Plateau technique de Biologie, BP 37013, 21070 Dijon cedex, France

*Corresponding author. Tel: +33-3-80-29-32-60; Fax: +33-3-80-29-32-80; E-mail: catherine.neuwirth@chu-dijon.fr

Received 1 December 2015; returned 18 December 2015; revised 23 March 2016; accepted 4 April 2016

Objectives: The objective of this study was to transfer the *Salmonella* genomic islands (GIs) SGI1 and SGI1-V and the *Proteus* GI PGI1-*PmESC* to clinical isolates of Enterobacteriaceae harbouring an A/C₂ plasmid.

Methods: The entire genetic structures of SGI1 and PGI1-*PmESC* from *Salmonella* Typhimurium and *Proteus mirabilis*, respectively, were characterized by PCR and DNA sequencing. Ten enterobacterial isolates from different species carrying *bla*_{TEM-24} on an A/C₂ plasmid were used for the mobilization of SGI1: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* and *Serratia marcescens*. SGI1-V and PGI1-*PmESC* were transferred to *E. aerogenes*. Conjugation attempts were also performed using the wild strain *E. aerogenes* BOL and *E. coli* K-12 with or without pA/C₂. Detection and location of the GI in the transconjugants were assessed by PCR targeting their junctions.

Results: The multidrug resistance region of PGI1-*PmESC* contained a class 1 integron (*aadB* and *aadA2*) and regions deriving from transposon Tn501 and a hybrid Tn502/Tn5053 transposon, whereas SGI1 harboured the known determinants responsible for the pentaresistance. The transfer of SGI1 occurred from *Salmonella* Typhimurium to the 10 enterobacterial isolates, and transfer of SGI1-V and PGI1-*PmESC* occurred from *P. mirabilis* to *E. aerogenes*. In all transconjugants the GI was located at the 3'-end of *trmE*. SGI1 was also transferred to *E. aerogenes* BOL (pA/C₂) and *E. coli* K-12 (pA/C₂), but not to *E. aerogenes* BOL and *E. coli* K-12.

Conclusions: This is the first known description of SGI1 mobilization into a broad range of enterobacterial species harbouring an A/C₂ plasmid and the first demonstration of PGI1 movement. The A/C₂ plasmid is responsible for the GI mobilization.

Introduction

Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae is a worldwide public health concern. Dissemination of resistance genes has been largely attributed to horizontal transfer of plasmids. Nevertheless, some genetic structures can spread by mobilization. This is the case for *Salmonella* genomic island (GI) 1 (SGI1), consisting of a backbone and a multidrug resistance region where various antibiotic resistance genes are clustered in a complex class 1 integron.¹ SGI1 and derivatives have been described among different serovars of *Salmonella enterica*, but also among *Proteus mirabilis*.² More recently the *Proteus* GI 1 (PGI1), related to SGI1, has been described in *P. mirabilis*.³ Most of these GIs confer resistance to old antibiotics (ampicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulphonamides and tetracycline). Nevertheless, the detection of the *bla*_{VEB-6} ESBL gene in SGI1-V and the *bla*_{NDM-1} carbapenemase

gene in PGI1-*PmPEL* is worrisome.^{4,5} SGI1 and PGI1 integrate into a specific site in the chromosome at the 3'-end of the *trmE* gene (*attB* site). SGI1 is an integrative element that can be mobilized and transferred to non-SGI1 *S. enterica* and *Escherichia coli* by conjugative A/C plasmids such as pR55, but also by some A/C plasmids harbouring *bla*_{CMY-2}.^{6–9} This ability to undergo horizontal transfer might lead to its spread among clinically relevant Enterobacteriaceae, including *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp., which belong to the ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* sp.) pathogens.¹⁰

Since the 1990s, *bla*_{TEM-24} has predominantly been detected in *Enterobacter aerogenes*. The dissemination of a prevalent clone in the European geographical area has been responsible for many outbreaks.^{11,12} Subsequently *bla*_{TEM-24} spread among other enterobacterial species via an epidemic A/C₂ plasmid.^{12,13}

Given that potential *attB* SGI1 target sites have been reported in a number of bacterial species,¹⁴ we investigated whether this plasmid might act as a helper plasmid for the transfer of GIs. To test this hypothesis we have attempted to mobilize SGI1, but also SGI1-V and PGI1-*PmESC*, using the *A/C*₂ plasmid harbouring *bla*_{TEM-24} detected in various clinical enterobacterial species in our collection.

Materials and methods

Bacterial strains

Three clinical strains from our collection harbouring a GI were used as donor strains in conjugation experiments: *S. enterica* Typhimurium DT104 GOS (SGI1), *P. mirabilis* VB1248 (SGI1-V, GenBank accession number HQ888851) and *P. mirabilis* ESC (new PGI named PGI1-*PmESC*).

At our university hospital in Dijon, France, we had to deal with several outbreaks of TEM-24-producing Enterobacteriaceae, and therefore we have a collection of clinical isolates including 10 different species.^{11,13} The recipient strains used in this study were: *Citrobacter freundii* 2954, *E. aerogenes* 409, *Enterobacter cloacae* 646, *E. coli* 565, *Klebsiella oxytoca* 965, *K. pneumoniae* 568, *P. mirabilis* 709, *Proteus vulgaris* 835, *Providencia stuartii* 719 and *Serratia marcescens* 1003. In these isolates *bla*_{TEM-24} has been detected by PCR assays and sequenced as previously described.¹¹ Identification of the plasmid by PCR-based replicon typing, performed as described by Carattoli et al.,¹⁵ revealed that all TEM-24-producing strains harboured an *A/C*₂ plasmid.

Antimicrobial susceptibility of the isolates is presented in Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online).

Transfer of SGI1 was also attempted into *E. coli* K-12 C600 and into the wild isolate of *E. aerogenes* BOL that did not harbour any plasmid. The *A/C*₂ plasmid was introduced into *E. coli* K-12 C600 by conjugation with *E. aerogenes* 409 and into *E. aerogenes* BOL by conjugation with *P. vulgaris* 835.

PCR mapping of SGI1 and PGI1-*PmESC*, and detection of the circular extrachromosomal form of the GIs

The complete nucleotide sequences of SGI1 and PGI1-*PmESC* were obtained by PCR, gene walking and sequencing as previously described.²⁻⁴ The circular extrachromosomal form of the GIs was assessed in all donor strains by two-step DNA amplification (Table S2).⁶

Mobilization assays and detection of the GI in the transconjugants

Conjugation experiments were carried out in Trypticase soy broth. Transfer of SGI1 was performed from *Salmonella* Typhimurium to 10 enterobacterial species, SGI1 being the most prevalent GI detected to date, whereas transfer of SGI1-V and PGI1-*PmESC* was only carried out from *P. mirabilis* to the epidemic strain of *E. aerogenes*. Donor and recipient strains at the end of the exponential growth phase were mixed in a 4:1 ratio. After overnight incubation at 37°C without shaking, 10-fold serial dilutions of the bacterial cells were plated on appropriate selective agar media supplemented with antibiotics. To distinguish the donor from the recipient strains on biochemical characteristics, the following media were used: (i) Drigalski agar for lactose-positive transconjugants; (ii) sorbitol MacConkey agar for sorbitol-negative transconjugants; and (iii) *Salmonella-Shigella* agar for H₂S-negative transconjugants. The concentrations of the antibiotics used to select the transconjugants are listed in Table 1.

Detection and chromosomal location of the GI in the transconjugants were performed by PCR mapping and by PCR targeting the left and right junctions (Table S2). The PCR products of the junctions were sequenced.

Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences of SGI1 and PGI1-*PmESC* were submitted to GenBank and assigned accession numbers KU499918 and KU499917, respectively. The nucleotide sequences surrounding the left and the right junctions of SGI1 with the chromosome in the transconjugants

Table 1. Selective agar media used for the selection of transconjugants

Donor strains (GI)	Recipient strains	Agar media	Antibiotics (mg/L)	Transconjugants
<i>Salmonella</i> Typhimurium GOS (SGI1)	<i>C. freundii</i> 2954	Drigalski agar	RIF (50)+DOX (10)	+ ^a
	<i>E. aerogenes</i> 409	Drigalski agar	RIF (50)+CHL (50)	+ ^a
	<i>E. cloacae</i> 646	<i>Salmonella-Shigella</i> agar	RIF (50)+DOX (50)	+ ^a
	<i>E. coli</i> 565	Drigalski agar	RIF (50)+DOX (10)	+ ^a
	<i>K. oxytoca</i> 603	Drigalski agar	RIF (50)+DOX (10)	+ ^a
	<i>K. pneumoniae</i> 568	Drigalski agar	RIF (50)+DOX (10)	+ ^a
	<i>P. mirabilis</i> 709	sorbitol MacConkey agar	CST (10)+PIP (15)	+ ^a
	<i>P. vulgaris</i> 835	sorbitol MacConkey agar	CST (10)+PIP (15)	+ ^a
	<i>P. stuartii</i> 719	sorbitol MacConkey agar	CST (10)+PIP (15)	+ ^a
	<i>S. marcescens</i> 1003	<i>Salmonella-Shigella</i> agar	CST (10)+CHL (50)	+ ^a
	<i>E. coli</i> K-12 C600	<i>Salmonella-Shigella</i> agar	RIF (50)+CHL (50)	- ^b
	<i>E. coli</i> K-12 C600 (pA/C ₂)	<i>Salmonella-Shigella</i> agar	RIF (50)+CHL (50)	+ ^a
	<i>E. aerogenes</i> BOL	Drigalski agar	RIF (50)+DOX (10)	- ^b
	<i>E. aerogenes</i> BOL (pA/C ₂)	Drigalski agar	RIF (50)+DOX (10)	+ ^a
<i>P. mirabilis</i> VB1248 (SGI1-V)	<i>E. aerogenes</i> 409	Drigalski agar	RIF (50)+GEN (4)	+ ^a
<i>P. mirabilis</i> ESC (PGI1- <i>PmESC</i>)	<i>E. aerogenes</i> 409	Drigalski agar	RIF (50)+GEN (4)	+ ^a

PIP, piperacillin; GEN, gentamicin; CHL, chloramphenicol; DOX, doxycycline; CST, colistin; RIF, rifampicin.

^aAfter a single conjugation experiment.

^bAfter three independent conjugation experiments.

have been assigned accession numbers KU842056 and KU842057 (*C. freundii* 2954-S1F1), KU842058 and KU842059 (*E. aerogenes* 409-S1A1), KU842060 and KU842061 (*E. cloacae* 646-S1L21), KU842062 and KU842063 (*E. coli* 565-S1C1), KU842064 and KU842065 (*K. pneumoniae* 568-S1K38), KU842066 and KU842067 (*K. oxytoca* 603-S1O1), KU842068 and KU842069 (*P. mirabilis* 709-S1P13), KU842070 and KU842071 (*P. vulgaris* 835-S1V1), KU842072 and KU842073 (*P. stuartii* 719-S1T1) and KU842074 and KU842075 (*S. marcescens* 1003-S1M12), and those for the junctions of PGI1-*PmESC* have been assigned accession numbers KU842076 and KU842077 (*E. aerogenes* 409-PESCA22).

Results and discussion

Mapping of SGI1 and PGI1-*PmESC* and detection of the circular extrachromosomal form of the GIs

The SGI1 harboured by the donor strain *Salmonella* Typhimurium GOS contained the known determinants conferring the pentaresistance phenotype ACSSuT and was similar to that deposited in GenBank under accession number AF261825 (only 8 nt differences in the backbone). The backbone of PGI1-*PmESC* was identical to that of PGI1-*PmCHA* (GenBank accession number KJ411925). PGI1-*PmESC* harboured a class 1 integron with the *aadB-aadA2* cassette array and regions deriving from transposon Tn501 and a hybrid Tn502/Tn5053 transposon in the multidrug resistance region (Figure S1).

A circular extrachromosomal form was detected for the three GIs tested, indicating that these islands can excise from the chromosome and circularize to form the *attP* site (Table S3). Subsequently, it could potentially be integrated into the chromosome of another bacterial species.

Mobilization of SGI1 and detection of the GI in the transconjugants

All the enterobacterial isolates used as recipient strains in the conjugation experiments possessed a *trmE* gene and therefore a potential *attB* target site (Table S3).

The conjugative transfer of SGI1 from *Salmonella* Typhimurium to the 10 enterobacterial isolates harbouring an A/C₂ plasmid as well as the transfer of SGI1-V to *E. aerogenes* occurred after a single experiment (Table 1). The antibiotic resistance profile conferred by SGI1 or SGI1-V was observed in the transconjugants (Table S1). As mobilization of SGI1 was obtained in *E. coli* K-12 C600 (pA/C₂) and in *E. aerogenes* BOL (pA/C₂), but not in *E. coli* K-12 C600 or *E. aerogenes* BOL despite three successive attempts, we can conclude that the A/C₂ plasmid in the recipient strains is responsible for SGI1 mobilization.

SGI1 was always integrated into the specific *attB* site at the 3'-end of the chromosomal *trmE* gene (gene encoding a tRNA modification GTPase) by site-specific recombination between the *attB* site of the recipient strain and the *attP* site of SGI1. SGI1 was located between *trmE* and a gene encoding: (i) a multi-drug transporter (*mdtL*) in *C. freundii* 2954, *E. aerogenes* 409 and *E. cloacae* 646; (ii) an *N*-acetyltransferase GCN5 and a multidrug transporter (*mdtL*) in *K. pneumoniae* 568; (iii) a tryptophanase leader peptide (*tnaC*, also named *tnaL*) and a tryptophanase (*tnaA*) in *E. coli* 565; (iv) an *N*-acetyltransferase GCN5 and an *N*-acetylneuraminase lyase (*nanA*) in *K. oxytoca* 603; (v) a transcriptional regulator (*hipB*), a regulatory protein (*hipA*) and the membrane protein PMI3129 in *P. mirabilis* 709; (vi) a PIN family protein and a DNA binding protein in *P. vulgaris* 835; (vii) a

