

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie - Santé

FACULTE DE MEDECINE

Année : 2004

Thèse N°

**Thèse
pour obtenir le grade de**

DOCTEUR DE L' UNIVERSITE DE LIMOGES

Spécialité : MICROBIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Amy GASSAMA, SOW

Le 11 Octobre 2004

ETUDE DU ROLE DES INTEGRONS DANS LA MULTIRESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES BACTERIES ENTEROPATHOGENES ISOLEES EN AFRIQUE SUB - SAHARIENNE

**Thèse dirigée par Monsieur le Professeur François DENIS
Co-dirigée par Mademoiselle le Docteur Marie-Cécile PLOY**

JURY :

Monsieur le Professeur Thierry LAMBERT, rapporteur
Monsieur le Professeur Jacques SIROT, rapporteur
Monsieur le Professeur François DENIS
Monsieur le Professeur Yves BUISSON
Monsieur le Professeur Souleymane MBOUP
Mademoiselle le Docteur Marie-Cécile PLOY

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur Jacques SIROT et Monsieur le Professeur Thierry LAMBERT d'avoir bien voulu juger ce travail et d'accepter d'en être les rapporteurs.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Yves BUISSON, d'avoir bien voulu accepter de siéger dans ce jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur François DENIS qui m'a accueilli dans son laboratoire. Sa disponibilité constante, ses compétences scientifiques, forcent l'admiration de tous. Je tiens à lui exprimer ici l'expression de ma gratitude et mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur le Professeur Souleymane MBOUP de m'avoir encadrée tout au long de ma formation et d'avoir su guider mes pas dans cette exaltante fonction d'enseignant - chercheur.

Je tiens à remercier très sincèrement et du fond du cœur Mademoiselle le Docteur Marie-Cécile PLOY. Pendant toutes ces années, elle m'a encadrée et soutenue sur tous les plans, sans jamais perdre patience et toujours dans la bonne humeur. Sa disponibilité constante, sa rigueur scientifique et ses qualités humaines nous ont permis de mener à bien ce travail. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Je suis très reconnaissante envers Madame le Docteur Awa Kane-AIDARA qui m'a toujours soutenue et m'a fait confiance en me proposant la conduite des travaux de recherche du laboratoire de Bactériologie Expérimentale. Elle n'a ménagé aucun effort pour mon intégration à l'Institut Pasteur. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur François SIMON, directeur de l'Institut Pasteur de Dakar pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant la fonction de chercheur.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Habib NGOM, directeur de l'Ecole Supérieure de Polytechnique, UCAD, qui m'a permis de concilier mes travaux de thèse à Limoges et mes enseignements à Dakar.

Un grand merci au personnel du laboratoire de Bactériologie - Virologie - Hygiène du CHU de Limoges pour leur accueil chaleureux. A Sophie Collot, pour les bons moments passés ensemble. A Delphine Chainier pour sa participation à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent au personnel du laboratoire de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar et à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement EGIDE qui m'a permis de préparer ma thèse dans les meilleures conditions.

Par la Grâce d'ALLAH, le Tout Puissant, à son prophète Mohamed (P.S.L)

Je dédie ce travail à

Mamadou Galo, mon papou
Demba qui m'a toujours soutenue
avec beaucoup d'amour et de patience
Ma mère et toute ma famille, merci
d'avoir été là lors des moments de doutes
A mes amis, pensées affectueuses

A mon pays le Sénégal,
A la France mon pays d'accueil!

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Introduction	5
I- Les diarrhées bactériennes	9
1- Introduction	9
2- Les salmonelloses	10
3- Les shigelloses	12
4- Le choléra	14
5- Les entérites à <i>Escherichia coli</i>	16
5-1- <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	16
5-2- <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (EPEC)	17
5-3- <i>Escherichia coli</i> entéroinvasifs (EIEC)	18
5-4- <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	18
5-5- <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégants (EAaggEC)	18
5-6- <i>Escherichia coli</i> entéroadhérents ou à adhésion diffuse (DAEC)	19
6- Les campylobactérioses	20
7- Les yersinioses	22
II- Les intégrons	23
1- Définition	23
2- Structure des intégrons	23
2-1 - Région 5' conservée	24
2-1-1 - Gène <i>intI</i>	24
2-1-2 - Site <i>attI</i>	25
2-1-3 - Région promotrice	25
2-2 - Région 3'	26
3 - Caractéristiques des cassettes	27
3-1 - Structure des cassettes	28
3-1-1- Gènes	28
3-1-2- Site <i>attC</i>	28
3-2 - Mouvement des cassettes	29
3-2-1 - Rôle de l'intégrase	29

3-2-2 - Sites reconnus par l'intégrase	30
3-2-2-1 - Sites spécifiques	30
3-2-2-2 - Sites non spécifiques	30
3-2-3 - Mécanismes d'intégration et d'excision des cassettes	31
3-3 - Expression des cassettes	32
4 - Epidémiologie des intégrons	33
4-1- Intégrons de classe 1	34
4-1-1- Souches d'origine humaine	34
4-1-1-1 - Bactéries à Gram négatif	34
4-1-1-2 - Bactéries à Gram positif	34
4-1-1-3 - Mycobactéries	35
4-1-2- Souches d'origine animale	35
4-1-3- Souches d'origine environnementale	36
4-2 - Intégrons de classe 2	36
4-3- Intégrons de classe 3	37
5 - Les super-intégrons	38
6- Les intégrons complexes	40
7- Origine des intégrons	43
7-1 - Origine des gènes	43
7-2 - Origine des cassettes	44
7-3 - Evolution des intégrons	44
RESULTATS EXPERIMENTAUX	46
Présentation du travail de thèse	47
<u>Publication n°1</u>	50
Integron-associated antibiotic-resistance in enteroaggregative and enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> Amy GASSAMA, Awa AIDARA-KANE, Delphine CHAINIER, François DENIS, and Marie-Cécile PLOY Microbial Drug Resistance, 2004, 10 : 27-30	
<u>Publication n°2</u>	53
Integrans in <i>Salmonella</i> Keurmassar, Senegal. Amy GASSAMA-SOW, Awa AIDARA-KANE, Nabil RAKED, François DENIS, and Marie-Cécile PLOY Emerging Infectious Diseases, 2004, 10 : 1339-40	
<u>Résultats Complémentaires</u>	
Characterization of class1 and 2 integrans in <i>Shigella</i> species isolated in Senegal	55

Amy GASSAMA, Awa AIDARA-KANE, Delphine CHAINIER, François DENIS, Marie-Cécile PLOY

Présentation affichée (Poster N°586), 13^e European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 10-13 Mai 2003, Glasgow

Manuscrit en préparation pour soumission à Antimicrobial Agents and Chemotherapy

DISCUSSION ET CONCLUSIONS	61
1 - Discussion	62
2 - Conclusion	70
PUBLICATIONS COMPLEMENTAIRES	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

La découverte des antibiotiques a été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle; leur utilisation a réduit de façon considérable le taux de morbidité et de mortalité lié aux maladies infectieuses, mais elle a été à l'origine d'une forte antibiorésistance touchant de plus en plus d'espèces et un nombre d'antibiotiques de plus en plus grand. Avec plus de 250 antibiotiques systémiques disponibles, on a pu croire que la lutte contre les maladies infectieuses n'était plus qu'un problème de choix de la bonne molécule; à l'évidence c'était la fin du « miracle »; l'idée d'éradication n'était qu'un mythe dangereux; les maladies infectieuses font aujourd'hui un retour en force. Selon les données de l'OMS, en 1998, les maladies infectieuses ont été la cause de 25% des décès dans le monde entier. Dans les pays en voie de développement, 50% des décès sont imputables aux maladies infectieuses (60% chez les enfants de 0 à 4 ans). Les diarrhées infectieuses occupent la troisième place après les infections respiratoires aiguës et le syndrome de l'immunodéficience acquise (OMS 1999). Chez les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine, la diarrhée est au second rang des infections opportunistes; elle est quasi constante au stade SIDA avéré où elle devient invalidante avec un grand impact sur la qualité de vie des patients.

La lutte contre les maladies infectieuses est donc une priorité de santé dans les pays en voie de développement où les infections ont un coût énorme en terme de morbidité et de mortalité. Cette lutte est aujourd'hui compromise du fait de l'impressionnante évolution des situations épidémiologiques, des changements écologiques, de la forte pression de sélection antibiotique; à cela s'ajoutent l'automédication, la vente anarchique de médicaments en dehors des structures légales, l'insuffisance des

activités de surveillance, qui ont abouti à des phénomènes d'émergence et de dissémination de véritables « monstres bactériens » multirésistants aux antibiotiques.

Par ailleurs, les antibiotiques utilisés initialement en pathologie humaine en traitement curatif ont vu leur utilisation détournée pour être abusivement employés comme additif alimentaire afin de stimuler la croissance des animaux (Roy 1997).

Le développement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries constitue un véritable problème de santé publique dont les conséquences se mesurent en terme de difficultés thérapeutiques accrues dans certaines situations cliniques.

Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits parmi lesquels la dégradation enzymatique des antibiotiques, l'altération ou la modification des cibles auxquelles se lie l'antibiotique, l'expulsion de l'antibiotique par la bactérie. L'acquisition de résistance peut être liée à des éléments très élaborés dont font partie les plasmides et transposons permettant le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques entre des genres bactériens qui peuvent être très éloignés sur le plan phylogénique.

Au cours des années «80», de nouveaux éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés et désignés sous le nom d'intégrons. Les intégrons peuvent héberger des gènes de résistance insérés sous forme d'éléments mobiles, les cassettes. Ces cassettes sont intégrées ou excisées par un système de recombinaison spécifique de site médiée par une intégrase.

Les intégrons sont incapables d'autoréplication, ils sont donc obligatoirement portés par un replicon (plasmide, transposon ou chromosome).

Les intégrons constituent un système de capture de gènes, capable de promouvoir efficacement la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien.

De nombreux travaux épidémiologiques ont été effectués chez des bactéries à Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Campylobacter*), mais aussi chez des bactéries à Gram positif (corynébactéries, entérocoques) et chez les mycobactéries, isolées en situation pathogène chez l'homme, au niveau de l'environnement ou chez des animaux.

L'origine des intégrons et des gènes de résistance aux antibiotiques constitue une énigme qui n'a, pour l'instant, pas été totalement élucidée. La découverte des super-intégrons, sur le chromosome de différentes espèces bactériennes appartenant notamment aux genres *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Listonella* et contenant pour certains plus d'une centaine de cassettes suggère qu'il s'agirait de structures anciennes qui permettraient aux bactéries de s'adapter rapidement par un système de capture de gènes, leur permettant d'acquérir un avantage sélectif (fonctions biochimiques, facteurs de virulence, résistance aux antibiotiques...). L'identification d'intégrons complexes constituant de véritables îlots de résistance chez des souches de *Salmonella* (Typhimurium, DT104, Paratyphi B, Agona, Albany) et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes aux antibiotiques révèle une fois de plus la diversité et la complexité de ces structures.

Aucune étude permettant de connaître le rôle des intégrons dans la multirésistance aux antibiotiques n'a été réalisée à ce jour sur des souches ouest-africaines.

Nos travaux se sont focalisés essentiellement sur la détection et la caractérisation d'intégrons chez des souches entéropathogènes multirésistantes aux antibiotiques, provenant du Sénégal, afin d'évaluer le rôle des intégrons dans la dissémination de la résistance au sein des bactéries entériques.

Une revue de la littérature constituée de deux parties résumera les données récentes sur l'épidémiologie des diarrhées bactériennes en Afrique subsaharienne, les tendances

actuelles des résistances aux antibiotiques chez les bactéries entéropathogènes, la structure, et l'épidémiologie des intégrons.

Cette étude bibliographique sera suivie par des résultats expérimentaux présentés sous forme de deux articles publiés et d'un manuscrit en cours de préparation.

Une discussion générale permettra d'analyser et de comparer l'ensemble des résultats.

I- Les diarrhées bactériennes

1- Introduction

Les maladies diarrhéiques ont affligé l'humanité pendant des siècles. Dans la majeure partie du monde, le choléra, la dysenterie, les salmonelloses épidémiques sont devenues plus rares, mais depuis une quinzaine d'années, ces maladies font leur réapparition dans un grand nombre de pays en voie de développement et contribuent à l'augmentation significative de la morbidité et de la mortalité particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans. En effet, les maladies diarrhéiques sont responsables de 21% de l'ensemble des décès chez les enfants de moins de 5 ans, avec près de 2,5 millions de décès par an (Kosek 2003).

En Afrique subsaharienne, peu de données sont disponibles sur l'épidémiologie des diarrhées bactériennes. Au Burkina Faso, au Kenya et au Nigeria, les entérites les plus fréquentes sont celles dues à *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter* (Obi 1997; Shapiro 2001; Bonfiglio 2002) et *Vibrio cholerae* (Shapiro 2001), cette dernière évoluant surtout selon un mode épidémique (Aïdara 1998). Au Sénégal, peu de données sont disponibles sur l'incidence des diarrhées bactériennes; cependant, au Centre National Sénégalais des Entérobactéries (CNSE), on note un recrutement croissant de souches de *Salmonella* (197 en 2000, 407 en 2001, 483 en 2002) et *Shigella* (59 en 2000, 57 en 2001, 93 en 2002). L'épidémiologie de ces bactéries entéropathogènes se calque de plus en plus sur celle des pays développés avec une prédominance de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. flexneri* et *S. sonnei*. Cependant on note une persistance de *S. Typhi* comme dans la plupart des pays en voie de développement. Chaque année, on note une émergence de nouveaux sérotypes de *Salmonella* et de *Shigella*. *S. dysenteriae* type 1 disparaît et on assiste à l'émergence d'un nouveau sérotype de *S. dysenteriae* (Coimbra 2001) et de souches n'appartenant à aucun sérotype connu et dont l'identification est en cours au CDC (données du centre sénégalais des entérobactéries (CNSE

2001, 2002) sur le site: www.pasteur.sn). En zone rurale, on note une apparition de souches épidémiques de *S. flexneri* et un net recul de *S. dysenteriae* type 1 (Diallo 2001) ; en réalité cette prédominance de *flexneri* sur les autres espèces est décrite depuis près de deux décennies (Bogaerts 1997; Gassama 1997); par contre, la prédominance de *sonnei* sur *dysenteriae* n'est observée que ces dernières années (CNSE : www.pasteur.sn). La tendance est la même au Kenya et au Nigeria (Iwalokun 2001; Shapiro 2001). En revanche les infections à *Yersinia* sont d'une incidence beaucoup plus rare (Obi 1997; Bonfiglio 2002).

2- Les salmonelloses

La fièvre typhoïde reste un problème d'actualité; elle a certes régressé dans les pays développés mais elle demeure endémique dans les pays en voie de développement où les conditions socio-économiques et l'absence d'hygiène favorisent cette maladie (Threlfall 2001). En dehors des sérotypes rencontrés lors des fièvres typhoïde et paratyphoïde, les autres salmonelles représentent l'une des causes majeures de gastro-entérites bactériennes dans le monde et sont responsables d'une importante mortalité infantile. La diversité du réservoir animal et celle des sérotypes rencontrés, laisse prévoir que ce grave problème de santé publique ne pourra être amélioré que par des mesures préventives d'hygiène et de surveillance.

La fièvre typhoïde est transmise par *Salmonella* Typhi (Bacille d'Ebert), retrouvée dans l'eau ou les aliments contaminés. En 2000, la fièvre typhoïde a provoqué 21.650.974 cas de maladie avec 216.510 décès, la fièvre paratyphoïde 5.412.744 cas (Crump 2004). L'Afrique est considérée comme une zone d'incidence moyenne; en Afrique de l'Ouest, on estime à 91.737 le nombre de cas de fièvre typhoïde soit un incidence de 38 par 100.000 personnes et par an (Crump 2004). Le nombre de cas de gastro-entérites est estimé à plus d'un milliard avec 3 millions de décès annuels (Pang 1995). Depuis le début des années 1990, des souches

de *Salmonella* Typhi isolées dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement présentent des résistances aux antibiotiques les plus souvent prescrits (ampicilline, chloramphénicol, triméthoprim, fluoroquinolones) (Mirza 1996; Threlfall 2001; Soto 2003). Au Kenya et au Ghana, des souches de *S. Typhi* multirésistantes à l'ampicilline, au chloramphénicol, aux tétracyclines, à la streptomycine, et au cotrimoxazole ont été récemment décrites (Mills-Robertson 2002; Kariuki 2004). Au Sénégal, les souches de *S. Typhi* restent encore sensibles à l'ensemble de antibiotiques. Par contre, on note une diffusion de souches de *S. Enteritidis* résistantes à l'ampicilline et de *S. Typhimurium* multirésistantes à l'ampicilline, à la streptomycine, au chloramphénicol, au sulfaméthoxazole; ce dernier phénotype représente plus de 30% des souches sénégalaises et ne semble pas être lié au lysotype DT104 (données CNSE 2002 : www.pasteur.sn).

Les salmonelles des gastro-entérites aiguës sont très répandues chez de nombreux animaux et sont souvent responsables de zoonoses. Au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle, on a noté l'émergence de deux sérotypes particulièrement virulents et résistants qui se sont disséminés à travers le monde (Rankin 1998; Baggesen 2000): *S. Typhimurium* DT104, résistante à l'ampicilline, au chloramphénicol/florfenicol, à la streptomycine/spectinomycine, aux sulfamides et aux tétracyclines (phénotype ApCmSpSuTe), responsable d'épidémies dans les pays développés, et *S. Enteritidis* PT4). En 1997, Sandvang et coll. ont démontré que la multirésistance aux antibiotiques observée chez *S. Typhimurium* DT104 était liée à la présence d'au moins deux intégrons (Sandvang 1997); des intégrons de classe 1 ont également été détectés chez des souches de *S. Enteritidis* résistantes à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine/spectinomycine, aux sulfamides, au triméthoprim et aux tétracyclines (Rankin 1998; Brown 2000).

Des intégrons de classe 1 contenant des cassettes très variées ont été retrouvés chez d'autres sérovars de *Salmonella*: Typhi (Pai 2003; Ploy 2003), Agona, Brandenburg, Goldcoast,

Hadar, Infantis, Ohio, Panama, Poona, SaintPaul, Virchow, Worthington etc... (Brown 2000; Cloackert 2000; Guerra 2001; Di Conza 2002). Ces intégrons sont pour la plupart localisés sur des plasmides.

Un intégron de classe 2 localisé sur le chromosome bactérien a été caractérisé chez des souches de *Salmonella* sérovar Java (Miko 2003).

3- Les shigelloses

Les infections à *Shigella* sont très répandues dans le monde. Le nombre annuel d'épisodes de shigelloses est estimée à 164,7 millions dont 163,2 (99%) dans les pays sous-développés avec des taux de mortalité de 69% chez les enfants de moins de 5 ans (Kotloff 1999). Chaque année, environ 1 million de personnes voyageant dans les pays en voie de développement en sont atteints (Black 1990). Les shigelles agissent selon un mécanisme entéro-invasif; elles peuvent, soit envahir la muqueuse, soit la détruire provoquant des diarrhées sanglantes ou dysenterie.

La distribution géographique et la pathogénicité des quatre espèces sont différentes (Keush 1998). Dans les pays en voie de développement, on retrouve une forte incidence de *S. flexneri* avec une prédominance du sérotype 2a, endémique dans certaines zones; elle est responsable de 32 à 58% des cas (Kotloff 1999; Talukder 2001); cette espèce est la cause la plus fréquente de morbidité et de mortalité (Sack 2001). *S. dysenteriae* type 1 ou bacille de Shiga est très répandu et évolue selon le mode épidémique surtout dans les zones dont le niveau d'hygiène est précaire (Allen 1994; Bogaerts 1997); des incidences 50 à 100 fois supérieures à celles des pays développés sont observées, avec des taux de mortalité atteignant 250 pour 1000 habitants. L'épidémie africaine de dysenterie due à une souche multirésistante de *S. dysenteriae* 1 entraînant une mortalité élevée est préoccupante (Allen 1994 ; Frost 1985). Cette espèce prédomine au Guatemala, en Inde et en Malaisie (Kotloff 1999). *S. boydii* 14

prédomine en Inde, au Nigéria et au Yémen et représente 24 à 47% des isolats (Kotloff 1999). Au Sénégal, des souches de *Shigella* n'appartenant à aucun sérovar connu ont été isolées dont certaines chez des patients infectés par le VIH (CNSE 2001:www.pasteur.sn). De même en Afrique centrale, des taux de mortalité élevés associés aux shigelloses ont été décrits chez des adultes jeunes ; cette région est fortement affectée par la pandémie du SIDA ; il semblerait donc qu'il y ait des interactions entre ces deux types d'infections mais aucune étude n'a été effectuée pour confirmer cette hypothèse (Sack 2001).

Dans les pays développés, l'incidence est faible, environ 9 pour 100.000 habitants (USA): *S. sonnei* est l'espèce prédominante et elle évolue selon un mode épidémique (Kimura 2004), *S. flexneri* est beaucoup plus rare.

Les souches de *Shigella* deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques les plus souvent prescrits. L'évolution de la résistance des shigelles est préoccupante; elle est décrite un peu partout dans le monde et elle touche un nombre de molécules de plus en plus important (ampicilline, triméthoprim-sulfaméthoxazole, tétracyclines, chloramphénicol, quinolones) (Allen 1994; Vila 1994; Lima 1995; Bogaerts 1997; Chu 1998). Au Sénégal, plus de 80% des souches de *S. flexneri* présentent une multirésistance aux bêtalactamines, triméthoprim-sulfaméthoxazole, tétracyclines et chloramphénicol; *S. sonnei* présente une résistance constante au triméthoprim-sulfaméthoxazole (94% en 1999, 100% en 2000 et 2001) et aux tétracyclines (100% en 1999, 96% en 2000 et 100% en 2001) (données CNSE 2000-2001-2002 : www.pasteur.sn).

Les premiers plasmides conjugatifs portant des gènes de résistance aux tétracyclines ont été décrits chez des souches de *S. dysenteriae* au Japon en 1953 (Watanabe 1963); des plasmides conjugatifs codant pour la résistance à de multiples antibiotiques ont également été détectés chez *S. sonnei* (Ling 1993; Barg 1995).

La résistance aux bêtalactamines est fréquente; elle peut être due à des mutations modifiant les protéines de liaison à la pénicilline (PLP), mais le mécanisme de résistance le plus commun est la production de bêtalactamases de type OXA (Schumacher 1992; Ghosh 1998). Ces bêtalactamases ont été retrouvées chez des souches de *S. sonnei* isolées en Asie (Siu 2000) et au Danemark (Schumacher 1992); on retrouve aussi des bêtalactamases de type TEM chez certaines souches de *Shigella*, mais le type OXA reste prédominant.

Au Sénégal, aucune souche résistante aux quinolones n'a été décrite. La première souche de *S. dysenteriae* type 1 résistante à l'acide nalidixique a été décrite en 1982 (Malengreau 1984; Frost 1985). En Inde (Kolkata) des souches de *S. dysenteriae* type 1 résistantes à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine, à la norfloxacine, à l'ampicilline, au chloramphénicol, au cotrimoxazole et aux tétracyclines ont émergé chez des patients hospitalisés (Dutta 2003).

Des intégrons de classe 1 et 2 ont été retrouvés chez différentes espèces de *Shigella* (Munoz 2003; Oh 2003). Les intégrons de classe 2 semblent être associés au sérotype *sonnei* (McIver 2002; Oh 2003).

4- Le choléra

Le choléra, causé par *Vibrio cholerae* O:1 ou O:139 continue à provoquer des épidémies particulièrement dans les pays en voie de développement. Il évolue par poussées épidémiques à partir de foyers permanents en Asie du Sud-Est. L'origine de ces poussées épidémiques est mystérieuse mais, semble liée à certains facteurs comme les variations brutales de la virulence bactérienne dues à l'acquisition de plasmide codant pour la toxine, des facteurs physiologiques dûs à la réceptivité des populations, mais aussi des facteurs climatiques qui favorisent l'éclosion d'épidémies (Sack 2001). En 2001, cinquante-huit pays ont officiellement déclaré 184.311 cas de choléra et 2728 décès à l'OMS (OMS 2002).

En 1992, dans le Sud de l'Inde, une épidémie de choléra est associée à un nouveau sérotype de *Vibrio cholerae* non O:1; il est baptisé O:139 (selon le schéma de Sakazaki), synonyme de Bengal, en relation avec son lieu d'isolement initial (côte du golfe de Bengal) (Albert 1994).

Le vibron cholérique est responsable de diarrhée aqueuse sécrétoire avec perte d'électrolytes. Cette fuite électrolytique est liée à la sécrétion d'entérotoxine (CT: Cholera Toxin de 84Kda).

Des résistances à de multiples antibiotiques chez *V. cholerae* ont été décrites; elles concernent le chloramphénicol, le cotrimoxazole, les tétracyclines, la furazolidone (Dalsgaard 2001; Sack 2001); les souches résistantes étant surtout isolées pendant les épidémies. L'émergence et le maintien de la résistance aux antibiotiques semblent être liés à un ensemble de facteurs biologiques, environnementaux et comportementaux. En Somalie, l'épidémie de choléra de 1985-86 a entraîné l'émergence de souches multirésistantes à la kanamycine, à la streptomycine, aux sulfamides et aux tétracyclines (Coppo 1995). Au Sénégal, des souches de *V. cholerae* résistantes au cotrimoxazole et au chloramphénicol ont été décrites lors de l'épidémie de 1994-95 (Aïdara 1998). Dans la plupart des cas, la résistance observée chez *V. cholerae* est médiée par des plasmides ou des transposons. La majorité des plasmides isolés chez *V. cholerae* sont cryptiques, mais certains, connus sous le nom « R-factors » codent pour des déterminants de résistance aux antibiotiques: il s'agit de plasmides de grande taille (110-170kb) auto-transférables, portant des gènes de résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la gentamicine, à la kanamycine, à la streptomycine, à la spectinomycine, aux sulfamides, aux tétracyclines et au triméthoprim (Sack 2001). Les transposons jouent également un rôle dans la résistance: en effet, la multirésistance observée chez des souches de *V. cholerae* El Tor vis à vis du triméthoprim, de la spectinomycine, de la streptomycine et du composé vibriostatique O/129 est liée à la présence d'un transposon inséré sur le chromosome (Goldstein 1986). Dalsgaard et coll. ont mis en évidence des intégrons de classe 1 contenant des cassettes de résistance aux aminosides (*aadA2* et *aadB*), aux bêtalactamines

(*blaP1*), et au triméthoprimine (*dfrA1*, *dfrA15*, *dfrA12*) chez des souches de *Vibrio cholerae* isolées au Mozambique, en Guinée Bissau et en Thaïlande (Dalsgaard 2000; Dalsgaard 2000; Dalsgaard 2001). Certains de ces intégrons étaient localisés sur des plasmides de grande taille, auto-transférables (Dalsgaard 2000).

Récemment, chez *V. cholerae*, il a été décrit un intégron localisé sur un élément mobile d'environ 62 kb nommé SXT element constin (conjugative self-transmissible integrating element) qui proviendrait de *V. cholerae* O:139 (Waldor 1996). Cet intégron contient le gène de l'intégrase *intI9* identique à 53% à *intI2* et contient six cassettes (*dfrA1*, *orfC2*, *orfC3*, *orfC4*, *orfC5a*, *orfC5b*) (Hochhut 2001).

5- Les entérites à *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'une des bactéries aéro-anaérobies facultatives prédominantes dans la flore commensale intestinale de l'homme. Il colonise le tractus gastro-intestinal de l'homme dès les premières années de la vie. Cependant, en cas d'altération de la muqueuse intestinale ou dans certaines situations épidémiologiques (échanges génétiques, expression de gènes chromosomiques initialement silencieux), les souches de *E. coli* non pathogènes deviennent virulentes et provoquent un déséquilibre de la flore à l'origine de la diarrhée.

L'existence des diarrhées à *E. coli* est reconnue depuis 1940. Cette bactérie est responsable de diarrhées aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Six pathovars sont actuellement décrits selon l'expression clinique de la diarrhée et les facteurs de virulence équipant les souches à l'origine de l'infection (Nataro 1998).

5-1- *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC)

Ils sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement de la zone intertropicale et représentent l'un des principaux agents de la diarrhée du voyageur:

Le pourcentage des cas de diarrhée dus à ETEC varie de 10 à 30% chez les enfants, (Levine 1993; Hoque 1994); il est de 20-60% chez les sujets visitant les zones où l' infection à ETEC est endémique (Black 1990; Dupont 1993). Sur 400 millions d'épisodes diarrhéiques, plus de 700 000 cas de décès sont dûs aux ETEC (Bern 1992). Au Sénégal, une étude réalisée en 1988 chez 405 enfants âgés de 0 à 5 ans a montré que les ETEC occupaient la deuxième place après les EPEC avec un taux de prévalence de 13,1% (Aïdara 1988). Le pouvoir entéropathogène des ETEC repose d'une part sur l'élaboration de facteurs d'adhésion qui permettent la colonisation de l'intestin grêle et d'autre part sur la sécrétion d'entérotoxines. Les exotoxines des ETEC sont des protéines, soit de haut poids moléculaire et de type thermolabile (LT), soit de bas poids moléculaire et de type thermostable (ST). Elles n'altèrent pas la cellule mais déclenchent une fuite hydroélectrolytique en perturbant les systèmes de contrôle de la sécrétion entérocytaire. Il s'en suit une diarrhée aqueuse riche en électrolytes.

5-2-*Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)

Ils sont responsables de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques, particulièrement chez les enfants de 0 à 5 ans. Des études effectuées au Brésil, au Mexique ont montré que 20 à 40% des diarrhées infantiles étaient dues aux EPEC (Cravioto 1988; Gomes 1991; Scaletsky 2002). A Dakar, une étude réalisée en 1988 chez des enfants a montré un prédominance des EPEC avec un taux de prévalence de 15,5% (Aïdara 1988). Ce pathovar est rarement responsable de diarrhée chez l'adulte. Le pouvoir pathogène des EPEC est dû à leur capacité à adhérer aux entérocytes des cellules de l'intestin grêle et à produire des lésions histopathologiques au niveau de la bordure en brosse des entérocytes.

5-3-*Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC)

Ils sont responsables de syndromes dysentériques proches de la shigellose. L'incidence des infections à EIEC est assez faible: elle est de 1% chez des enfants Brésiliens (Tornieporth 1995), 0,7% chez des enfants sénégalais (Aïdara 1988). Le pouvoir pathogène des EIEC est caractérisé par leur capacité à envahir et à se développer dans les cellules épithéliales du colon. Le phénomène d'invasion est sous la dépendance de facteurs chromosomiques et plasmidiques.

5-4-*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

Ils ont été identifiés lors d'épidémies de colites hémorragiques pouvant évoluer vers un syndrome hémolytique urémique (SHU), une insuffisance rénale ou un purpura thrombopénique. Les EHEC ont été à l'origine de plusieurs épidémies de grande ampleur avec une létalité importante aux USA (Bell 1994); ils posent aujourd'hui un problème de sécurité alimentaire dans les pays industrialisés.