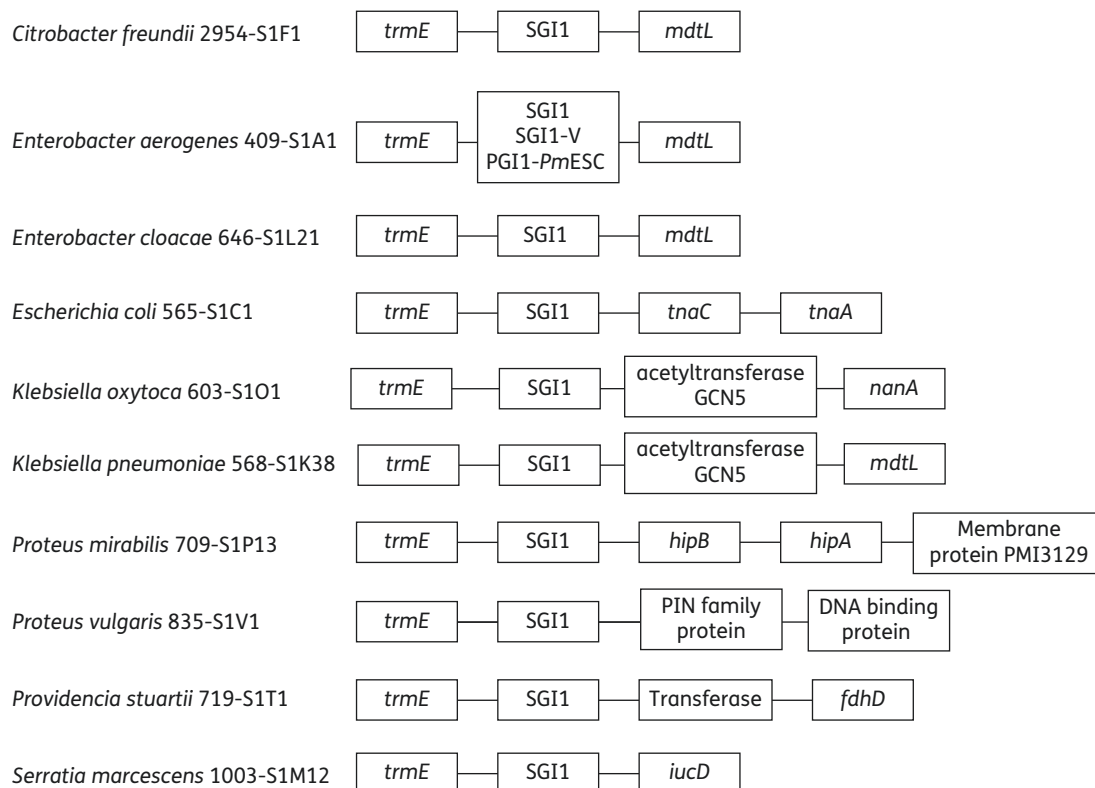


Figure 1. Chromosomal location of the GIs in the transconjugants.

transferase and a formate dehydrogenase accessory protein (*fdhD*) in *P. stuartii* 719; and (viii) a lysine 6-monooxygenase (*iucD*) in *S. marcescens* 1003 (Figure 1).

To date, SGI1 and relatives have been reported to occur naturally only in *S. enterica* serovars and in *P. mirabilis*. SGI1 movement was demonstrated by transfer to *E. coli* after introduction of an A/C plasmid into the *Salmonella* donor strain.⁷ Potential *attB* sites have been predicted in a number of species, but have not been confirmed experimentally.¹⁴ The presence of a potential *attB* site in the 10 enterobacterial species used for our conjugation experiments and the sequencing data of the junctions of SGI1 in our resulting transconjugants confirmed the integration site predicted by Doublet et al.¹⁴ for *K. pneumoniae* and represent new data for the following enterobacterial species: *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *P. stuartii* and *S. marcescens*.

Mobilization of PGI1-PmESC

The conjugative transfer of PGI1-PmESC from *P. mirabilis* to *E. aerogenes* occurred after a single experiment (Table 1). PGI1-PmESC was also integrated into the *attB* site exactly at the same position as SGI1. This demonstrates that PGI1 can be mobilized using an A/C₂ plasmid, whereas Girlich et al.⁵ failed to transfer PGI1-PmPEL from *P. mirabilis* PEL (pR55) to *E. coli* J53 and to *Salmonella* Typhimurium LT2.

PGI1 has been reported to occur naturally in some strains of *P. mirabilis*. To date, PGI1 has been found in a single genome of *Salmonella* (serovar Heidelberg SL476, deposited in the GenBank database, accession number CP001120). However, this island was found in a secondary integration site located between the *sodB* and *purR* genes despite the presence of an *attB* site at the end of *trmE*. This secondary integration site was also occupied by SGI1 in conjugation experiments with a deleted *attB* site.¹⁶

Conclusions

This study demonstrated that a broad range of Enterobacteriaceae of medical interest harbouring a natural A/C₂ plasmid can acquire a GI (SGI1 or PGI1), potentially enhancing the number of GI reservoirs. This is an alarming feature because genes conferring resistance to major antibiotics, such as β -lactams (third-generation cephalosporins and carbapenems), aminoglycosides and fluoroquinolones, have been recently detected in the multidrug resistance region of SGI1 variants or PGI1.^{4,5,17}

Funding

This work was supported by the ADIBAC (Association Dijonnaise des Bactériologistes).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 to S3 and Figure S1 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References


- Hall RM. *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol* 2010; **5**: 1525–38.
- Siebor E, Neuwirth C. Emergence of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) among *Proteus mirabilis* clinical isolates in Dijon, France. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1750–6.
- Siebor E, Neuwirth C. *Proteus* genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island from two *Proteus mirabilis* French clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3216–20.
- Siebor E, Neuwirth C. The new variant of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours *bla*_{VEB-6} and *qnrA1* in the multiple antibiotic resistance region. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2513–20.
- Girlich D, Dortet L, Poirel L et al. Integration of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 98–102.
- Doublet B, Boyd D, Mulvey MR et al. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol* 2005; **55**: 1911–24.
- Douard G, Praud K, Cloeckaert A et al. The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized *in trans* by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *PLoS One* 2010; **5**: e15302.
- Carraro N, Matteau D, Luo P et al. The master activator of IncA/C conjugative plasmids stimulates genomic islands and multidrug resistance dissemination. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004714.
- Kiss J, Nagy B, Olasz F. Stability, entrapment and variant formation of *Salmonella* genomic island 1. *PLoS One* 2012; **7**: e32497.
- Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 2008; **197**: 1079–81.
- Neuwirth C, Siebor E, Lopez J et al. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum β -lactamase to other members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 76–9.
- Novais A, Baquero F, Machado E et al. International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating Enterobacteriaceae clones and an IncA/C₂ plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 825–34.
- Neuwirth C, Siebor E, Pechinot A et al. Evidence of *in vivo* transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum β -lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 1985–8.
- Doublet B, Golding GR, Mulvey MR L et al. Potential integration sites of the *Salmonella* genomic island 1 in *Proteus mirabilis* and other bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 801–3.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- Doublet B, Golding GR, Mulvey MR, Cloeckaert A. Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. *PLoS One* 2008; **3**: e2060.
- Wilson NL, Hall RM. Unusual class 1 integron configuration found in *Salmonella* genomic island 2 from *Salmonella enterica* serovar Emek. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 513–6.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



“Does the *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) confer invasiveness properties to human isolates?”

Claire de Curraize¹, Lucie Amoureux¹, Julien Bador¹, Angélique Chapuis¹, Eliane Siebor¹, Claire Clément¹, Juliette Sauge¹, Ludwig-Serge Aho-Glélé² and Catherine Neuwirth^{1*} 

Abstract

Background: In the eighties, a multidrug resistant clone of *Salmonella* Typhimurium DT104 emerged in UK and disseminated worldwide. This clone harbored a *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) that consists of a backbone and a multidrug resistant region encoding for penta-resistance (ampicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulphonamides and tetracycline (ACSSuT)). Several authors suggested that SGI1 might have a potential role in enhancement of virulence properties of *Salmonella enterica*. The aim of this study was to investigate whether nontyphoidal *S. enterica* isolates carrying SGI1 cause more severe illness than SGI1 free ones in humans.