Actuellement, trois sérotypes d'EHEC sont identifiés O:157; O:26; O:111. Leur pouvoir pathogène est caractérisé par une forte adhérence à la surface de l'iléon distal du cæcum et du colon droit et à la production de toxines Stx (Shiga toxine).

5-5-*Escherichia coli* entéroaggrégants (EAggEC)

EaggEC est responsable de diarrhées persistantes aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. EAggEC est suspecté d'être responsable de la diarrhée du voyageur au même titre que ETEC, qui lui est souvent associé (Schultz 2000; Adachi 2002). La forte prévalence de EAggEC chez les patients infectés par le VIH le classe parmi les pathogènes opportunistes (Kotler 1995; Germani 1998; Mwachari 1998).

Les mécanismes par lesquels les souches de EaggEC provoquent la diarrhée sont encore mal connus, mais plusieurs gènes de virulence sont actuellement décrits chez les EaggEC. La plupart des souches de EaggEC hébergent un plasmide de 60-65 Mda appelé pAA codant pour les facteurs AAF/I et AAF/II, une entérotoxine EAST1, proche de la toxine thermostable de *E. coli* (Baldwin 1992), deux serine protéases Pet (plasmide codant pour une toxine) (responsable des effets cytotoxiques) et Pic (protéine impliquée dans la colonisation intestinale); la protéine Pic est codée par un gène chromosomique permettant l'activité mucinolytique, et l'hémagglutination (Henderson 1999; Navarro-Garcia 1999; Piva 2003).

5-6- *Escherichia coli* entéroadhérents ou à adhésion diffuse (DAEC)

Plusieurs études ont incriminé DAEC dans les diarrhées infantiles; une étude réalisée au Mexique chez des enfants de 3 à 84 mois lui attribue un taux de prévalence de 13% (Mathewson 1987). Cependant une autre étude réalisée chez des enfants de moins d'un an a montré un taux de prévalence de DAEC identique chez les cas et chez les témoins (Scaletsky 2002), ce qui laisse présager d'une absence de pathogénicité de ce pathovar dans cette tranche d'âge. Levine et coll. ont montré que le risque relatif d'une association DAEC/diarrhée augmentait avec l'âge de 1 an à 4-5 ans (Levine 1993).

La virulence des DAEC est liée à leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales. Deux familles de gènes codant pour cette adhésion ont été identifiés: F1825 et AIDA-I (Benz 1989; Bilge 1989).

Deux nouveaux pathotypes sont actuellement proposés sur la base de l'identification des cytokines; il s'agit de:

- *E. coli* producteurs de cytokines léthales par distension cellulaire (CLDT) également retrouvés chez *Shigella spp* et *Campylobacter spp* (Scott 1994).

- *E. coli* producteurs d'hémolysines alpha détectées par leur capacité à détacher un tapis de cellules HeLa ou Hep-2 en culture (CDEC) (cell detaching *Escherichia coli*).

L'association de ces trois pathotypes potentiels à des manifestations cliniques reste à préciser.

La multirésistance observée chez certaines souches de *E. coli* est souvent associée à des intégrons; en effet, des intégrons de classe 1 et 2 ont été identifiés chez des souches humaines de *E. coli* (Zhao 2001; Okeke 2002; Yu 2003), mais également chez des souches d'origine animale et environnementale (Baas 1999; Maynard 2003; Roe 2003). Chang et all. ont détecté des intégrons de classe 1 hébergeant des gènes codant pour la résistance au triméthoprim, aux aminosides, au chloramphénicol, à l'érythromycine et aux bêtalactamines (Chang 2000).

Un nouveau gène de résistance au triméthoprim *dfr2d* localisé sur un intégron a été caractérisé chez des souches de *E. coli* (Grape 2003).

6- Les campylobactérioses

Les *Campylobacter* sont des bactéries retrouvées dans le tube digestif des animaux notamment les volailles, les ovins et les porcs. La contamination de l'homme se fait par voie digestive généralement par l'intermédiaire d'aliments emballés « sous vide », ce qui favorise la microaérophilie, propice au développement de ces bactéries. Les cas de campylobactérioses sont le plus souvent sporadiques. Chez l'homme, *C. jejuni* et *C. coli* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées (Skirrow 1994; Nachamkin 1998). Elles sont le plus souvent la cause d'entérites surtout retrouvées chez l'enfant vivant dans des conditions d'hygiène précaire ; les taux d'infections sont très élevés durant les premières années de la vie ; ils diminuent progressivement avec l'âge (Blaser 1997). *C. fetus* est responsable de septicémies

à point de départ digestif survenant chez la femme enceinte ou les sujets immunodéprimés. *C. jejuni* figure parmi les antécédents les plus reconnus du syndrome de Guillain-Barré (Speed 1984; Nachamkin 1998). Il est difficile de déterminer l'incidence exacte des infections à *Campylobacter* dans les pays en voie de développement. Au Kenya, une étude réalisée chez des enfants a montré que 30% des diarrhées bactériennes étaient dues à *Campylobacter* (Shapiro 2001); au Nigéria, l'incidence des diarrhées à *Campylobacter* est de 28% en milieu urbain et 8% en milieu rural (Obi 1997). Au Sénégal, les données disponibles révèlent une incidence 9% chez des enfants de moins de 5 ans (Aïdara 1989). Par contre dans les pays développés, la prévalence des gastro-entérites bactériennes dues à *C. jejuni* est élevée: aux USA, en 1996, cette prévalence était de 46% (Altekruse 1999).

Le traitement de première intention des infections à *Campylobacter* fait appel aux macrolides tel que l'érythromycine qui est encore efficace; cependant les nouveaux macrolides apparaissent prometteurs dans le traitement de ces infections.

La résistance des souches de *Campylobacter* vis-à-vis des antibactériens est en constante évolution; cette résistance concerne les fluoroquinolones, les macrolides, les tétracyclines, les phénicolés et les bêtalactamines (Sack 2001).

En Afrique subsaharienne, il n'y a pratiquement pas de données sur l'évolution de la résistance chez les souches de *Campylobacter* (Sack 2001). Par contre, en Asie, cette résistance est en constante évolution: en Thaïlande, la résistance de *C. spp* vis-à-vis de la ciprofloxacine était de 0% avant 1991, elle atteint 84% en 1995 ; vis-à-vis de l'azithromycine elle variait de 7% à 15% entre 1994 et 1995 (Hoge 1998). La résistance de *C. jejuni* et *C. coli* aux fluoroquinolones et aux macrolides s'explique par la forte pression de sélection liée à l'usage anarchique des antibiotiques aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Cette multirésistance observée chez les souches de *C. jejuni* et *C. coli* est liée à la présence d'un système d'efflux permettant l'expulsion de l'antibiotique hors de la cellule bactérienne

(Piddock 1998; Engberg 2001). D'autres mécanismes de résistance ont aussi été décrits: une substitution au niveau du gène *gyrA* serait responsable de la résistance aux fluoroquinolones (Ruiz 1998); l'altération du ribosome serait responsable de la résistance aux macrolides (érythromycine) (Taylor 1992). La résistance aux tétracyclines est due à la présence de plasmides d'environ 38 MDal (Taylor 1981; Tenover 1985). Toutes les souches de *Campylobacter* résistent naturellement au triméthoprime; Gribbeel et Sköld ont démontré la présence de gènes *dfr1* et *dfr9* véhiculés respectivement par le transposon Tn5393 et un intégron (Gribbeel 1998). Un intégron de classe 1 hébergeant la cassette *aac(6')-Ib*, de résistance aux aminosides a été identifié chez des souches de *C. jejuni* (Lee 2002).

7- Les yersiniooses

Les entérites à *Yersinia enterocolitica* ont une incidence faible en Afrique: 4% au Burkina-Faso et au Nigeria (Obi 1997; Bonfiglio 2002); au Sénégal, le taux d'infection chez les enfants de moins de 5 ans est négligeable (0,36%) (Aïdara 1989). Cinq des six épidémies ont été décrites aux USA (Bottone 1997). En dehors de ces épidémies, les cas de yersiniooses sont le plus souvent sporadiques. *Y. enterocolitica* est la première espèce pour laquelle les capacités invasives ont été rattachées à la présence d'un plasmide; il s'agit d'un plasmide commun aux autres espèces de *Yersinia* portant plusieurs gènes de virulence. Cette bactérie se développe dans des aliments conservés à basse température.

Chez l'homme, en particulier chez l'enfant, l'infection à *Y. enterocolitica* réalise un tableau de gastroentérite associé à des signes d'infection systémique. La bactérie provoque une diarrhée selon un mécanisme entéroinvasif : les bactéries se multiplient dans les cellules de la muqueuse formant des granulomes inflammatoires et des microabcès qui évoluent vers la nécrose entraînant ulcérations et hémorragies (Corneles 1987). *Y. enterocolitica* est naturellement résistante à l'ampicilline et aux céphalosporines de première génération par

production à la fois d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase inductible. Les déterminants de cette résistance sont spécifiques de groupe: il s'agit de bêtalactamases A (BlaA) et B (BlaB) produites exclusivement par les souches appartenant aux sérogroupes O:3 et O:9. Les bêtalactamases de type A hydrolysent un grand nombre de pénicillines alors que celles de type B ont une forte activité céphalosporinase (Bottone 1997). Des intégrons de classe I véhiculés par des plasmides de 65 et 140 kb et hébergeant les cassettes *aadA1*, *dfrA1* et *sat* qui code la résistance à la streptothricine ont été identifiés chez des souches de *Yersinia* (Soto 2003).

II- Les intégrons

1- Définition

Les intégrons sont des éléments génétiques décrits par Stokes et Hall en 1989, susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques; ils constituent un système de capture et d'expression de gènes contenus dans des cassettes (Stokes 1989). Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un système de recombinaison spécifique de site médié par une intégrase.

Les intégrons ne sont pas mobiles par eux-mêmes; ils sont incapables d'autoréplication et sont généralement portés par des plasmides ou des transposons.

2- Structure des intégrons

Les intégrons sont constitués de trois régions: une région 5' conservée, une région 3'; entre les deux régions se trouve une région variable contenant une ou plusieurs cassettes (Figure 1).

2-1 - Région 5' conservée

La région 5' conservée contient un gène *intI*, codant une intégrase, un site spécifique de recombinaison *attI* et une région promotrice. Cette région est nécessaire à la fonctionnalité de l'intégron.

2-1-1 - Gène *intI*

Le gène *intI* code une intégrase qui est une recombinase spécifique de site de la famille des recombinases à tyrosine. Plusieurs classes d'intégrons ont été définies en fonction de la nature de cette intégrase. Cinq classes possèdent des cassettes contenant des gènes de résistance aux antibiotiques (Collis 2002). Trois classes d'intégrons de multirésistance (1, 2 et 3) ont été bien caractérisées (**figure 1**). Les intégrons de classe 1 possèdent le gène *intI1* qui code l'intégrase IntI1, une protéine de 337 acides aminés. C'est la classe d'intégrons la plus répandue chez les bactéries à Gram négatif. Deux intégrons de classe 1 n'ayant pas d'intégrase fonctionnelle ont été décrits, le gène *intI1* était interrompu par la séquence d'insertion IS26 (Naas 2001; Nadjar 2001). En amont du gène *intI1* sont présentes des séquences proches des séquences promoteur consensus -35 et -10 qui pourraient permettre la transcription de *intI1*, mais cela n'a jamais été démontré expérimentalement (De la Cruz 1982; Martinez 1990).

Chez les intégrons de classe 2 décrits chez Tn7, Tn1825, Tn1826, Tn4132, le gène *intI2* est interrompu par un codon stop TAA; ce gène code une intégrase de 178 acides aminés ayant 46% d'identité avec IntI1, mais réduite de 12 acides aminés (EMBL/GenBank AJ001816). L'arrêt précoce de la traduction de *intI2* entraîne une perte de fonction de l'intégrase (Hansson 2002).

Le gène *intI3* des intégrons de classe 3 code l'intégrase IntI3, qui a 60,9% d'identité avec IntI1 (Arakawa 1995).

Un autre intégron de résistance aux antibiotiques a été localisé dans un élément mobile, le SXT^{ET} constin (conjugative self-transmissible integrating element) de *Vibrio cholerae*. Le

gène codant l'intégrase a entre 45 et 59% d'homologie avec les trois intégrases précédentes. Enfin, un dernier intégron de résistance a été caractérisé sur le plasmide pRVS1 de *Vibrio salmonicida* (EMBL/GenBank N° d'accès : AJ277063). Le gène *intI* code une intégrase de 320 acides aminés.

2-1-2 - Site *attI*

Le site *attI* est un site spécifique de recombinaison; il est situé entre le début du gène *intI* et la première cassette. Les sites *attI* des différentes classes d'intégrons n'ont pas de séquence conservée entre eux à l'exception des sept dernières paires de bases constituant un élément nommé « core site » dont la séquence est GTTRRRY (R, purine, Y, pyrimidine) (Hansson 1997; Collis 1998). Le core site est un élément clé de cette région car c'est le point d'insertion des cassettes; l'intégration de chaque nouvelle cassette s'effectue au niveau du GTT du core site entre le G et le premier T du core site.

2-1-3 - Région promotrice

Chez les intégrons de classe 1, la région 5' conservée contient un promoteur P₁ encore appelé P_{ant} situé dans le gène *intII*, 214 pb en amont de la séquence core du site *attI* et qui permet la transcription des cassettes insérées ; la majorité d'entre elles ne possédant pas de promoteur en amont du gène (Collis 1995). Selon les intégrons, il existe des variations nucléotidiques dans les motifs -35 et -10 de ce promoteur. La force de ce promoteur est comparée à celle du promoteur consensus décrit chez *E. coli*. Ainsi, quatre variants de promoteur P1 ont été décrits (Levesque 1994; Collis 1995) (**Tableau 1**). Le variant fort de P1 est celui qui a les séquences -35 et -10 les plus proches du consensus.

Il existe aussi chez tous les intégrons de classe 1, 119 pb en aval de P1 un autre promoteur potentiel P2 contenant des séquences -35 et -10 proches des séquences consensus mais, qui

n'est pas fonctionnel car l'espacement entre ces deux séquences n'est que de 14 pb, ce qui n'est pas favorable à la transcription: l'espace optimum pour un promoteur actif est de 17 nucléotides. P2 peut être rendu fonctionnel par l'insertion de trois nucléosides guanosine créant un espace optimal N17 entre la séquence -35 et la séquence -10 (Schmidt 1988); ce promoteur peut contribuer à la transcription de gènes en association avec le promoteur P1 faible.

Chez les intégrons de classe 2, un promoteur situé dans le site *attI2* en amont du gène *intI2* a été proposé (Levesque 1994). Cependant ce promoteur n'a pas été caractérisé.

Un promoteur a aussi été identifié chez les intégrons de classe 3. Ce promoteur est situé au début du gène de l'intégrase (Hall 1999; Collis 2002; Correia 2003).

2-2 - Région 3'

La région 3' diffère considérablement en séquence et en taille dans les différentes classes d'intégrons (**figure 1**).

Chez la majorité des intégrons de classe 1, la région 3' est un segment de 2 kb qui commence en 3' de la dernière cassette et qui contient 3 cadres de lecture ouverts: *qacEΔI*, *sulI* et ORF5 (Hall 1994) (**figure 1**). *qacEΔI* est un dérivé tronqué du gène *qacE* qui confère une résistance aux ammoniums quaternaires. Le gène *sulI* code une protéine de 279 acides aminés de résistance aux sulfamides (Sundström 1988). Le troisième cadre de lecture, ORF5, est une séquence de 488 pb ne codant aucune fonction connue (Bissonnette 1992). Ces gènes sont transcrits à partir de leur propre promoteur, P4 pour *qacEΔI* et *sulI* (Guerineau 1990) et P5 pour ORF5 (Stokes 1989; Levesque 1995).