Methods: From 2011 to 2016, all patients infected with nontyphoidal *S. enterica* in our hospital were retrospectively included. All nontyphoidal *S. enterica* isolates preserved in our University Hospital (Dijon, France) were screened for the presence of SGI1. Clinical and biological data of patients were retrospectively collected to evaluate illness severity. Statistical analysis of data was performed by Kruskal-Wallis test or Fisher's exact test for univariate analysis, and by logistic regression for multivariate analysis.

Results: A total of 100 isolates of *S. enterica* (22 serovars) were collected. Twelve isolates (12%) belonging to 4 serovars harbored SGI1: *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. St Paul*. The severity of the disease was age-related (for invasive infection, sepsis and inflammatory response) and was associated with immunosuppression (for invasive infection, sepsis and bacteremia) but not with the presence of SGI1 or with antimicrobial resistance.

Conclusion: A rather high proportion (12%) of human clinical isolates belonging to various serovars (for the first time serovar *St Paul*) and harboring various antimicrobial resistance profile carried SGI1. Diseases due to SGI1-positive *S. enterica* or to antimicrobial resistant isolates were not more severe than the others. This first clinical observation should be confirmed by a multicenter and prospective study.

Keywords: *Salmonella enterica*, *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), Invasiveness, Human, Antimicrobial resistance

Background

Nontyphoidal salmonellosis is a major zoonotic disease that most often causes gastroenteritis, but invasive infections can also occur and can be severe and life-threatening [1]. The elderly, infants and immunocompromised patients are more likely to have a severe illness. It has been pointed out that strains belonging to some serovars (Heidelberg or Dublin) or to some multidrug resistant epidemic clones

such as the widespread *Salmonella* Typhimurium DT104 are probably more virulent [1]. A few in vitro studies suggest that the virulence in this penta-resistant clone is linked to the presence of a 43 kb integrative mobilizable element called *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) [2, 3]. This element is made of a backbone and a multidrug resistance (MDR) region containing a cluster of genes responsible for the penta-resistance profile (ampicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulphonamides and tetracycline (ACSSuT)) [4]. SGI1 has been reported in various serovars including serovars Agona, Infantis, Kentucky, Paratyphi B variant Java, and so on [5]. Moreover

* Correspondence: catherine.neuwirth@chu-dijon.fr

¹Bacteriology Department, University Hospital Dijon and UMR 6249, PTB, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article



many variants (SGI1-A to Z), in particular variants of the MDR region with other resistance genes, have been described, as well as a related genomic island, called *Proteus* genomic island 1 (PGI1) [5–13]. PGI1 has been notably reported in *S. Heidelberg* [13]. SGI1 is usually integrated at the 3' end of the *thdF* chromosomal gene of *Salmonella enterica* but it is sometimes inserted in a secondary chromosomal attachment site at the 3' end of the *sodB* gene [14]. The prevalence of SGI1 in *S. enterica* is still unknown. Indeed, several studies have searched for the presence of SGI1 in collections of *S. enterica* strains selected according to their antimicrobial resistance or the presence of a class 1 integron or the serovar and therefore probably underestimated the prevalence of SGI1 because some SGI1 variants have no class 1 integron or MDR region [15, 16]. A Dutch study searched for the presence of a class 1 integron in 114 human strains of *S. enterica* and then searched for SGI1 in strains carrying a class 1 integron. They detected 9/114 (7.9%) isolates with SGI1 [17]. Another study detected 17 SGI1-positive isolates out of 90 isolates (19%) selected by their penta-resistance and the presence of a class 1 integron among 1920 isolates from an international collection [18]. A French study detected 16 SGI1 out of 28 (57%) human isolates of *S. Typhimurium* [19]. During the epidemic period (1990–2004) of *S. Typhimurium* DT104 in Scotland, the median prevalence of isolates not containing SGI1, estimated using a Bayesian approach, was 4% in humans [20]. The observation of severity illness in humans or in animals infected with the penta-resistant *S. Typhimurium* DT104 suggests that this clone is potentially more virulent [21, 22]. Several authors observed that SGI1 has a potential role in virulence by modulating expression of *S. enterica* genes, which could lead to hyper-invasiveness [2, 23]. Other authors suggested that antimicrobial resistance increased severe of salmonellosis. One study observed that people were more likely to die after penta-resistant *S. Typhimurium* infection than were those with a pansusceptible *S. Typhimurium* infection [24]. Two other studies showed that the hospitalization rate was higher in patients with a resistant *S. Typhimurium* [25, 26].

The present study has been driven by the observation in our hospital of 2 severe cases of invasive infections due to SGI1-positive *S. Typhimurium* DT104. A 15-year-old immunocompromised boy receiving corticoids and tacrolimus after hematopoietic stem-cells transplantation (acute leukemia) developed bacteremia. Despite a treatment with ceftriaxone 4 g/day during 21 days a septic arthritis of the shoulder occurred 15 days after stopping antibiotic. The second case was a 12-year-old immunocompetent boy who developed a collapsus after severe diarrhea and vomiting caused by *S. Typhimurium* DT104.

Here, a retrospective study was conducted in our hospital to investigate whether SGI1-positive *S. enterica* cause more severe illness than those without SGI1. A second objective

was to establish whether antimicrobial resistance has an impact on severity of the illness.

Methods

Study design

From 2011 to 2016, all patients infected by nontyphoidal *S. enterica* in our hospital were retrospectively included. When the isolate was not preserved in our laboratory, the patient was excluded. Clinical and biological data were retrospectively collected in medical records: age, sex, immunocompetence status, presence of invasive *S. enterica* infection (focal infections at systemic sites and/or bacteremia), sepsis, inflammatory response (hyperleucocytosis or increased CRP), presence of leukocytes and blood in stool, intravenous rehydration required. Patients were considered immunocompromised if they had underlying malignancies, HIV, receiving immunosuppressive treatments or suffering from sickle cell disease.

Identification of isolates and phage-typing

Isolates were identified by biochemical tests using Api20E, Biorad[®]. They were serotyped using the agglutination method with *Salmonella* poly and monovalent sera, Biorad[®] according to internationally standardized methods based on the Kauffman-White scheme. In the absence of corresponding sera in our laboratory, isolates were serotyped by the French National Reference Center *Salmonella*. For *S. Typhimurium* isolates, the phage-type DT104 was screened by PCR as previously described [27].

Susceptibility to antimicrobial agents

Susceptibility to antimicrobial agents was tested using the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar in accordance with the CASFM- EUCAST guidelines of the year when the *S. enterica* was isolated. Antimicrobial profiles (susceptible or resistant) were retrospectively collected. The following antimicrobial agents were tested: amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, nalidixic acid, ofloxacin, chloramphenicol, kanamycin, spectinomycin, streptomycin, tobramycin, amikacin, gentamicin, sulphonamides, trimethoprim and doxycycline.

Detection of SGI1

Each nontyphoidal *S. enterica* isolate was screened for the presence of SGI1 by PCR targeting S026. This gene is highly conserved. To date, only one SGI1 variant without S026 (SGI1-Z) has been reported [11]. This powerful method detects all genomic islands (SGI1 or PGI1) whatever their chromosomal location, as previously described [13, 28]. To screen for the S026 gene, a bacterial DNA template was prepared by the heat lysis of cells. PCR amplifications were carried out with 200 μ M deoxynucleoside triphosphates,

1.5 mM MgCl₂, 0.25 μM of each set of primers (S026 F and S026 R), 1 U of *Taq* DNA polymerase (ThermoScientific®) and 1 μL of bacterial DNA. PCR amplifications were performed in a T3 thermal cycler, as follows: initial denaturation at 94 °C for 10 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 50 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1.5 min; and a final extension at 72 °C for 10 min (Additional file 1).