Cependant, certains intégrons ne possèdent pas ou seulement partiellement cette région, d'où l'ambiguïté de la terminologie « 3' conservée » utilisée dans de nombreuses publications. C'est par exemple le cas d'un intégron décrit chez *Acinetobacter baumannii* qui ne possède pas

de région 3' conservée (Ploy 2000). De même, une étude chez des bactéries de l'environnement a montré une proportion assez forte de souches (32% chez des bactéries coliformes jusqu'à 68% chez *Vibrio*) pour lesquelles le gène *sulI* était absent et 13% des intégrons ne possèdent pas du tout de région 3' (Rosser 1999).

Chez les intégrons de classe 2, la région 3' est constituée des gènes impliqués dans la transposition de Tn7 : *tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* et *tnsE* (Flores 1990). Un intégron hybride a été récemment caractérisé (Ploy 2000): il contient la région 5' d'un intégron de classe 2, les cassettes habituellement retrouvées chez les intégrons de classe 2, mais en 3', on retrouve les trois cadres de lecture *qacEΔI*, *sulI* et ORF5 présents dans la région 3' des intégrons de classe 1.

3 - Caractéristiques des cassettes

Les cassettes sont des unités fonctionnelles mobiles pouvant exister sous forme circularisée ou intégrée. Une cassette est constituée d'un cadre de lecture et en 3' d'un site spécifique de recombinaison, *attC*, reconnu par l'intégrase. Chaque cassette contient un site *attC* unique. Plus de 70 cassettes ont été décrites à ce jour (Rowe-Magnus 2002). Ces cassettes ont des tailles et des fonctions très variables mais, possèdent une organisation commune. Généralement, les cassettes sont de petite taille variant de 260 à 1500 pb (Recchia 1995).

Plusieurs cassettes peuvent être contenues dans un même intégron et permettre à la bactérie-hôte de résister en bloc à différentes familles d'antibiotiques. A l'opposé, certains intégrons peuvent être dépourvus de cassettes tel In0 et ne contenir que les régions 5' et 3' et le site spécifique de recombinaison *attI* (Bissonnette 1992; Martinez-Freijo P. 1998; Ploy 2000).

3-1- Structure des cassettes

3-1-1- Gènes

De nombreux gènes de résistance aux antibiotiques ont été décrits dans des cassettes (**Tableau 2**).

Des cassettes contenant deux gènes ont été décrites: c'est le cas chez Tn1331 où une même cassette contient les deux gènes *aadA1* et *oxa9* (Tomalsky 1993), Tn2000 avec les gènes *oxa10* et *aadA1* (Naas 2001), *blaGES-1* et *aac(6')-Ib* chez In52 (Poirel 2000) ou chez Tn2424 contenant *aacA1* et ORFG dans une même cassette (EMBL/GenBank N° d'accès : AF047479) et récemment *bla_{OXA-10}* et *aac(6')-Ib* chez un intégron de classe 3 (Correia 2003).

Des cadres ouverts de lecture ne codant aucune fonction connue mais associés à des sites *attC* formant ainsi de véritables cassettes ont été décrits chez différents intégrons (Hall 1991).

3-1-2- Site *attC*

Les premiers sites *attC* décrits étaient constitués de séquences relativement conservées, inversées répétées imparfaites de 59 paires de bases et ont été alors communément désignés « élément 59-pb ». Mais en réalité, la séquence relativement conservée au sein des différents sites *attC* recouvre surtout les 20 premières et dernières bases et la région comprise entre ces deux motifs de séquence et de longueur variable, allant jusqu'à 141 paires de bases, d'où l'ambiguïté de la terminologie « élément 59-pb » couramment utilisée (Stokes 1997). Deux séquences inversées répétées de 7 pb sont situées aux deux extrémités de chaque site *attC* et sont toujours parfaitement complémentaires: le core site et le core site inverse. Le core site de séquence consensus GTTRRRY (R, purine, Y, pyrimidine) est localisé à l'extrémité droite du site *attC* et le core inverse de séquence complémentaire RYYAAC à l'extrémité gauche.

Dans une cassette, le gène est immédiatement suivi d'un site *attC*, l'ensemble étant encadré par deux séquences consensus GTTRRRY (**figure 2**). Les 6 dernières paires de bases du core

appartiennent à la cassette insérée en aval ou, s'il s'agit de la dernière cassette, à la région 3'.

Les 6 premières bases TTRRRY d'une cassette correspondent aux 6 dernières paires de bases du site *attC* de la cassette précédente ou du site *attI* s'il s'agit de la première cassette.

Il existe une grande variété de sites *attC*. Certains, dont la séquence est très conservée, sont associés à des gènes de résistance très différents, comme c'est le cas pour les cassettes *catB3* et *aadA1* alors que certains gènes apparentés, par exemple les gènes *dfr* codant la résistance au triméthoprime sont associés à des sites *attC* très variés (Recchia 1995).

3-2 - Mouvement des cassettes

Les mouvements de cassettes n'ont été démontrés expérimentalement que pour les intégrons de classe 1. Dans le cas des intégrons de classe 2, l'intégrase n'est pas fonctionnelle car le gène *intI2* est interrompu par un codon stop (TAA) responsable d'une terminaison précoce de sa traduction (Sundström 1991).

Des cassettes identiques ont été retrouvées chez des intégrons appartenant à la même classe mais aussi chez des intégrons de classe différente. De multiples combinaisons de cassettes ont été décrites chez les intégrons de classe 1 : Poirel et coll. ont détecté 5 cassettes chez un intégron de classe 1 (Poirel 2000). Naas et coll. ont trouvé huit cassettes insérées dans un intégron de classe 1 (Naas 2001).

3-2-1 - Rôle de l'intégrase

Collis et coll. ont montré que les mouvements de cassettes étaient sous la dépendance de l'intégrase et s'effectuaient par recombinaison entre deux sites spécifiques (Collis 1992). Chaque intégrase n'est pas spécifique des sites *attC*, mais est spécifique des sites *attI* (Hall 1991). L'intégrase peut catalyser la recombinaison entre deux sites *attC* ou entre un site *attC* et un site *attI*, mais aussi entre 2 sites *attI* (Hansson 1997). Des cassettes identiques ont été

retrouvées dans des intégrons de classe différente suggérant que les 3 intégrases sont capables de reconnaître les sites *attC*.

3-2-2 - Sites reconnus par l'intégrase

3-2-2-1 - Sites spécifiques

Les sites spécifiques de recombinaison reconnus par l'intégrase sont les sites *attI* et *attC*. Les sites de recombinaison habituels reconnus par les recombinases ont généralement une taille de 30 pb et sont formés de régions inversées de 12 à 13 pb contenant le domaine d'attachement à l'intégrase séparés par une séquence de 6 à 8 pb.

- Le site *attI* a une structure complexe et ne contient pas de séquence RYYAAC complémentaire du core, ni de séquence inversée répétée. La séquence nécessaire à la recombinaison est située dans le site *attI* à gauche du point de recombinaison GTT (Collis 1998).
- Le site *attC*, plus complexe que le site *attI*, présente une structure secondaire due à la séquence palindromique (Hansson 1997).

La seule similitude entre *attC* et *attI* est la présence de la séquence core GTTRRRY. Des études *in vitro* ont montré que le core et le core inverse étaient nécessaires à l'activité de recombinaison du site (Martinez 1990).

Le crossing-over se produit entre le G d'un site core GTTRRRY et le premier T d'un deuxième site core.

3-2-2-2 - Sites non spécifiques

L'évènement de recombinaison peut impliquer un site *attC* ou un site *attI* et un site non spécifique appelé site secondaire (Francia 1993). Ces évènements sont exceptionnels et se produisent à des fréquences très faibles, mais sont probablement responsables de la

dissémination de cassettes en dehors de localisations spécifiques. L'insertion de cassettes au niveau de ces sites est alors stable car la cassette est dépourvue du site de recombinaison spécifique nécessaire à son excision. Ces sites secondaires ne présentent pas de séquences inversées répétées, mais renferment en général la séquence pentanucléotidique GWTMW (W:T/A ; M:A/C) (Francia 1993). Plus de 50 sites secondaires ont été identifiés et la seule séquence commune est ce pentanucléotide. Recchia et coll. ont proposé une séquence plus courte GWT pour définir les sites secondaires (Recchia 1994). Malgré la faible fréquence de recombinaison au niveau des sites secondaires certains d'entre eux sont préférentiellement choisis pour des évènements de recombinaison avec une fréquence 10 fois plus élevée que pour les autres sites secondaires (Francia 1997). Ces sites secondaires contenaient en fait deux pentanucléotides GWTMW dans des orientations opposées séparés par une séquence de 3 à 7 pb (Francia 1997): ces sites sont appelés des sites doubles en opposition aux autres sites secondaires désignés sites simples. La séquence consensus de ces sites doubles serait donc WKAWC-N₃₋₇-GWTMW.

3-2-3 - Mécanismes d'intégration et d'excision des cassettes

L'intégration et l'excision des cassettes font intervenir les sites *attI* et *attC*. L'intégration d'une nouvelle cassette se fait préférentiellement au site *attI* par rapport au site *attC* (Collis 1993), alors que l'excision des cassettes se fait plutôt au niveau des sites *attC* (Collis 1992).

D'après Hall et coll., les cassettes seraient intégrées sous forme linéaire; elles seraient sous forme libre circulaire après excision (Hall 1991) (**figure 3**). L'excision comprend la totalité de la cassette (gène et le site *attC*). La cassette circularisée contiendrait le site de recombinaison *attC* en entier avec le core GTTRRRY reconstitué puisque les cassettes sont flanquées de la séquence TTRRRY à l'extrémité 5' et du G du core à l'extrémité 3'. Les cassettes

circularisées sont instables car ne contiennent pas d'origine de répllication. Cette possibilité d'insertion et d'excision des cassettes sous forme circulaire a été démontrée par Collis et coll. (Collis 1992).

Le mouvement des cassettes d'un intégron à l'autre se fait donc majoritairement par ce mécanisme d'excision-insertion sous forme circulaire. Cependant, les mouvements par cointégration et résolution entre deux plasmides contenant des intégrons ont aussi probablement lieu, mais de façon moins fréquente (Collis 1992) (**figure 4**). Enfin, des échanges de cassettes par recombinaison homologue entre des séquences conservées flanquant les cassettes sont envisageables (Collis 1995). Les combinaisons possibles de cassettes contribuant à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques sont donc très nombreuses et il est difficile d'affirmer que les échanges de cassettes ont lieu par un seul mécanisme.

3-3 - Expression des cassettes

Les cassettes sont intégrées préférentiellement au niveau du site *attI* en aval du promoteur P1 qui assure leur transcription. La plupart des cassettes ne contiennent pas de promoteur et les gènes sont donc co-transcrits comme dans un opéron sous la dépendance des promoteurs P1 et P2 localisés dans la région 5'conservée de l'intégron (Collis 1995). L'intégron se comporte donc comme un vecteur de clonage et d'expression naturel.

Il a été démontré que l'expression d'une cassette était significativement influencée par sa position dans l'intégron (Collis 1995). En effet, une même cassette aura un niveau d'expression différent selon qu'elle est proche ou éloignée de P1, les cassettes éloignées du promoteur étant plus faiblement exprimées.

De rares cassettes possèdent leur propre promoteur telles les cassettes *cmlA* (2, 4, 5), *qacE* et *qacF*, *ereA*_{piP1100} et *ereA*_{pLQ1723} (Guerineau 1990; Ploy 1998; Biskri 2003).

Lorsque les cassettes sont intégrées à des sites secondaires, l'expression du gène n'est possible que si la cassette est intégrée en aval d'un promoteur potentiel (Recchia 1995).

Chez les intégrons de classe 2, l'expression des cassettes serait aussi sous la dépendance d'un promoteur situé dans le site *attI2* (Sundström 1991). Chez les intégrons de classe 3, l'expression des cassettes est également sous la dépendance d'un promoteur, P_c localisé dans le gène *intI3* (Collis 2002).

L'expression des cassettes dépend donc de plusieurs facteurs :

- force du promoteur P1
- position des cassettes dans l'intégron :
les cassettes les plus éloignées sont les moins exprimées
- présence d'un promoteur interne à une cassette

Chez les intégrons de classe 1, la présence d'un court cadre de lecture appelé ORF11, situé dans la région 5' conservée améliore la traduction des cassettes; le mécanisme de la traduction des cassettes n'est pas bien élucidé, mais l'observation des séquences en amont des gènes cassettes peut favoriser l'initiation de la traduction (Hanau-Berçot 2002).

4 - Epidémiologie des intégrons

Les intégrons sont surtout retrouvés chez les bactéries à Gram négatif; ils sont particulièrement répandus chez les souches multirésistantes aux antibiotiques, mais il s'agit probablement d'un biais de sélection (Recchia 1997). Des intégrons ont été retrouvés chez des souches d'origine diverse (humaine, animale ou environnementale).

4-1 - Intégrons de classe 1

Les études épidémiologiques ont surtout recherché les intégrons de classe 1. Différentes études ont montré que ces intégrons étaient très répandus chez différentes bactéries d'origine humaine, animale ou environnementale.

4-1-1- Souches d'origine humaine

Les intégrons de classe 1 ont surtout été décrits chez les entérobactéries et autres bactéries à Gram négatif, rarement chez les bactéries à Gram positif.

4-1-1-1-Bactéries Gram négatif

Jones et coll. ont retrouvé un intégron de classe 1 chez 55% de souches d'entérobactéries multirésistantes (Jones 1997). Des intégrons de classe 1 ont été caractérisés chez certaines souches d'entérobactéries telles que *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* (Martinez-Freijo P. 1998; Tosini 1998; Brown 2000; White 2001; Zhao 2001; McIver 2002; Ploy 2003; Soto 2003). Les cassettes portées par les intégrons de classe 1 très fréquemment retrouvées sont celles conférant la résistance à la streptomycine, à la spectinomycine (*aadA*) ou au triméthoprim (dfr) (Rowe-Magnus 1999; White 2001; Hansson 2002).

Des intégrons ont aussi été identifiés chez des souches de *Vibrio cholerae* (Dalsgaard 2001), *Pseudomonas* (Levesque 1995), *Acinetobacter* (Gonzales 1998; Ploy 2000), *Stenotrophomonas* (Barbolla 2004) et *Campylobacter* (Gribeel 1998; Lucey 2000).

4-1-1-2- Bactéries à Gram positif

Peu d'études ont été réalisées chez les bactéries à Gram positif. La découverte chez *Corynebacterium glutamicum* (Nesvera 1998) d'un intégron de classe 1 préalablement décrit

chez *P. aeruginosa* et d'un intégron défectif chez *Corynebacterium striatum* (Ploy 2000) (EMBL/GenBank N° d'accès : AJ294721) dont la structure est proche du vestige d'intégron retrouvé chez *Mycobacterium fortuitum* (Martin 1990) permet de présager d'une dissémination des cassettes de résistance aux antibiotiques aussi bien chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif. Récemment des intégrons de classe 1 ont été détectés chez des souches de *Corynebacterium* appartenant à différentes espèces, isolées de litière d'élevages de poulets (Nandi 2004). La cassette *aadA1* a été mise en évidence chez *Enterococcus faecalis* par Clark et coll. (Clark 1999). De plus, une étude de Kazama et coll. a retrouvé le gène *qacEΔ1* chez de nombreuses souches cliniques de *S. aureus* et d'entérocoques, mais aucun intégron complet n'a été caractérisé (Kazama 1998).

4-1-1-3- Mycobactéries

Chez *Mycobacterium fortuitum*, un vestige d'intégron a été retrouvé (Martin 1990). Il s'agit du transposon Tn610 formé de deux copies de IS6100 flanquant une région contenant une copie tronquée du gène *intI1* et le gène *sul3*. Le gène *intI1* étant délété et Tn610 ne contenant pas de site *attI* complet, ce vestige d'intégron n'est donc pas capable d'intégrer des cassettes. Cependant, cette observation indique que le transfert d'un intégron au sein des mycobactéries et entre espèces phylogéniquement différentes est possible (Hall 1998).

4-1-2- Souches d'origine animale

Des intégrons de classe 1 ont été décrits chez des souches de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium DT104 isolées dans différents élevages de porcs en Allemagne (Sandvang 1997), chez des souches d'origine bovine, porcine, canine et aviaire de *Salmonella* sérovar Newport (Rankin 2002) et chez des souches bovines et aviaires de *E. coli* (Baas 1999; Petermann 1999). Des intégrons de classe 1 ont été caractérisés chez des souches de

Campylobacter isolées de grillades de poulet (Lee 2002), mais aussi chez des souches de *E. coli* isolées de la flore intestinale de porcs (Sunde 1999). Une étude épidémiologique chez des souches de *S. enterica* sérovar Typhimurium DT104 isolées à partir de prélèvements humains et animaux en France a montré que 83% des souches appartenaient à un seul clone porteur d'un intégron de classe 1 localisé sur le chromosome et hébergeant la cassette *bla*_{PSE-1} (Casin 1999).

Récemment, des intégrons de classe 1 ont été identifiés chez 397 souches de *Salmonella* d'origine humaine et animale appartenant à 35 sérovars différents (Randall 2004).

4-1-3- Souches d'origine environnementale

Des souches hébergeant des intégrons ont aussi été retrouvées dans l'environnement. Kazama et coll. ont mis en évidence la présence du gène *qacEΔ1* chez des bactéries à Gram négatif isolées à partir de l'environnement (Kazama 1998). Stokes et coll. ont aussi mis en évidence la présence de plusieurs cassettes dans des échantillons provenant de la biomasse, du sol, des sédiments et de collections d'eau (Stokes 2001). Une étude réalisée chez 3000 souches de bactéries à Gram négatif (*Vibrio*, *Pseudomonas*, coliformes) isolées d'une rivière a montré une fréquence d'intégrons de 3,6% (Rosser 1999). Un intégron contenant la cassette *dfr1a* a été décrit chez des souches de *Acinetobacter* isolées de prélèvements d'eau dans un élevage de truites (Petersen 2000). Nandi et coll. ont démontré que les bactéries contenant des intégrons isolées des litières dans des élevages de poulets étaient à plus de 85% des bactéries à Gram positif et pouvaient constituer un réservoir des intégrons de classe 1 (Nandi 2004).

4.2 - Intégrons de classe 2

Les intégrons de classe 2 ont été mis en évidence dans la famille du transposon Tn7; d'autres transposons proches de Tn7, contenant des intégrons de classe 2 ont été caractérisés: il s'agit

de Tn1825, Tn1826 et Tn4132 (Sundström 1991; Young 1994). L'intégron de Tn7 contient trois cassettes de résistance (*dfrA1* conférant la résistance au triméthoprim, *sat* conférant la résistance à la streptothricine, *aadA1* conférant la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine) et une quatrième cassette *orfX* dont la fonction est inconnue. Chez Tn1825, une cassette supplémentaire de fonction inconnue est localisée à la première position. Par contre chez Tn1826, on ne retrouve pas la cassette *dfrA1* (Sundström 1991). Chez Tn4132, la cassette *dfrA1* est remplacée par la cassette *dfrA14* (Young 1994) (**figure 5**).

L'intégrase des intégrons de classe 2 (*intI2*) est non fonctionnelle, ce qui entraînerait une plus grande stabilité de la structure de l'intégron de Tn7 (Sundström 1991). Cependant, des intégrons de classe 2 contenant un arrangement différent de cassettes ont été décrits: Biskri et Mazel ont caractérisé un intégron de classe 2 localisé sur le plasmide pIP1100 contenant quatre cassettes: *sat*, *ere(A)*, *aadA1* et *orfX* et une séquence d'insertion IS1 en amont de *intI2* (Biskri 2003).

Des intégrons de classe 2 ont été retrouvés chez des souches de bacilles à Gram négatif (*Acinetobacter*, *E. coli*, *Salmonella*) d'origine humaine, animale ou environnementale (Gonzales 1998; Ploy 2000; Miko 2003; Roe 2003; Roe 2003; Yu 2003).

Certaines souches peuvent héberger plusieurs intégrons différents. Ainsi, des intégrons de classe 1 et 2 ont été caractérisés chez des souches de *E. coli* isolées à partir d'eaux d'irrigation et de sédiments (Roe 2003), mais aussi chez des souches d'origine humaine et animale (Roe 2003).

4-3- Intégrons de classe 3

Le premier intégron de classe 3 a été décrit chez *Serratia marcescens* (Arakawa 1995). Il contient la cassette *bla_{IMP}*, codant la résistance à l'imipénème par production d'une métallo-enzyme et la cassette *aac(6')-Ib* (*aacA4*). La région 3' en aval de la cassette *aac(6')-Ib* a été

caractérisée: Collis et coll. ont montré que la séquence qui suit immédiatement cette cassette était une courte région du transposon Tn402 qui possède la cassette *qacE*, dernière cassette de Tn402; on retrouve ensuite les gènes de la transposition *tniR*. Un deuxième intégron de classe 3 a été identifié chez *Klebsiella pneumoniae*, il est long de 2,863 pb, contient le gène *intI3* qui présente 98,8% d'homologie avec le gène *intI3* de *S. marcescens*. Il possède en outre un site de recombinaison *attI3*, deux régions promotrices; au niveau du site *attI3* s'insèrent la cassette *bla_{GES-1}* et une autre cassette provenant de la fusion des cassettes *bla_{OXA-10}* et *aac(6')-Ib* (Correia 2003).

5 - Les super-intégrons

Les super-intégrons ont été caractérisés sur le génome de différentes espèces de *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. fischeri*) mais aussi chez d'autres genres bactériens tels que *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Xanthomonas*, *Listonella*, *Nitrosomonas* (*P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *X. campestris*, *S. putrefaciens*, *S. oneidensis*, *L. pelagia*, *N. europea*) (Rowe-Magnus 1999; Rowe-Magnus DA. 2001). Les super-intégrons de *Vibrio* ont été bien étudiés : ils possèdent en 5' un gène *intI* codant pour une intégrase (Mazel 1998; Rowe-Magnus 1999; Clark 2000) ayant 45 à 50% d'identité avec les trois intégrases IntI1, IntI2 et IntI3. L'intégrase du super-intégron chez *Shewanella putrefaciens* a 59% d'identité avec IntI2 et 42,5% avec une intégrase de super-intégron de *V. cholerae* (Mazel 1998; Rowe-Magnus 1999). En aval du gène *intI*, se situe un site *attI* et de nombreuses séquences inversées répétées (100 copies) imparfaites flanquées des séquences core GTTRRRY en 3' et core inverse RYYAAC en 5', très homologues aux sites *attC* décrits chez les intégrons de résistance aux antibiotiques et encadrant un ou plusieurs cadres de lecture; cette organisation est analogue à celle des cassettes. Les séquences répétées retrouvées sur le chromosome de *V. cholerae* et désignées VCR (*Vibrio cholerae* repeat) ont

été les plus étudiées (Barker 1994). Ces séquences VCR sont très conservées, elles ont une taille de 123 à 126 pb et ont 90% d'identité avec le site *attC* de la cassette *blaP3* décrite sur un intégron de multirésistance chez *Pseudomonas* (Mazel 1998) et sont toutes orientées dans la même direction.

Mazel et coll. ont montré que les séquences VCR étaient bien des sites actifs de recombinaison reconnus par l'intégrase IntI1. Selon ces mêmes auteurs, ces structures étaient présentes chez des souches de *Vibrio* isolées avant 1900, ce qui suggère que le mécanisme d'acquisition des cassettes existait avant l'ère des antibiotiques (Mazel 1998).

Les super-intégrons ont donc une structure similaire à celle des intégrons de résistance aux antibiotiques mais différent par :

- La taille : les super-intégrons ont une taille plus importante car ils contiennent plus de 100 cassettes
- L'orientation de gènes: les gènes ne sont pas toujours orientés dans la même direction que les séquences répétées.
- L'homogénéité des séquences répétées: les séquences répétées sont très conservées au sein d'un même super-intégron alors que les sites *attC* des intégrons de multirésistance ont des séquences et des tailles variables.
- La nature des cassettes: les cassettes des intégrons codent la résistance aux antibiotiques alors que les cassettes des super-intégrons ne codent le plus souvent aucune fonction connue. Quelques cassettes codant des fonctions métaboliques ou des facteurs de virulence ont été caractérisées.
- La localisation uniquement chromosomique alors que les intégrons de résistance sont véhiculés par des plasmides ou des transposons.

Chez les super-intégrons, l'expression des cassettes n'est pas très bien connue. Selon Clark et coll., certaines VCR contiendraient une séquence promoteur pour les gènes situés en 3' et une

séquence terminateur pour les gènes situés en 5' (Clark 1997). Il se peut que les cassettes présentes en multi-copies jouent un rôle de promoteur pour d'autres cassettes (Rowe-Magnus 1999). L'expression chez les super-intégrons se ferait donc par la production de différents transcrits plutôt que par le biais d'une transcription à partir d'un seul promoteur comme c'est le cas chez les intégrons de résistance aux antibiotiques.

Les séquences inversées répétées équivalentes aux sites *attC* sont spécifiques du super-intégron qui les héberge. Le degré de divergence des séquences répétées entre les différents super-intégrons correspond au degré de divergence de leur gène *intI*. Il semblerait donc que chaque super-intégron soit spécifique de l'espèce bactérienne qui l'héberge. Si chaque espèce bactérienne possède un super-intégron contenant chacun une centaine de cassettes, on conçoit aisément le phénoménal réservoir de gènes que constituent les super-intégrons. Les gènes ne sont pas indispensables à la croissance des bactéries et seraient plutôt susceptibles de jouer un rôle dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. Les super-intégrons constitueraient donc un système potentiel d'adaptation des bactéries aux différentes pressions environnementales par capture de gènes étrangers de diverses origines.

6- Les intégrons complexes

Au début des années 1990, de nouveaux types d'intégron de classe 1 ont été identifiés : In6 et In7 décrits sur les plasmides pSa et pDGO100 respectivement (Stokes 1993).

Ces intégrons sont constitués de deux intégrons de classe 1 plus ou moins délétés. Ces intégrons sont désignés sous le nom d'intégrons complexes. Ils contiennent en 5' un intégron de classe 1 dont la région 3' contient les gènes *qacEΔI* et *sulI*, mais il est généralement délété de l'ORF5. Entre la région 5' et 3' sont insérées une ou plusieurs cassettes. A la suite de la région 3' se trouve une région de 2,154 kb désignée région commune et contenant un cadre de lecture ouvert de 1,54 kb, l'ORF513. Cette région commence 24 paires de bases après le

codon stop du gène *sulI*. Adjacente à cette région commune, est localisée une région unique qui inclut des gènes de résistance aux antibiotiques, *catA2* (gène de résistance au chloramphénicol) chez In6, *dfrA10* (gène de résistance au triméthoprim) chez In7 (**figure 6**). Au-delà de la région unique, se trouve une seconde copie partielle de la région 3' d'un intégron de classe 1. Cette région 3' est délétée des 249 premières paires de bases chez In6, et des 77 premières paires de bases chez In7.

Depuis, un grand nombre d'intégrons de classe 1 contenant la région commune adjacente à des variétés de gènes de résistance aux antibiotiques a été décrit (**figure 6**). Seul l'intégron In60 contient une seconde copie complète de la région 3' qui n'est pas délétée d'une partie de *qacEΔ1*.

Les gènes de résistance localisés en aval de l'ORF513 ne sont pas intégrés dans des cassettes, aucune séquence *attC* n'ayant été retrouvée en 3' de ces gènes.

La protéine déduite de la séquence nucléotidique de ORF513 est supposée fonctionner comme une recombinase (Valentine 1994). En effet, cette protéine a 66% d'identité avec la protéine codée par *orfA* caractérisée sur un plasmide chez *E. coli* (Cloackert 2000) et 55% d'identité avec la protéine codée par *orf2* caractérisée sur l'îlot de résistance chez *S. enterica* serotype Typhimurium DT104 (Boyd 2002). Ces deux protéines ORFA et ORF2 sont des probables transposases. De plus ces trois ORF (513, A et 2) ont de faibles niveaux d'identité avec les transposases de la famille IS801. ORF513 reconnaît préférentiellement un site de recombinaison spécifique de 28 pb situé à l'extrémité droite de la région commune et qui est dupliqué dans l'intégron In6 (Valentine 1994). La reconnaissance de ce site permettrait l'acquisition de gènes de résistance en plus de ceux intégrés sous forme de cassettes au site *attI*. Cette hypothèse irait dans le sens du fait que les régions divergentes commencent toutes au même point chez les différents intégrons complexes. Pour l'instant, la protéine codée par ORF513 n'a pas été entièrement caractérisée.

Stokes et Hall en 1993 ont suggéré que ces gènes seraient intégrés sous forme de cassettes et qu'ils auraient par la suite perdu leur possibilité d'excision suite à la délétion du site *attC* (Stokes 1993).

Pour l'instant l'origine des gènes de résistance localisés en aval de l'ORF513 est méconnue. L'analyse des différents intégrons complexes suggère que dans certains cas l'origine de ces gènes de résistance serait une portion d'ADN chromosomique de différentes espèces après recombinaison soit homologue soit catalysée par l'ORF513 (Verdet 2000; Arduino 2002).

Récemment, chez les souches de *Salmonella* Typhimurium DT104 résistant à l'ampicilline (Ap), au chloramphénicol/florfénicol (Cm/Ff), streptomycine/spectinomycine (Sm/Sp), sulfamides (Su), et tétracyclines (Tc) (phénotype ApCmSmSuTc), il a été mis en évidence un «îlot de résistance» de 43kb, appelé *Salmonella* Genomic Island (SGI) localisé entre les gènes chromosomiques *thdF* et *intI2* et hébergeant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, (Boyd 2000; Boyd 2001; Doublet 2003). Cet «îlot de résistance» héberge un intégron de classe 1 contenant la cassette *aadA2* et le gène *sulI* tronqué (*sulI*). Le deuxième intégron contient la cassette *bla_{PSE-1}* et le gène *sulI* entier. Entre les deux intégrons s'insèrent les gènes *floR*, *tetR* et *tetG* codant respectivement la résistance au florfénicol ou chloramphénicol, et aux tétracyclines (Boyd 2000; Boyd 2001) (**figure 7**).

Cet îlot de résistance a été également décrit chez *Salmonella* Typhimurium DT120, *Salmonella* Paratyphi B et *Salmonella* Agona, suggérant un transfert horizontal de SGI.