To determine the type of genomic island, two PCR amplifications were performed on the DNA template of each positive strain with a set of specific primers (S005 R-S010 F) to detect SGI1 and with a set of specific primers (C1596 R - C1594 outF2) to detect PGI1 (Additional file 1). PCR amplifications were carried out with 300 μM deoxynucleoside triphosphates, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 μM of each set of primers, 1 U of *Taq* DNA polymerase (ThermoScientific®) and 1 μL of bacterial DNA. PCR amplifications were performed in a Biometra T3 thermal cycler, as follows: initial denaturation at 94 °C for 10 min; 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 50 °C for 1 min 30 and extension at 72 °C for 7 min; and a final extension at 72 °C for 10 min.

Statistical analysis

– Univariate analysis:

Data were analyzed using a Kruskal-Wallis test to compare quantitative variables as medians for age or the length of hospital stay in days. Fisher's exact test was used to compare qualitative data. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

– Multivariate analysis:

Relationships between the presence of SGI1 and illness severity or between the presence of antimicrobial resistance and illness severity or the determination of risk factors of invasive infections were modeled using a logistic multiple regression model. A robust variance estimator was used and linearity was checked using fractional polynomials. Goodness of fit of the logistic model was assessed through the Homer-Lemeshow statistic.

Statistical analysis was performed with Stat software (Stat Version14).

Results

Proportion and characteristics of SGI1-positive nontyphoidal *S. Enterica*

From 2011 to 2016, 122 patients were included. Twenty-two patients were excluded because their isolates were not preserved. Twenty-two different serovars were detected by serotyping among the 100 isolates. Twelve (12%) patients were infected by SGI1-positive nontyphoidal *S. enterica*. No

isolates harbored PGI1. The SGI1-positive isolates belonged to 4 serovars: *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Kentucky* and *S. St Paul*. The SGI1-positive isolates belonged mainly to serovar Typhimurium (7 isolates) (Table 1). Moreover, the presence of SGI1 was significantly associated to the phage type DT104 (*p* = 0.001) (Table 2). Likewise, there was a link between penta-resistance (ACSSuT) and the presence of SGI1 (*p* < 0.001): two thirds of penta-resistant isolates were SGI1-positive. Despite the fact that history of recent travel was mostly not mentioned in medical records, it has to be noticed that four patients just coming back from Morocco were infected by SGI1-positive isolate: 2 belonging to serovar St-Paul and 2 belonging to serovar Kentucky.

SGI1 and severity of the illness

From the clinical point of view, infections due to SGI1-positive isolates were not more severe than those due to isolates without SGI1. The relationship between the presence of SGI1 and invasive infection, bacteremia and sepsis was not statistically significant (Table 2). There was also no difference after performing multivariate analysis adjusted for age, sex and immunocompetence

Table 1 Characteristics of the strains isolated from patients infected by nontyphoidal *S. enterica*

Serovars	SGI1-positive n (%)	SGI1-negative n (%)
<i>S. Typhimurium</i> (n = 36)	7 (19.4)	29 (80.6)
DT104 (n = 9)	5 (55.6)	4 (44.4)
Non DT104 (n = 27)	2 (7.4)	25 (92.6)
Non <i>S. Typhimurium</i> serovars (n = 64)	5 (7.8)	59 (92.2)
<i>S. 4</i> , [5], 12: i- (n = 19)	0	19 (100)
<i>S. Enteritidis</i> (n = 14)	0	14 (100)
<i>S. Paratyphi B</i> var. Java (n = 2)	0	2 (100)
<i>S. Dublin</i> (n = 5)	0	5 (100)
Other serovars ^a (n = 24)	5 ^b (20.8)	19 (79.2)
Phenotypes ^c	SGI1-positive n (%)	SGI1-negative n (%)
Pansusceptible (n = 21)	0 (0)	21 (100)
Resistant ≥1 (n = 79)	12 (15.2)	67 (84.8)
Including penta-resistant (ACSSuT) ^d (n = 9)	6 (67)	3 (33)

^aOther serovars (n = 24): *S. Ahmadi* (n = 1), *S. Braenderup* (n = 1), *S. Chester* (n = 2), *S. Eastbourne* (n = 1), *S. Eboko* (n = 1), *S. Hadar* (n = 1), *S. Hessarek* (n = 2), *S. Infantis* (n = 2), *S. Kedougou* (n = 1), *S. Kentucky* (n = 2), *S. Napoli* (n = 1), *S. Panama* (n = 1), *S. Rissen* (n = 1), *S. Schwarzengrund* (n = 2), *S. Singapore* (n = 1), *S. St Paul* (n = 3); and a new variant: 6, 7, – (n = 1)

^bOther serovars with SGI1 (n = 5): *S. Infantis* (n = 1), *S. Kentucky* (n = 2), *S. St Paul* (n = 2)

^cPhenotype was determined by testing amoxicillin, amoxicillin – clavulanic acid, ceftriaxone, nalidixic acid, chloramphenicol, kanamycin, spectinomycin, streptomycin, sulphonamides, trimethoprim and doxycycline in accordance to the antimicrobial guidelines of CASFM- EUCAST

^dACSSuT: Amoxicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulphonamides and Tetracyclines

Table 2 SGI1 and severity of the illness: comparison of clinical and biological data^a

Variables	SGI1-positive	SGI1-negative	p-value ^c
N	12	88	
Age (years)	13.9 (56.9)	18.4 (54.2)	<i>p</i> = 0.62
Sex ratio M/F	5/7	42/46	<i>p</i> = 0.77
Immunosuppression	2 (16.7)	15 (17.0)	<i>p</i> = 1.00
Invasive infection	2 (16.7)	13 (14.8)	<i>p</i> = 1.00
Bacteremia	2 (16.7)	10 (11.4)	<i>p</i> = 0.63
Sepsis	2 (16.7)	13 (14.8)	<i>p</i> = 1.00
Fever or hypothermia	5 (41.7)	53 (63.9)	<i>p</i> = 0.21
Missing ^b	0	5	
Inflammatory response	11 (100)	71 (96.0)	<i>p</i> = 1.00
Missing ^b	1	14	
Bloody stool	2 (16.7)	20 (23.5)	<i>p</i> = 0.73
Missing ^b	0	3	
Leukocytes in stool	2 (16.7)	36 (43.9)	<i>p</i> = 0.11
Missing ^b	0	6	
Intravenous hydration required	5 (45.5)	41 (65.1)	<i>p</i> = 0.31
Missing ^b	1	25	
Length of hospital stay in days	2.5 (5)	4 (6)	<i>p</i> = 0.39
Infection with Serovar Typhimurium	7 (58.3)	29 (33.0)	<i>p</i> = 0.11
DT104 phage type	5 (41.6)	4 (4.5)	<i>p</i> = 0.001
Infection with <i>S. enterica</i> harboring at least 1 resistance	12 (100)	67 (76.1)	<i>p</i> = 0.07
Infection with <i>S. enterica</i> harboring penta – resistance (ACSSuT) ^d	6 (50)	3 (3.4)	<i>p</i> < 0.001

^aData are presented as median (interquartile range) for age and for long out of stay in hospital days or number of patients n (%)

^bMissing refers to data not available in medical records

^cFisher's exact test and Kruskal-Wallis test were performed as appropriate and p-values <0.05 were considered statistically significant

^dACSSuT: Amoxicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulphonamides and Tetracyclines

Number italicized were statically significant

status. Corresponding adjusted Odds Ratios (aOR) were: 1.35 (CI_{95%} 0.31–5.86) for invasive infection, 1.82 (CI_{95%} 0.39–8.46) for bacteremia, 1.28 (CI_{95%} 0.21–7.68) for sepsis.