De nouveaux variants sont décrits chez *S.* Typhimurium DT104, et *S.* Agona et *S.* Albany: SGI-A, SGI-B, SGI-C, SGI-D, SGI-E, SGI-F (Boyd 2002; Doublet 2003). Jusqu'à présent ces variants ont été identifiés chez des souches d'origine animale. La mise en évidence de SGI-A chez des souches de *S.* Agona d'origine humaine indique les possibilités de transfert horizontal de l'îlot de résistance de l'animal vers l'homme et vice versa (Doublet 2004). Cet îlot a été également retrouvé chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais il diffère de l'îlot retrouvé

chez *S. Typhimurium* DT104 par la présence de la cassette *ant(4')-IIIb* et l'absence de la cassette *bla_{PSE-1}* (Sabtcheva 2003).

7 - Origine des intégrons

L'origine des intégrons et des cassettes constitue une énigme, de même que la génèse des cassettes. Plusieurs hypothèses ont été avancées, mais la plus probable est que les super-intégrons seraient les ancêtres des trois classes d'intégrons impliquées dans la multirésistance aux antibiotiques. Les intégrons de résistance auraient évolué à partir de super-intégrons par le biais de la capture d'un gène *intI* et d'un site *attI* dans des structures mobiles type transposon et ensuite, sous l'effet de la pression de sélection, il y aurait eu capture de gènes de résistance provenant de pools de cassettes contenus dans différents super-intégrons (Rowe-Magnus 1999).

7-1 - Origine des gènes

L'origine des gènes de résistance retrouvés dans les cassettes reste également inconnue.

Des gènes ayant des pourcentages d'identité élevés avec des gènes associés à des cassettes ont été retrouvés sur le chromosome de différentes espèces bactériennes (Recchia 1997). C'est le cas des gènes *catB1* et *catB7* décrits respectivement sur le chromosome d'*Agrobacterium tumefaciens* et de *P. aeruginosa* qui ont 63 à 70% d'identité avec les gènes *catB2*, *catB3* et *catB5* décrits dans des cassettes et codant la résistance au chloramphénicol (Tennigkeit 1999; White 1999). Ces gènes forment de véritables familles ou sous-familles de gènes qui dériveraient d'un pool commun de gènes.

La cassette de résistance à la rifampicine *arr-2* décrite chez *Pseudomonas aeruginosa* et certaines souches d'*Acinetobacter* (Tribuddharat 1999; Houang 2003) code la protéine ARR-2 ayant 54% d'identité avec la protéine ARR conférant la résistance à la rifampicine par

ribosylation chez *Mycobacterium smegmatis*. L'homologie de ces deux protéines indique qu'elles dérivent probablement d'un ancêtre commun. La découverte de la cassette *arr-2* sur un intégron suggère le rôle éventuel des intégrons dans un transfert entre les Mycobactéries et les Pseudomonades (Tribuddharat 1999).

Certains gènes des super-intégrons sont homologues à des gènes de bactéries mais aussi de virus ou d'eucaryotes. L'origine des gènes de super-intégrons pourrait donc être très vaste et impliquer les génomes des différents règnes du monde vivant (Rowe-Magnus 1999).

7-2 - Origine des cassettes

La génèse des cassettes (fixation d'un site *attC* en aval d'un gène) constitue également une énigme. Un modèle de transcription reverse d'une molécule d'ARNm a été décrit (Hall 1991), mais jusqu'à présent, aucune reverse transcriptase synthétisée par la bactérie n'a été mise en évidence.

Chez les super-intégrons, l'usage des codons des gènes contenus dans les différentes cassettes est différent alors que les séquences répétées sont très conservées au sein d'un même super-intégron. Ceci suggère que les gènes ont des origines différentes et que les séquences répétées sont associées au gène à l'intérieur de la bactérie.

7-3 - Evolution des intégrons

Les intégrons jouent un rôle important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif, de nombreux gènes de résistance ont en effet été décrits dans des cassettes d'intégrons. Des études épidémiologiques ont montré que la cassette *aadA1* codant la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine était très représentée dans les intégrons alors que ces deux antibiotiques sont d'utilisation assez restreinte en pathologie humaine (Martinez-Freijo 1999). De plus, une étude réalisée sur des

souches d'entérobactéries non reliées épidémiologiquement a montré la présence d'intégrons pour lesquels la nature et l'ordre des cassettes insérées étaient très conservés malgré une pression de sélection antibiotique très variable selon les pays et les hôpitaux (Martinez-Freijo 1999). Ceci serait en faveur d'une dissémination de la résistance aux antibiotiques qui serait due au transfert des intégrons dans leur totalité par le biais de plasmides ou de transposons plutôt qu'à l'échange de cassettes. Ces auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle les intégrons auraient évolué il y a longtemps et seraient en fait assez stables.

La découverte des intégrons est récente, pourtant de nombreuses études indiquent qu'il s'agit en fait de structures anciennes. Le degré d'homologie entre les intégrases des différentes classes suggère qu'elles ont divergé depuis plus de 50 ans, c'est-à-dire avant l'utilisation des antibiotiques (Rowe-Magnus 1999). De plus, certaines souches de *Vibrio* contenant un super-intégron avaient été isolées en 1900, bien avant l'ère des antibiotiques (Mazel 1998). Au-delà de la résistance aux antibiotiques, les intégrons seraient en fait des structures permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement par l'acquisition de gènes indispensables à leur survie (métabolisme, facteurs de virulence, résistance aux antibiotiques). La présence de super-intégrons hébergeant de très nombreux gènes codant différentes fonctions pourrait permettre à cette bactérie d'avoir une capacité d'adaptation rapide par ce système de capture de gènes, ce qui lui permettrait d'acquérir un avantage sélectif (Rowe-Magnus 1999).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Présentation du travail de thèse

Au Sénégal, les diarrhées infectieuses sont la cause d'une morbidité et mortalité importante, particulièrement chez les enfants entre 0 et 4 ans. L'utilisation des antibiotiques a été déterminante dans le traitement des diarrhées bactériennes, mais elle a aussi été à l'origine d'une forte pression de sélection antibiotique touchant beaucoup d'espèces bactériennes et concernant les antibiotiques les plus couramment prescrits.

La forte antibiorésistance observée chez les bactéries entériques nous a amené à étudier les supports génétiques de ces résistances et plus précisément à caractériser des intégrons et à étudier leur rôle dans la dissémination de la résistance. Les intégrons constituent un système de capture de gènes particulièrement performant sans doute largement responsable de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien. Peu d'études ont été réalisées sur les intégrons en Afrique subsaharienne; au Sénégal, aucune étude n'a été entreprise sur ce sujet; ce travail constitue la première étude effectuée chez des bactéries à Gram négatif entéropathogènes, sélectionnées pour leur multirésistance. Chez les bactéries à Gram négatif, plusieurs études épidémiologiques ont montré une distribution importante des intégrons au sein de souches résistantes. De nombreuses combinaisons de cassettes peuvent exister conférant ainsi des résistances multiples. Une meilleure connaissance de la distribution des intégrons et de leur organisation contribuera à mieux comprendre leur évolution et à évaluer leur rôle dans la multirésistance observée chez les bactéries entéropathogènes.

Afin d'évaluer l'importance clinique des intégrons, nous avons étudié la prévalence des intégrons chez des souches de *E. coli* entéroinvasifs, *E. coli* entéroaggrégatifs, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella sp* (un nouveau sérotype en cours d'identification) et *Salmonella* Keurmassar (un nouveau sérotype inclus dans le schéma de Kauffman-White-Le Minor en 2001) multirésistantes aux antibiotiques et isolées dans

différents hôpitaux de Dakar, mais aussi au Centre National Sénégalais des Entérobactéries (CNSE) sis à l'Institut Pasteur de Dakar. Cette multirésistance concerne les bêtalactamines, les aminosides, les cyclines, les sulfamides, le triméthoprim et les phénicolés.

Nous avons d'abord étudié la clonalité des souches par les techniques de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou d'électrophorèse en champ pulsé, puis recherché la présence d'intégrons de classe 1, 2 et 3 et enfin caractérisé les intégrons identifiés.

Nous avons ainsi déterminé si les résistances aux antibiotiques portées par les intégrons étaient transférables.

Au cours de cette étude, nous avons déterminé la prévalence des intégrons chez les bactéries entéropathogènes; elle a surtout montré la diversité de ces structures. La caractérisation des intégrons nous a permis de détecter des cassettes *oxa*, *aadA*, *ereA2*, *aac (6')-IIc*, *dfr*. Les cassettes *aadA* codant la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine, et les cassettes *dfr* codant la résistance au triméthoprim ont été majoritairement retrouvées dans notre étude chez toutes les espèces bactériennes étudiées. Ces antibiotiques sont encore largement prescrits en Afrique. En effet, au Sénégal, la streptomycine est toujours utilisée dans le traitement de la tuberculose; la spectinomycine est également employée dans le traitement de la gonococcie; le triméthoprim, produit-clef de l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim est encore largement utilisé dans le traitement des diarrhées au Sénégal. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une nouvelle association de cassettes chez un nouveau sérotype de *Salmonella* : *aac (6')-IIc* et *ereA2*.

Chez des souches appartenant à différentes espèces de *Shigella*, dont une nouvelle espèce en cours d'identification au CDC, nous avons caractérisé de nombreux intégrons de classe 1 et de classe 2. Parmi ces derniers, nous avons montré que certains intégrons ne contenaient pas la cassette *aadA1* classiquement présente chez les intégrons de classe 2. Par ailleurs, nous avons caractérisé un intégron de classe 1 avec les cassettes *oxa30* ou *oxa1* en association avec

la cassette *aadAI*. En aval de *aadAI*, nous avons identifié la séquence d'insertion IS1. Les résultats de ces travaux ont donné lieu à deux articles publiés et un manuscrit en cours d'écriture pour soumission.

Publication n°1 :

**Integron-associated antibiotic-resistance in enteroaggregative and
enteroinvasive *Escherichia coli***

**Amy GASSAMA, Awa AÏDARA-KANE, Delphine CHAINIER, François
DENIS, and Marie-Cécile PLOY**

Microbial Drug Resistance, 2004, 10 : 27-30

L'étude a été réalisée sur 25 souches de *E. coli* entéroaggrégatifs (EaggEC) et 10 souches de *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) isolées de patients diarrhéiques, adultes, de 1997 à 1999 dans deux hôpitaux de Dakar (CHU Fann et Hôpital Principal de Dakar). Ces souches résistaient à au moins un des antibiotiques suivants: triméthoprim, sulfamides, ampicilline, ticarcilline, chloramphénicol ou tétracyclines.

Nous n'avons détecté que des intégrons de classe 1, chez 15 des 25 souches d'EaggEC et chez 4 des 10 souches d'EIEC. La caractérisation des intégrons chez les souches d'EIEC a permis de détecter la cassette *dfrA5* codant la résistance au triméthoprim; chez les souches d'EaggEC, nous avons détecté trois types d'intégrons: le premier hébergeant la cassette *aadA1*, le deuxième les cassettes *dfrA13* et *oxa5*, chez le troisième intégron, on retrouvait la cassette *dfrA7*. Les intégrons hébergeant respectivement les cassettes *aadA1* et *dfrA13-oxa5* étaient toujours retrouvés ensemble dans la même souche et les résistances étaient co-transférées lors des expériences de conjugaison, ce qui suggère que les deux intégrons étaient portés par un même plasmide.

L'étude de la clonalité des souches a permis d'identifier quatre profils chez les souches d'EaggEC et deux chez les souches d'EIEC; chez les EaggEC, les types I et II avaient la même organisation des cassettes au sein de leurs intégrons, suggérant un transfert des intégrons par le biais de plasmides ou transposons conjugatifs. .

Publication n°2:

Integron- associated antibiotic-resistance in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar emerging in Senegal.

Amy GASSAMA-SOW, Awa AÏDARA-KANE, Nabil RAKED, François DENIS, and Marie-Cécile PLOY

Emerging Infectious Diseases, 2004

Les salmonelles restent la première cause de toxi-infections alimentaires; cette réalité est d'autant plus préoccupante que depuis les années "1990", les souches de *Salmonella* isolées chez l'homme et chez l'animal présentent des niveaux de résistance aux antibiotiques de plus en plus élevés.

Notre étude a porté sur huit souches d'un nouveau sérovar de *Salmonella*, *Salmonella enterica* subsp *enterica* sérovar Keurmassar provenant du Centre Sénégalais des Entérobactéries (CNSE). Ces souches, d'origine humaine (coproculture) et animale (chair de poulet) ont été isolées dans la même période allant de mars à avril 2000 ; elles présentaient une multirésistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, aux sulfamides, au triméthoprim, aux tétracyclines, à la streptomycine/spectinomycine et à la gentamicine (phénotype ApCmSuTmTeSmSpGm). Ces souches exprimaient en plus une bêtalactamase à spectre élargie de type SHV-12 (IEP=8,2).

L'analyse de fragments de restriction de l'ADN total de ces souches par électrophorèse en champ pulsé a montré qu'elles présentaient toutes le même pulsotype qu'elles soient d'origine humaine ou animale.

Toutes les souches possédaient deux types d'intégrons de classe 1: le premier hébergeait la cassette *aadA2*, codant la résistance à la streptomycine/spectinomycine ; le second hébergeant un nouvel arrangement de deux cassettes déjà connues: *aac(6')-IIc*, supposée coder la résistance à la gentamicine et à la tobramycine et *ereA2* codant la résistance à l'érythromycine.

Les expériences de conjugaison ont montré que l'ensemble des résistances exprimées par ces souches étaient transférées « en bloc » à une souche réceptrice de *E. coli*.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Characterization of class 1 and 2 integrons in *Shigella* species isolated in Senegal.

Amy GASSAMA, Awa AÏDARA-KANE, Delphine CHAINIER, François DENIS, and Marie-Cécile PLOY

Présentation affichée (Poster N°586), 13^e European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 10-13 Mai 2003, Glasgow

Manuscrit en préparation pour soumission à Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Introduction.

Dans les pays en voie de développement, la dysenterie bacillaire est l'une des causes les plus importantes de morbidité et de mortalité. Le nombre annuel d'épisodes de shigellose est estimé à 165 millions dont 99% (163 millions) dans les pays sous-développés avec un taux de mortalité atteignant 69% particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans (Kotloff 1999). En Afrique subsaharienne, les données disponibles montrent une forte prédominance de *S. flexneri* aussi bien en zone rurale qu'en zone urbaine (Diallo 2001; Iwalokun 2001; Shapiro 2001; Bonfiglio 2002); *S. dysenteriae* type 1 est en net recul. Au Sénégal, on décrit chaque année de nouvelles souches n'appartenant à aucun sérovar connu (CNSE 2002 : www.pasteur.sn). Le développement de la résistance aux antibiotiques chez *Shigella* constitue un réel problème de santé publique. Au Sénégal, plus de 80% des souches de *S. flexneri* présentent une multirésistance aux bêtalactamines, au cotrimoxazole, au triméthoprim, aux tétracyclines et au chloramphénicol. *S. sonnei* présente une résistance constante au cotrimoxazole et aux tétracyclines. *S. dysenteriae* type 1 résiste à l'ampicilline, au cotrimoxazole et au chloramphénicol (données du CNSE 2002).

Le but de ce travail est d'évaluer la contribution des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques des souches de *Shigella* isolées au Sénégal.

Matériels et méthodes.

L'étude a porté sur 35 souches de *Shigella*, dont 14 souches de *S. flexneri*, 13 souches de *S. dysenteriae* A1, 3 souches de *S. sonnei* et 5 souches n'appartenant à aucun sérovar connu et dont l'identification est en cours au CDC. Ces souches ont été isolées entre 1997 et 1999 chez des patients diarrhéiques dans deux hôpitaux différents à Dakar (CHU Fann et Hôpital Principal).

L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme, Société Française de Microbiologie (CASFM) (Garret 2001).

Les souches ont été typées par la technique de typage moléculaire Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) comme précédemment décrit (Ploy 2000). Les oligonucléotides utilisés sont décrits dans le **tableau 3**. La recherche d'intégrons a été effectuée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes *intI1*, *intI2* et *intI3* comme précédemment décrit (Ploy 2000). Une recherche par PCR d'un fragment des gènes *qacEΔ1* et *sull* localisés dans la région 3' chez de nombreux intégrons de classe 1 a aussi été réalisée. La caractérisation des cassettes des intégrons de classe 1 a été effectuée par amplification génique de la région variable en utilisant des amorces dans les régions 5' et 3' comme précédemment décrit (Levesque 1995). En cas d'absence de la région 3', nous avons utilisé des combinaisons de couples d'amorces choisies dans des cassettes connues chez les intégrons de classe 1 et en fonction du phénotype de résistance. Les produits de PCR obtenus ont été séquencés en utilisant le protocole ABI PRISM rhodamine terminator selon les recommandations du fabricant (Perkin-Elmer Applied Biosystems). La caractérisation des intégrons de classe 2 a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques du site *attI2* et des cassettes *dfrA1*, *sat*, *aadA1* et *ORFX* habituellement retrouvées chez les intégrons de classe 2. La recherche d'homologie des séquences a été réalisée grâce aux programmes de recherche BLASTN, BLASTX au NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Les expériences de conjugaison ont été effectuées avec la souche réceptrice *E.coli* C1a résistante à l'acide nalidixique. Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique 50 µg/ml et de l'ampicilline 100 µg/ml ou du triméthoprime 100 µg/ml.

Résultats.

Les souches résistaient à au moins un des antibiotiques suivants: triméthoprimé, sulfamides, ampicilline, ticarcilline, chloramphénicol ou tétracyclines (**Tableau 4**). Nous avons détecté des intégrons de classe 1 et/ou 2 chez 85,7% des souches (30/35). Nous avons obtenu un produit d'amplification avec les amorces spécifiques du gène *intI1* pour 26 souches. Dix-huit souches ont donné un produit d'amplification avec les amorces spécifiques de *intI2* parmi lesquelles 14 souches contenaient aussi un intégron de classe 1. Nous n'avons détecté aucun intégron de classe 3. Chez les 4 souches hébergeant seulement un intégron de classe 2, nous avons détecté les cassettes habituellement décrites chez les intégrons de classe 2, *dfrA1-sat1-aadA1-ORFX*, sauf chez deux souches de *S. flexneri* pour lesquelles nous n'avons pas détecté la cassette *ORFX*. Chez 9 souches de *S. dysenteriae* appartenant au même type RAPD C et hébergeant un intégron de classe 1 et un intégron de classe 2, nous avons noté une délétion de la cassette *aadA1* de l'intégron de classe 2 ; l'intégron contenait alors seulement les cassettes *dfrA1-sat1-ORFX*. Par ailleurs, pour ces 9 souches ainsi que pour 6 souches de *S. flexneri*, appartenant au type RAPD E, nous n'avons pas obtenu de produit d'amplification avec les amorces ORF4 et Sul1, ce qui suggérait une absence de la région 3'. Ces souches exprimaient toutes une résistance à la streptomycine et/ou à la spectinomycine. Nous avons donc utilisé les amorces AadA1, située dans la cassette *aadA1*, et ORF8, localisée 360pb en aval de ORF4, dans la partie 3' du gène *qacEΔ1*. Nous avons obtenu pour toutes les souches un produit d'amplification d'environ 1 kb. Le séquençage de ce produit d'amplification nous a permis par comparaison de la séquence avec les banques de données de montrer que, en aval de *aadA1*, nous n'avons pas *qacEΔ1* mais la séquence d'insertion IS1. La séquence n'était pas lisible de façon satisfaisante sur toute la longueur du produit d'amplification. Aussi, nous ne pouvons pas donner la localisation exacte de IS1 dans la région 3'. De nouvelles

amplifications et réactions de séquence sont en cours pour mieux préciser l'événement d'insertion de IS1 dans l'intégron. Ensuite, pour déterminer le contenu exact en cassettes de ces intégrons possédant l'IS1, nous avons réalisé une amplification avec les amorces 5'CS et AadA3. Le séquençage des produits d'amplification a montré que ces intégrons contenaient une seule cassette en amont de *aadA1*, soit la cassette *oxa1*, soit la cassette *oxa30*. L'agencement des cassettes *oxa30-aadA* suivies de IS1 a déjà été décrit dans un intégron sur le chromosome de *S. flexneri* (numéro d'accès AY574195) mais, à notre connaissance, le contenu en cassettes *oxa1-aadA1-IS1* n'a jamais été décrit. Cependant, les gènes *oxa1* et *oxa30* sont très proches: *oxa1* diffère de *oxa30* par une modification au niveau du codon 131 (remplacement du triplet AGA par le triplet GGA, arginine remplacé par la glycine). Etant donné que les gènes *oxa1* et *oxa30* ne diffèrent que par une mutation (A/G) et que les PCR ont été réalisées avec la *Taq* polymérase qui fait des erreurs de lecture, des PCR avec une polymérase plus fidèle (Pfu, Pwo, ...) sont en cours afin de vérifier si les deux cassettes *oxa1* et *oxa30* sont bien présentes chez ces différents intégrons ou s'il ne s'agit en fait que de la cassette *oxa30* comme il a été décrit (numéro d'accès AY574195). Etant donné que l'intégron (numéro d'accès AY574195) contenant *oxa30-aadA-IS1* a été décrit sur le chromosome de *S. flexneri*, nous avons réalisé des expériences de conjugaison pour 3 souches avec sélection des transconjugants sur acide nalidixique et ampicilline:

- 1 souche de *S.dysenteriae* de type C possédant les deux intégrons de classes 1 et 2 et pour lesquelles l'intégron de classe 1 portait les cassettes *oxa1-aadA1-IS1*.
- 1 souche de *S.flexneri* de type E possédant un intégron de classe 1 avec les cassettes *oxa1-aadA1-IS1*.
- 1 souche de *S.flexneri* de type E possédant un intégron de classe 1 avec les cassettes *oxa30-aadA1-IS1*.

Nous n'avons pas obtenu de transconjugants quelle que soit la souche donatrice. Cette observation serait compatible avec une localisation chromosomique de l'intégron. Après vérification de la séquence des gènes *oxa*, nous étudierons l'environnement génétique de l'intégron afin de définir sa localisation plus précisément.

Par ailleurs, une conjugaison réalisée à partir d'une souche contenant un intégron de classe 2 délété de la cassette *aadA1* n'a pas permis d'obtenir de transconjugants en sélectionnant sur acide nalidixique et triméthoprim. Ceci suggère que l'intégron de classe 2 pourrait se trouver lui aussi sur le chromosome.

La caractérisation des autres intégrons de classe 1, contenant la région 3', a permis de détecter les cassettes *aadA1*, *dfrA15*, *dfrA5*, *dfrA1*, *aadA2*, seules ou en association (**Tableau 4**).

Les souches de *Shigella* appartenant à un nouveau sérotype contiennent toutes un intégron de classe 1 et un intégron de classe 2. L'intégron de classe 1 contient seulement la cassette *dfrA5* et l'intégron de classe 2 contient les 4 cassettes classiquement rencontrées chez cette classe d'intégron (**Tableau 4**).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

I - Discussion

L'antibiothérapie a été l'un des progrès décisifs de l'histoire de la médecine, elle est aussi à l'origine de l'émergence de bactéries multirésistantes contre lesquelles les antibiotiques sont devenus totalement inefficaces. La menace existe dans les pays développés mais aussi dans les pays en voie de développement où cohabitent l'automédication et la vente anarchique des médicaments en dehors des structures légales.

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être localisés sur le chromosome mais aussi sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons ou les cassettes d'intégrons. Ces éléments génétiques peuvent porter plusieurs gènes de résistance et être transférables au sein d'une même espèce mais aussi entre espèces et genres différents. La dissémination des gènes de résistance par transfert horizontal conduit à l'émergence et à la dissémination de bactéries multirésistantes. Dans notre étude, nous avons recherché la présence des trois classes d'intégrons de multirésistance et nous nous sommes surtout attachés à la caractérisation complète de chacun des intégrons détectés. En effet, la connaissance de la diversité et de l'organisation des intégrons est susceptible de permettre de suivre l'évolution des intégrons et d'évaluer leur rôle dans la multirésistance des bactéries à Gram négatif. Nous avons donc sélectionné des souches de *E.coli*, *Salmonella* et *Shigella*, isolées dans les selles de patients diarrhéiques au Sénégal, et choisies pour leur multirésistance aux antibiotiques. Nous voulions déterminer la part des intégrons dans la multirésistance de souches isolées au Sénégal où les antibiotiques disponibles sont peu variés. En effet dans la cas des diarrhées, les familles d'antibiotiques utilisées sont majoritairement l'association triméthopri-me-sulfaméthoxazole, l'ampicilline, et la tétracycline.

Chez les souches de *E. coli* entéroinvasifs, nous avons détecté des intégrons de classe 1, hébergeant la cassette *dfrA5*, codant la résistance au triméthoprimé chez 4 souches appartenant au même type RAPD; chez les souches de *E. coli* entéroaggrégatifs, nous avons détecté trois types d'intégrons et identifié les cassettes *aadA1*, *dfrA13*, *oxa5*, et *dfrA7*. Les deux intégrons hébergeant respectivement les cassettes *aadA1* et *dfrA13-oxa5* étaient toujours retrouvés ensemble et ont été détectés chez les types RAPD I et II suggérant un transfert horizontal des intégrons via des plasmides ou des transposons conjugatifs.

Chez toutes les souches possédant un intégron, nous avons démontré que toutes les résistances exprimées par les EIEC ou EaggEC, excepté la résistance au chloramphénicol, étaient transférables « en bloc » par conjugaison. A partir des préparations plasmidiques des transconjugants, nous avons vérifié par PCR la présence des intégrons en amplifiant un fragment du gène de l'intégrase *IntI1* mais aussi les cassettes avec des amorces spécifiques des cassettes détectées. Ceci suggère que les intégrons de classe 1 caractérisés chez les différentes souches sont portés par un plasmide qui porte aussi les autres marqueurs de résistance observés. Des études précédentes avaient montré la présence d'intégrons chez des souches de *E.coli* responsables de diarrhées. Okeke et coll. ont détecté la présence d'intégrons de classe 1 et 2 chez des souches de EaggEC et de CDEC (cell-detaching *E. coli*) isolées chez des enfants nigériens (Okeke 2002). Zhao et coll. ont également montré la présence d'intégrons de classe 1 hébergeant les cassettes *aadA2* et *dfrA12* chez des souches de STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*), d'origine humaine, animale et alimentaire (Zhao 2001).

Chez les souches de *Salmonella* Keurmassar multirésistantes (phénotype ApCmSuTmTeSmSpGm) isolées simultanément chez le poulet et chez l'homme (Cardinale 2001), nous avons détecté deux intégrons de classe 1, l'un hébergeant la cassette *aadA2* codant la résistance à la streptomycine/spectinomycine, le second hébergeant les cassettes *aac(6')-IIc*

et *ereA2* codant respectivement la résistance à la gentamicine, la tobramycine et l'érythromycine. La cassette *ereA2* a été retrouvée dans d'autres intégrons de classe 1 chez *Providencia stuartii* (GenBank, numéro d'accès : AF099140), *Escherichia coli*, et *Enterobacter aerogenes*, mais jamais chez *Salmonella*; chez *Escherichia coli*, et *Enterobacter aerogenes*, *ereA2* était toujours associée à la cassette *dfrA5* (Peters 2001; White 2001; Thungapathra 2002; Plante 2003). La cassette *ereA2* a aussi été décrite chez un intégron de classe 2 (Biskri, 2003). La cassette *aac(6')-IIc* a été décrite pour la première fois chez une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, associée à la cassette *pse* codant la résistance aux bêtalactamines (GenBank, numéro d'accès: AF162771) et n'a ensuite été retrouvée chez aucun autre intégron. Nous décrivons donc ici une nouvelle association de cassettes. La caractérisation d'un nouvel intégron chez un nouveau sérotype de *Salmonella* fait de nouveau poser la question de l'origine des intégrons et de la génèse de l'arrangement des cassettes. La pression de sélection à elle seule ne suffit pas pour expliquer la présence d'un tel intégron chez *S. Keurmassar*. En effet, les aminosides tels que la gentamicine, la nétilmicine et la tobramycine pour lesquels la cassette *aac(6')-IIc* est supposée coder la résistance ne sont pas utilisés au Sénégal, car trop onéreux. Or, cette cassette est retrouvée dans notre étude en première position donc située le plus près du promoteur des cassettes pour une meilleure expression (Levesque 1994; Collis 1995). Toutes les résistances exprimées par cette souche ont été transférées en bloc à une souche de *E.coli*, et l'analyse plasmidique des transconjugants a permis de détecter par PCR les deux intégrons portés par la souche. Il est donc probable que ces deux intégrons soient situés par un seul plasmide qui porte aussi les autres marqueurs de résistance. Ainsi, cette souche peut avoir été sélectionnée par un antibiotique dont un déterminant de résistance est porté par le plasmide. Il y aurait eu ainsi une co-sélection des intégrons. Les intégrons portant respectivement la cassette *aadA2* et les cassettes *aac(6')-IIc* et *ereA2* ont donc pu être acquis par la bactérie il y a longtemps et leur

persistance chez cette souche pourrait être due à une pression de sélection par un antibiotique dont la résistance est portée par le plasmide.

Les souches de *S. Keurmassar* ont été isolées chez l'homme (selles) et à partir de chair de poulet et l'étude par électrophorèse en champ pulsé a permis de démontrer que toutes les souches provenaient du même clone. La question de l'origine de la souche se pose aussi. Il est possible que cette souche ait été transmise du poulet à l'homme. En Afrique, les contraintes sanitaires représentent une pression constante sur les élevages de poulet de chair et les aviculteurs n'hésitent pas à recourir aux antibiotiques à l'aveugle pour essayer de juguler les problèmes de mortalité, remédier aux prises de poids médiocres et tenter ainsi de diminuer le coût de production. Il est alors possible de considérer que des antibiotiques utilisés chez le poulet ont permis la sélection d'une souche avec ces deux intégrons porteurs respectivement de la cassette *aadA2* et des cassettes *aac(6')-IIc* et *ereA2*. Il a déjà été montré que l'utilisation d'antibiotiques chez l'animal favorisait la sélection de souches résistantes aux antibiotiques (Witte, 2000). Une étude récente a signalé la présence d'intégrons dans des bactéries isolées de litière dans des élevages de volaille dans le Nord-Est de l'état de Géorgie aux Etats-Unis (Nandi, 2004). Ces auteurs ont d'ailleurs montré que de nombreux intégrons étaient présents dans des bactéries à Gram positif alors que jusqu'à présent très peu d'intégrons ont été retrouvés chez des souches cliniques de bactéries à Gram positif.

Dans notre étude, la souche animale a été isolée de la chair du poulet. Il est donc difficile d'exclure une contamination du poulet par l'homme lors de la manipulation du poulet dans la chaîne de production. Une étude dans l'élevage dont est issu le poulet chez qui la souche de *S.Keurmassar* a été isolée nous permettrait peut-être d'éclaircir la question de l'origine de cette souche.