Impact of antimicrobial resistance on the severity of illness

The rate of isolates fully susceptible to all antimicrobial classes was 21% (Table 3). Concerning an eventual link between antimicrobial resistance and severity of the illness it was surprising to notice that patients infected with a resistant isolate (harboring SGI1 or not) developed significantly less bacteremia (7.6%) than those infected with pansusceptible *S. enterica* (28.6%; *p* = 0.02) (Table 4). This result was confirmed by multivariate analysis adjusted for age, sex and immunocompetence status [adjusted Odds ratio (aOR) = 0.10 (CI_{95%}: 0.02–0.55)]. Invasive infections [aOR = 0.16 (CI_{95%}: 0.03–0.72)], and sepsis [aOR = 0.20 (CI_{95%}: 0.05–0.80)] were also significantly less frequent in patients infected with a resistant isolate.

Table 3 Epidemiology of antimicrobial resistance in nontyphoidal *S. enterica* strains^a

Antibiotics	Percentage of resistance
Amoxicillin	37
Amoxicillin –clavulanic acid	17
Cefotaxime	2
Nalidixic acid	9
Ofloxacin	9
Kanamycin	3
Streptomycin	49
Spectinomycin	13
Sulphonamides	52
Trimethoprim	9
Chloramphenicol	12
Doxycycline	61

^aAntimicrobial susceptibility testing was determined in accordance to the antimicrobial guidelines of CASFM-EUCAST

Risk factors to develop nontyphoidal *S. enterica* invasive infections

Patients developing invasive infection, sepsis and an inflammatory response were older than other patients (55.6 versus (vs) 12.7 years old, $p = 0.03$; 57.1 vs 12.7 years old, $p = 0.01$ and 24.3 vs 2.6 years old, $p = 0.04$, respectively) (Table 5). In our study, five patients had underlying malignancies: one pancreatic cancer, one diffuse large B-cell lymphoma, one kidney cancer and two acute myeloid leukemias. Nine patients were received immunosuppressive treatment: infliximab for a Crohn's disease (one case); mesalazine for a Crohn's disease (one case); corticoid therapy for ulcerative colitis (one case); or multiple sclerosis (one case) or back pain following spinal arthrodesis (one case), corticoids and mycophenolate for a kidney transplant (one case), ciclosporine, corticoids and mycophenolate for a kidney transplant (one case), tacrolimus and everolimus for a liver transplant (one case), mycophenolate for lupus (one case). One patient, who also had lung cancer, was receiving everolimus, ciclosporine and corticoids for a heart transplant. Two patients were suffering from sickle-cell disease. As expected, the 17 immunocompromised patients had significantly more invasive infection (41.2% vs 9.6%, $p = 0.003$), bacteremia (29.4% vs 8.4%, $p = 0.03$) and sepsis (35.3% vs 10.8%, $p = 0.02$) than immunocompetent patients (Table 6) [1]. They were also significantly older than immunocompetent patients (54.2 vs 9.7 years old, $p = 0.02$). This observation was confirmed by multivariate analysis, except for bacteremia (aOR = 4.17 (CI_{95%}: 0.99–17.57)). Indeed, immunocompromised patients developed more invasive infections [aOR = 6.30 (CI_{95%}: 1.62–24.46)] and sepsis [aOR = 3.79 (CI_{95%}: 1.03–13.91)] than immunocompetent patients ($n = 83$).

Table 5 Age of patients and severity of illness: comparison of clinical and biological data

Variables (n: number of patients)	Median age ^a	iqr ^a	<i>p</i> -value ^b
Invasive infection			
No ($n = 85$)	12.7	53.5	$p = 0.03$
Yes ($n = 15$)	55.6	61.4	
Bacteremia			
No ($n = 88$)	15.5	53.6	$p = 0.08$
Yes ($n = 12$)	43.1	64.6	
Sepsis			
No ($n = 85$)	12.7	48.8	$p = 0.01$
Yes ($n = 15$)	57.1	46.1	
Fever or hypothermia			
No ($n = 37$)	29	58	$p = 0.24$
Yes ($n = 58$)	9.1	51.7	
Inflammatory response			
No ($n = 3$)	2.6	1.7	$p = 0.04$
Yes ($n = 82$)	24.3	56.6	

^aData are presented in years

^bKruskal - Wallis test was performed and p -values <0.05 were considered statistically significant

Number italicized were statically significant

Discussion

Our study is the first to evaluate the prevalence of clinical isolates of *S. enterica* harboring SGI1 without selection criteria. In our work, we detected SGI1 among various serovars and for the first time in serovar St Paul from 2 patients with a recent history of travel in Morocco. We observed a relatively high rate of 12% of SGI1-positive isolates. This rate is similar to the rate in a Dutch study (7.6%) [17]. Other studies estimated higher rates, probably due to selection on the antimicrobial

Table 4 Antimicrobial resistance and severity of illness: comparison of clinical and biological data

Variables	Infection with pansusceptible isolate ^a ($n = 21$)	Infection with isolate harboring at least 1 resistance ^a ($n = 79$)	Univariate analysis <i>p</i> -value ^b
Age (years)	22.3 (53.7)	15.8 (54)	0.26
Sex ratio (H/F)	12/9	35/44	0.28
Immunosuppression	1 (4.8)	16 (20.3)	0.11
Invasive infection	6 (28.6)	9 (11.4)	0.08
Bacteremia	6 (28.6)	6 (7.6)	0.02
Sepsis	6 (28.6)	9 (11.4)	0.08
Inflammatory response	19 (100)	63 (95.5)	1.00
Missing ^c	2	13	
Fever or hypothermia	13 (65)	45 (60)	0.80
Missing ^c	1	4	

^aData are presented as median (interquartile range) for age or number of patients n (%)

^bFisher's exact test and Kruskal-Wallis test were performed as appropriate and p -values <0.05 were considered statistically significant

^cMissing refers to data not available in medical records

Number italicized were statically significant

Table 6 Host immunocompetence and severity of illness: comparison of clinical and biological data

Variables	Immunosuppression ^a		<i>p</i> -value ^c
	Yes (<i>n</i> = 17)	No (<i>n</i> = 83)	
Age (years)	54.2 (35.7)	9.7 (54.4)	<i>p</i> = 0.02
Invasive infection	7 (41.2)	8 (9.6)	<i>p</i> = 0.003
Bacteremia	5 (29.4)	7 (8.4)	<i>p</i> = 0.03
Sepsis	6 (35.3)	9 (10.8)	<i>p</i> = 0.02
Fever or hypothermia	7 (50.0)	51 (63.0)	<i>p</i> = 0.39
Missing ^b	3	2	
Inflammatory response	16 (100)	66 (95.7)	<i>p</i> = 1.00
Missing ^b	1	14	

^aData are presented as median (interquartile range (IQR) for age or number of patients *n* (%)

^bMissing refers to data not available in medical records

^cFisher's exact test and Kruskal-Wallis test were performed as appropriate and *p*-values <0.05 were considered statistically significant
Number italicized were statistically significant

resistance of isolates. In an Australian study, Levings et al. reported eight SGI1-positive isolates (20.5%) among a collection of 39 clinical strains harboring at least one resistance [29]. Krauland et al., observed 17 SGI1-positive isolates (19%) among 90 penta-resistant isolates with a class 1 integron from a collection of 1920 international isolates [18]. Although, two thirds of penta-resistant isolates were SGI1-positive in our study, our results demonstrated that the penta-resistance (ACSSuT) was not a specific and sensitive marker of SGI1 since only half of the isolates carrying SGI1 harbored this profile in our study. As previously described, most SGI1-positive isolates belonged to the serovar *S. Typhimurium* (13/17, 76.4%) [18]. Finally, we confirmed the strong link between SGI1-positive *S. Typhimurium* and the DT104 phage-type (*p* = 0.001). A French study reported that 138 of 143 isolates of SGI1-positive *S. Typhimurium* (96.5%) belonged to the DT104 phage-type [30].

The resistant profile of our isolates was slightly different from the French data reported in the European report of EFSA in 2014 [31]. In our study the rate of resistance to nalidixic acid was much lower (9% vs 30%) and rates of resistance to amidinopenicillin, cyclines and sulphonamides were higher (37% vs 29.1%, 61% vs 40% and 52% vs 38% respectively). From the clinical point of view some of our results confirmed previous observations: elderly patients and immunocompromised patients were more likely to develop invasive nontyphoidal *S. enterica* infections [1]. Surprisingly we observed that patients infected by nontyphoidal *S. enterica* harbouring at least one resistance developed less invasive nontyphoidal *S. enterica* infections than those infected by pansusceptible isolates. This is not in accord with previous reports which describe an excess of mortality in Danish population or increase in burden of illness in

Canadian population infected by multidrug resistant *S. Typhimurium* [24, 25]. Nevertheless, in a review of the literature on studies using chicken, mice and nematodes, Andersson et al., reported that antimicrobial resistance of *S. Typhimurium* has a fitness cost that is typically observed as a reduced bacterial growth rate [32]. This might explain our observation. Concerning the impact of the SGI1 in virulence, our results did not confirm in vitro studies published to date. In previous reports, it was observed that SGI1 induced hyper invasiveness after exposure to rumen protozoa, partly due to S013 [2, 33, 34]. Other authors showed that collagenase mediated cytopathic effect without repression by the SlyA protein in the presence of SGI1 [22, 35]. Moreover Sahu et al., underlined that the MDR region of *S. Typhimurium* DT104 plays a direct role in virulence against *Caenorhabditis elegans* [3]. Finally, Golding et al. observed that the presence of SGI1 modulated the expression of *Salmonella* genes [23]. To date no study has been conducted in humans. In our study, we did not observe any difference in severity of illness between patients infected by SGI1-positive nontyphoidal *S. enterica* and those infected by SGI1-negative isolates. However, our work is a preliminary study and it should be interesting to confirm this result in a larger study.

Conclusions

In this study, a *Salmonella* genomic island 1 has been detected in 12% of human clinical isolates belonging to various serovars and harbouring various antimicrobial resistance profiles. It might reflect a wide distribution of SGI1 among humans and probably also in animal isolates. Diseases due to SGI1-positive *S. enterica* or to antimicrobial resistant isolates were not more severe than the others. This first clinical observation should be confirmed by a multicenter and prospective study.

Additional file

Additional file 1: Primers used for the PCRs. (DOCX 14 kb)

Abbreviations

ACSSuT: Ampicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulphonamides and tetracycline; aOR: Adjusted odds ratio; CASFM- EUCAST: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie – European Committee on antimicrobial susceptibility testing; EFSA: European food safety authority; MDR: multidrug resistant; SGI1: *Salmonella* Genomic Island 1; Vs: Versus

Acknowledgements

Not applicable

Funding

None

Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

CC designed the study performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript, LA, JB and AC collected clinical results, ES, JS and CCI detected SGI1 by PCR, LSAG performed statistical analysis, CN designed and coordinated the study. All authors read and approved the final version of this manuscript.

Ethics approval and consent to participate

We have retrospectively collected data from patients. These data have been de-identified. This study has been approved by the ethics committee of the University Hospital of Dijon.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Bacteriology Department, University Hospital Dijon and UMR 6249, PTB, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France. ²Epidemiology and Infection Control Department, University Hospital Dijon, Dijon, France.

Received: 26 May 2017 Accepted: 21 November 2017

Published online: 01 December 2017

References

- Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:901–37.
- Carlson SA, Sharma VK, McCuddin ZP, Rasmussen MA, Franklin SK. Involvement of a *Salmonella* Genomic Island 1 gene in the rumen protozoan-mediated enhancement of invasion for multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect Immun.* 2007;75:792–800.
- Sahu SN, Anriany Y, Grim CJ, Kim S, Chang Z, Joseph SW, et al. Identification of virulence properties in *Salmonella* Typhimurium DT104 using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* [Internet]. 2013;8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3790755/> Accessed 11 Nov 2015].
- Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, et al. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol.* 2001;183:5725–32.
- Hall RM. *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol.* 2010;5:1525–38.
- Wilson NL, Hall RM. Unusual class 1 Integron configuration found in *Salmonella* Genomic Island 2 from *Salmonella enterica* Serovar Emek. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:513–6.
- Targant H, Doublet B, Aarestrup FM, Cloeckert A, Madec J-Y. IS₆₁₀₀-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1543–5.
- Bi S, Yan H, Chen M, Zhang Z, Shi L, Wang H. New variant *Salmonella* genomic island 1-U in *Proteus mirabilis* clinical and food isolates from South China. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:1178–9.
- Siebor E, Neuwirth C. The new variant of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours *bla*_{VEB-6} and *qnrA1* in the multiple antibiotic resistance region. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2513–20.
- Lei C-W, Zhang A-Y, Liu B-H, Wang H-N, Guan Z-B, Xu C-W, et al. Molecular characteristics of *Salmonella* Genomic Island 1 in *Proteus mirabilis* isolates from poultry farms in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:7570–2.
- Lei C-W, Zhang A-Y, Liu B-H, Wang H-N, Yang L-Q, Guan Z-B, et al. Two novel *Salmonella* Genomic Island 1 variants in *Proteus mirabilis* isolates from swine farms in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4336–8.
- Qin S, Qi H, Zhang Q, Zhao D, Liu Z-Z, Tian H, et al. Emergence of extensively drug-resistant *Proteus mirabilis* harboring a conjugative NDM-1 plasmid and a novel *Salmonella* Genomic Island 1 variant, SGI1-Z. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:6601.
- Siebor E, Neuwirth C. *Proteus* genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island from two *Proteus mirabilis* French clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:3216–20.
- Doublet B, Golding GR, Mulvey MR, Cloeckert A. Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the Mobilizable salmonella Genomic Island 1. *PLoS One* [Internet]. 2008 ;3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2297512/>. Accessed 15 Aug 2017.
- Doublet B, Praud K, Bertrand S, Collard J-M, Weill F-X, Cloeckert A. Novel insertion sequence- and Transposon-mediated genetic rearrangements in Genomic Island SGI1 of *Salmonella enterica* Serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3745–54.
- Schultz E, Haenni M, Mereghetti L, Siebor E, Neuwirth C, Madec J-Y, et al. Survey of multidrug resistance integrative mobilizable elements SGI1 and PGI1 in *Proteus mirabilis* in humans and dogs in France, 2010–13. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:2543–6.
- Vo ATT, van Duijkeren E, Fluit AC, Wannet WJB, Verbruggen AJ, Maas HME, et al. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28:172–9.
- Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:388.
- Bugarel M, Granier SA, Weill F-X, Fach P, Brisabois A. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC Microbiol.* 2011;11:151.
- Mather AE, Denwood MJ, Haydon DT, Matthews L, Mellor DJ, Coia JE, et al. The prevalences of *Salmonella* Genomic Island 1 variants in human and animal *Salmonella* Typhimurium DT104 are distinguishable using a Bayesian approach. *PLoS One.* 2011;6:e27220.
- Wall PG, Morgan D, Lamden K, Ryan M, Griffin M, Threlfall EJ, et al. A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in England and Wales. *Commun Dis Rep CDR Rev.* 1994;4:R130–5.
- Wu MT, Carlson SA, Meyerholz DK. Cytopathic effects observed upon expression of a repressed collagenase gene present in *Salmonella* and related pathogens: mimicry of a cytotoxin from multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phagetype DT104. *Microb Pathog.* 2002;33:279–87.
- Golding GR, Olson AB, Doublet B, Cloeckert A, Christianson S, Graham MR, et al. The effect of the *Salmonella* genomic island 1 on in vitro global gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Microbes Infect.* 2007;9:21–7.
- Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Mølbak K. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:490–5.
- Martin LJ, Fyfe M, Doré K, Buxton JA, Pollari F, Henry B, et al. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. *J Infect Dis.* 2004;189:377–84.
- Varma JK, Greene KD, Ovitt J, Barrett TJ, Medalla F, Angulo FJ. Hospitalization and Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Outbreaks, 1984–2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:943–6.
- Pritchett LC, Konkel ME, Gay JM, Besser TE. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3484–8.
- Siebor E, Neuwirth C. Emergence of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) among *Proteus mirabilis* clinical isolates in Dijon. *France J Antimicrob Chemother.* 2013;68:1750–6.
- Levings RS, Lightfoot D, Partridge SR, Hall RM, Djordjevic SP. The Genomic Island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. Enterica* Serovars. *J Bacteriol.* 2005;187:4401–9.
- Targant H, Ponsin C, Brunet C, Doublet B, Cloeckert A, Madec J-Y, et al. Characterization of resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from diseased cattle in France (2002 to 2007). *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:419–25.
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *Efsa J.* 2016 [Internet];14(2). Available from: doi: 10.2903/j.efsa.2016.4380.

32. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:260–71.
33. Ogunleye AO, Carlson SA. Emergence of an SGI1-bearing *Salmonella enterica* serotype Kentucky isolated from septic poultry in Nigeria. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6:483–8.
34. Rasmussen MA, Carlson SA, Franklin SK, McCuddin ZP, Wu MT, Sharma VK. Exposure to rumen protozoa leads to enhancement of Pathogenicity of and invasion by multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* bearing SGI1. *Infect Immun.* 2005;73:4668–75.
35. Carlson SA, McCuddin ZP, Wu MT. SlyA regulates the collagenase-mediated cytopathic phenotype in multiresistant *Salmonella*. *Microb Pathog.* 2005;38:181–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Titre : Les îlots de résistance de type SGII (*Salmonella* Genomic Island 1) et apparentés dans des souches humaines cliniques de *Proteus mirabilis* et *Salmonella enterica*

Mots clés : *Salmonella* Genomic Island 1(SGI1) – *Proteus mirabilis* – résistance aux antibiotiques – mobilisation de SGII – virulence – *Caenorhabditis elegans*

Résumé :

Salmonella genomic island 1 (SGI1) est un élément intégratif mobilisable décrit pour la 1^{ère} fois dans un clone penta-résistant de *Salmonella* Typhimurium DT104. Depuis, plusieurs variants et îlots apparentés (*Proteus* genomic island 1 (PGI1)) ont été rapportés dans différents sérotypes de *Salmonella enterica* et chez *Proteus mirabilis*. Ces îlots de résistance sont constitués d'un squelette plutôt stable et d'une région de multi-résistance (MDR) variable. L'objectif de cette thèse était d'étudier ces îlots dans des souches cliniques de *P. mirabilis* (CHU de Dijon et Lariboisière à Paris) et de *S. enterica* (CHU de Dijon).

La prévalence de ces îlots variait de 5 à 16% chez *P. mirabilis* ayant acquis au moins une résistance. L'étude génotypique a montré une grande diversité des souches mais également la présence de quelques clones porteurs de SGII ou PGI1. Le séquençage de ces îlots a mis en évidence la grande plasticité des régions MDR souvent en lien avec des mouvements d'IS26. Ces dernières permettent à la région MDR de s'enrichir en nouveaux gènes de résistance (ex : *bla*_{CTX-M-15}) présents dans des structures antérieurement décrites sur des plasmides de clones d'entérobactéries répandus. De nombreuses espèces d'entérobactéries porteuses d'un plasmide IncA/C sont capables d'acquérir par conjugaison un îlot provenant d'une autre entérobactérie. Cet îlot s'intègre alors au niveau du site chromosomique spécifique (*trmE*). Sous pression antibiotique et en présence d'un plasmide IncA/C, les souches peuvent être complètement excisées de leur îlot. Ainsi, ces îlots sont des interfaces de résistance à la fois stables mais aussi dynamiques favorisant la dissémination des gènes de résistance.

Une virulence accrue par la présence de ces îlots chez *S. enterica* n'a pas pu être confirmée ni dans le modèle d'infection expérimentale de *C. elegans*, ni dans une étude rétrospective chez l'homme (prévalence de 12%). En revanche, *P. mirabilis* avait tendance à être plus pathogène chez *C. elegans* lorsqu'il était porteur d'un îlot.

Title: *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) and relative genomic islands from clinical *Proteus mirabilis* and *Salmonella enterica* isolates

Keywords : *Salmonella* Genomic Island 1(SGI1) – *Proteus mirabilis* – antimicrobial resistance – mobilization of SGII – virulence – *Caenorhabditis elegans*

Abstract :

Salmonella genomic island (SGI1) is an integrative mobilizable element initially described in an epidemic multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. Since this first report, many variants and related genomic islands (*Proteus* genomic island 1 (PGI1)) have been described among *Salmonella enterica* serovars and in *Proteus mirabilis*. These islands have a stable backbone and a highly variable multidrug-resistant (MDR) region. The objective of this work was to study SGI1 from clinical *P. mirabilis* isolates (University hospitals of Dijon and Lariboisière - Paris) and *S. enterica* (University hospital of Dijon)

The prevalence of these islands ranged from 5% to 16% in *P. mirabilis* with at least one acquired resistance. The genotypic analysis revealed a wide diversity among isolates but also the presence of some clonal isolates harbouring SGII or PGI1. Genomic island sequencing revealed the great plasticity of MDR regions, primarily mediated by IS26. Thanks to IS26 movements, the MDR region gains resistance genes (such as *bla*_{CTX-M-15}) present in structures initially detected in plasmids from widely distributed Enterobacteriaceae. Many species of Enterobacteriaceae that harbour IncA/C plasmids are able to acquire islands by conjugation. These islands are then incorporated into specific sites on the chromosome (*trmE*). They could also be completely excised from Enterobacteriaceae under antibiotic pressure in the presence of an IncA/C plasmid. Genomic islands should be regarded on the one hand as a steady interface of resistance and on the other hand as a dynamic interface conveying resistance genes.

Finally, SGII of *S. enterica* was not found to increase virulence in a *Caenorhabditis elegans* model or in a retrospective clinical study (12% of prevalence). However, it seems that *P. mirabilis* becomes more virulent when it harbours SGII in *Caenorhabditis elegans*.