Chez les souches de *Shigella*, nous avons détecté des intégrons de classe 1 et /ou de classe 2 dans une forte proportion, 85,7% des souches. Un intégron été déjà présent sur Tn21 sur le plasmide NR1 identifié chez *S. flexneri* dans les années 1950 (Liebert, 1999). D'autres études avaient montré une plus faible prévalence d'intégrons de classe 1 chez *Shigella* (Iversen 2003; Navia 2004). Dans notre étude, l'analyse en RAPD a montré que certaines souches étaient clonales, ce qui explique le pourcentage élevé d'intégrons. La caractérisation des cassettes a permis de détecter les cassettes *oxa1*, *aadA1a*, *dfrA15*, *oxa30*, *dfrA5*, *dfrA1*, *aadA2*, seules ou en association. Dans toutes les études portant sur *Shigella* précédemment publiées, les cassettes contenues dans les intégrons de classe 1 étaient majoritairement des cassettes *aadA*, *oxa* et *dfr*. Par ailleurs, plusieurs études ont montré une proportion importante d'intégrons de classe 2 chez *Shigella* (McIver 2002; Oh 2003). Dans notre travail, 18 souches sur 35 possédaient un intégron de classe 2. Chez les 4 souches qui hébergaient seulement un intégron de classe 2, nous avons détecté les cassettes habituellement décrites chez cette classe d'intégrons, *dfrA1-sat1-aadA1-ORFX* sauf pour deux souches de *S. flexneri* qui ne possédaient pas *ORFX*. En revanche, pour 9 souches de *S. dysenteriae* appartenant au même profil RAPD et hébergeant un intégron de classe 1 et un intégron de classe 2, nous avons noté une délétion de la cassette *aadA1* dans l'intégron de classe 2 et donc seules les cassettes *dfrA1-sat1-ORFX* étaient présentes. Un tel intégron de classe 2 ne contenant pas la cassette *aadA1* n'a été décrit qu'une fois chez une souche clonale de *Shigella sonnei* (DeLappe 2003). Les intégrons de classe 2 ont été caractérisés chez le transposon Tn7 et chez d'autres transposons proches de Tn7 (Tn1825, Tn1826 et Tn4132) (Sundström 1991; Young 1994). La différence entre ces quatre intégrons de classe 2, c'est la présence de la cassette insérée en première position (*dfrA1* chez Tn7, *orf* chez Tn1825, *dfrA14* chez Tn4132 et l'absence de cassette chez Tn1826). Tn7, Tn1825 et Tn4132 seraient en réalité des dérivés de Tn1826. Biskri et Mazel avaient décrit pour la première fois l'interruption de l'agencement des trois cassettes *sat-aadA1-*

ORFX avec une insertion de la cassette *ereA* entre *sat* et *aadA1* (Biskri 2003). L'intégrase IntI2 est une intégrase qui n'est pas fonctionnelle car le gène *intI2* est interrompu par un codon stop à la position 179 (Hansson 2002). La délétion de la cassette *aadA1* que nous avons observée n'est donc pas due à l'activité de IntI2. Cependant les souches qui possèdent cet intégron original de classe 2 contiennent également toutes un intégron de classe 1. Il est donc possible d'envisager que la délétion de la cassette *aadA1* de l'intégron de classe 2 soit due à une recombinaison spécifique de site médiée par l'intégrase fonctionnelle de classe 1. D'autre part, les intégrons de classe 1 présents chez ces 9 souches possèdent tous soit la cassette *aadA1* soit la cassette *aadA2*. Il est donc possible d'expliquer aussi la délétion de la cassette *aadA1* de l'intégron de classe 2 par une recombinaison homologue entre deux cassettes *aadA* située sur deux intégrons de classe 1 et 2, comme cela a été suggéré dans le cas d'un intégron hybride classe 1-classe 2 (Ploy 2000).

Chez ces 9 souches ainsi que chez 6 souches de *S. flexneri*, l'intégron de classe 1 avait aussi une structure originale avec les cassettes *oxa1* ou *oxa30* et *aadA1* suivies de la séquence d'insertion IS1. L'IS1 a déjà été décrite chez d'autres intégrons. Biskri et Mazel ont décrit un intégron de classe 2 avec l'IS1 localisée en amont du gène *intI2* (Biskri 2003). L'IS1 a aussi été trouvée dans un intégron de classe 1, cette IS interrompant la cassette *bla_{OXA-10}* (Centron 2002). L'agencement de cassettes *oxa30-aadA* suivies de IS1 a déjà été décrit dans un intégron sur le chromosome de *S. flexneri* (GenBank, numéro d'accès AY574195). Les expériences de conjugaison ne nous ont pas permis d'obtenir de transconjugants, ce qui suggère que l'intégron portant les cassettes *oxa1* ou *oxa30* est localisé sur le chromosome. Les cassettes *oxa* sont fréquemment retrouvées chez la plupart des entérobactéries, particulièrement chez des souches de *Shigella* (Navia 1999), mais aussi chez les souches de *Pseudomonas* (Naas 1998; Siu 2000; Aubert 2001; Naas 2002) et confèrent la résistance aux amino et uréidopénicillines. Siu et coll. ont mis en évidence le gène *oxa30* pour la première

fois chez des souches de *S. flexneri* résistantes à l'ampicilline (Siu 2000). Ce gène a par la suite été retrouvé dans des cassettes d'intégrons chez *E. coli* (Dubois 2003) et *Salmonella* Muenchen (Gebreyes 2004).

Dans nos trois études portant sur *E.coli*, *Salmonella* et *Shigella*, nous avons montré une forte proportion des cassettes *aadA* et *dfr* dans les différents intégrons de classe 1 que nous avons caractérisés.

Les cassettes *aadA* codant des aminoglycoside-adényltransférases (AAD), confèrent la résistance à la streptomycine/spectinomycine par adénylation ; cette famille regroupe plusieurs gènes incluant *aadA1a*, *aadA1b*, *aadA2*, *aadA3*, *aadA4*, *aadA5*, *aadA6*, *aadA7*, *aadA8*, *aadA9*, *aadA10* et *aadA11* (White 2000; Peters 2001).

Les cassettes *dfr* sont classées en deux grands groupes A et B (White 2001) et confèrent la résistance au triméthoprim.

Ces différents antibiotiques sont encore largement prescrits en Afrique. En effet, au Sénégal, la streptomycine est toujours utilisée dans le traitement de la tuberculose; la spectinomycine est également employée dans le traitement de la gonococcie; le triméthoprim, produit-cléf de l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim est encore largement prescrit dans le traitement des diarrhées au Sénégal et est utilisé de façon intempestive dans le traitement des infections urinaires en Afrique (Adrian 2000; Ojo 2002).

Cette pression antibiotique locale a probablement permis de sélectionner les souches contenant des intégrons avec les cassettes *dfr* et *aadA*. Cependant, il est tout de même difficile d'affirmer un lien direct entre la pression de sélection exercée au Sénégal et la détection de ces cassettes. En effet, les cassettes *dfr* et *aadA* ont été retrouvées très fréquemment dans de nombreux intégrons chez des souches cliniques d'origine diverse (Sallen 1995; Martinez-Freijo 1999; Rowe-Magnus 1999; Peters 2001; White 2001; Zhao 2001). La cassette *aadA1*

est très conservée dans de nombreux intégrons y compris chez des souches cliniques isolées dans des pays développés où la streptomycine et la spectinomycine ne sont pratiquement plus utilisées (Chiew, 1998). Par ailleurs, de nombreux intégrons avec des arrangements de cassettes identiques ont été décrits chez des espèces bactériennes très différentes et isolées dans des régions très diverses (Martinez-Freijo 1999). Ceci suggère que les intégrons sont probablement des structures plus stables que ce que l'on pouvait imaginer vu l'énorme réserve de cassettes susceptibles d'être échangées que constituent les intégrons. La propagation des cassettes de résistance se ferait peut-être alors plus par les transferts d'intégrons via des plasmides ou des transposons, que par les échanges de cassettes entre intégrons, les intégrons n'étant pas mobiles par eux-mêmes. Cette stabilité des cassettes dans différents intégrons pourrait avoir plusieurs causes. Parmi celles-ci, on pourrait incriminer le fait que l'intégrase a une faible activité et / ou une faible expression ; en effet, le promoteur du gène *intI1* n'a jamais été caractérisé. Il se peut aussi que certaines cassettes pour lesquelles la pression de sélection est quasi-nulle comme c'est le cas pour les cassettes *aadA*, apportent à la bactérie un avantage sélectif autre que la résistance à la streptomycine et spectinomycine. Il est cependant probable également que la cassette *aadA* soit en fait co-sélectionnée par un autre antibiotique vis-à-vis duquel l'intégron dispose d'une cassette de résistance. Toutefois, certains intégrons ont été décrits avec la cassette *aadA1* seule (Martinez-Freijo 1999).

II - Conclusion

Les infections entériques restent un grave problème de santé publique particulièrement dans les pays en voie de développement où les conditions d'hygiène sont encore précaires. Il s'y ajoute le problème crucial de l'utilisation abusive des antibiotiques, l'automédication, la vente

d'antibiotiques en dehors des structures légales, entraînant le développement de la résistance aux antibiotiques.

Nous avons montré que le rôle joué par les intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries entéropathogènes semble important; ces bactéries ont su, sous l'effet de la pression de sélection antibiotique, acquérir des éléments génétiques leur conférant de nouvelles résistances. Cette étude est la première réalisée au Sénégal et dans un sens plus large en Afrique subsaharienne. Nous avons détecté des intégrons chez des souches humaines mais aussi chez *S. Keurmassar* isolée du poulet. Nous avons montré que les intégrons décrits chez *E. coli* et *Salmonella* étaient transférables par conjugaison. Ainsi, ces supports génétiques qui constituent un système de capture et d'expression de gènes très efficace peuvent être échangés facilement entre des genres bactériens différents par le biais de plasmides ou transposons. Ainsi, de nombreuses bactéries peuvent acquérir cette plateforme génétique leur permettant la capture de gènes de résistance sous forme de cassettes. L'endémicité des pathologies diarrhéiques en Afrique favorise la persistance dans le tube digestif des bactéries entéropathogènes. Il est possible d'envisager que sous l'effet de la pression de sélection antibiotique, ces souches entéropathogènes multirésistantes deviennent prédominantes dans le tube digestif. Ceci augmenterait le risque de transfert horizontal de gènes de résistance entre ces souches et d'autres bactéries pathogènes ou les bactéries commensales (Zhao 2001; Okeke 2002).

Il est donc possible d'envisager dans le futur l'acquisition par ces intégrons d'autres cassettes de résistance codant la résistance à des antibiotiques à plus large spectre comme les céphalosporines de troisième génération pour lesquelles plusieurs cassettes d'intégrons ont été caractérisées y compris chez des souches isolées en Afrique comme c'est le cas de la cassette *GES-2* (Poirel 2002). Il est donc légitime de redouter une telle dissémination de la résistance dans les pays en voie de développement et cette crainte justifie la mise en place dans l'avenir

de réseaux de surveillance de la résistance des bactéries entéropathogènes aux antibiotiques dans les pays en développement afin de limiter l'émergence et la dissémination de souches multirésistantes. Par ailleurs, la vente et l'usage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire devraient être mieux réglementés.

PUBLICATIONS COMPLÉMENTAIRES

Publication n°4

**Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in senegalese
adult in relation to human immunodeficiency virus serostatus**

**Amy GASSAMA, Papa Salif SOW, Fatou FALL, Pathé CAMARA, Aïssatou GUÈYE-
N'DIAYE, Rémonie SENG, Badara SAMB, Souleymane M'BOUP, Yves GERMANI,
Awa AÏDARA-KANE.**

International Journal of Infectious Diseases, 2001, 5 : 192-198.

A Dakar, une étude prospective a été menée de mai 1997 à mai 1999 portant sur les diarrhées au cours du SIDA. Il s'agit d'une étude cas/témoins réalisée sur 594 malades adultes répartis en quatre groupes. Les cas sont constitués par les groupes I (D+VIH+) et II (D+VIH-); les témoins sont constitués par les groupes III (D-VIH+) et IV(D-VIH-). 594 patients ont été examinés (158D +/- VIH+, (121 D +/- VIH-), (160 D- /VIH+), (155D- /VIH-). Chez les sujets immunocompétents les agents d'entérites sont les suivants : *Shigella sp.* (12,4%), *Entamoeba histolytica* (10,7%), *Salmonella enterica* (6,6%) et *Giardia lamblia* (4,9%). Chez les patients immunodéprimés, les agents suivants ont été répertoriés : *E. coli* entéroaggrégant (19,6%), *Microsporidium* (9,4%), *Cryptosporidium sp.*(8,2%), Rotavirus (8,2%), *Shigella sp.* (7,6%), *Candida albicans* (7,6%), *Entamoeba histolytica* (5,1%), *Salmonella enterica* (4,4%) *Isospora belli* (4,4%) et *Blastocystis hominis* (2,5%).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries entéropathogènes isolées a montré une multirésistance aux antibiotiques les plus souvent prescrits au Sénégal pour le traitement de la diarrhée (cotrimoxazole, tétracyclines). L'antibiothérapie probabiliste de premier choix devrait faire appel aux fluoroquinolones qui offrent parmi toutes les molécules actives sur les bactéries isolées le rapport coût /efficacité le plus intéressant.

Publication n°5

Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in HIV- related diarrheas in Senegal.

**Amy GASSAMA-SOW, Papa S. SOW, Madoumbé GUÈYE, Aïssatou GUÈYE-
N'DIAYE, Jean L. PERRET, Souleymane M'BOUP, Awa AÏDARA-KANE.**

Journal of Infectious Diseases, 2004, 189 : 75-78

L'entéropathie liée à la présence du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a permis l'émergence de souches entéropathogènes parmi les espèces réputées commensales au gré d'échanges génétiques ou par l'expression de gènes chromosomiques initialement silencieux. Ce phénomène concerne essentiellement *Escherichia coli*, espèce pour laquelle le rôle de certains pathotypes comme bactéries entéropathogènes émergentes au cours du SIDA est confirmé par plusieurs études.

Au cours d'une étude cas/témoins réalisée sur 594 malades adultes (158D+VIH+, 121D+VIH, 160D-VIH+, 155D-VIH-), menée de mai 1997 à mai 1999, nous avons pour la première fois au Sénégal recherché les gènes de virulence associés aux différents pathovars de *Escherichia coli* par PCR, déterminé les phénotypes d'adhésion par culture cellulaire. Nous avons également étudié la sensibilité des différents pathovars aux antibiotiques dans le but de proposer une antibiothérapie adaptée au traitement des entérites à *E. coli* au cours de l'infection à VIH.

Plusieurs facteurs de virulence ont été mis en évidence chez les patients diarrhéiques, seropositifs (D+HIV+ versus D+HIV- : 21/158 versus 4/121, $p=0,01$; D+HIV+ versus D-HIV+ : 21/158 versus 8/160, $p=0,02$). *Escherichia coli* entéroaggrégatifs (gène *Eagg*) et *Escherichia coli* entéroinvasifs (gène *ipaH*) ont été les pathovars les plus fréquents chez les patients diarrhéiques. EaggEC est le pathotype le plus fréquent chez les patients infectés par le VIH. EIEC est associé à la diarrhée indépendamment du statut sérologique.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des différents pathovars a permis de conclure que l'antibiothérapie probabiliste de premier choix devrait faire appel aux fluoroquinolones pour le traitement des entérites à *E. coli*.

Publication n°6

**Dual Emergence in Food and Humans of a Novel Multiresistant Serotype of *Salmonella*
in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype 35:c:1,2**

**Eric CARDINALE, Pierre COLBACHINI, Jean David PERRIER-GROS-CLAUDE,
Amy GASSAMA, Awa AIDARA-KANE.**

Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39 : 2373-2374

Le centre de référence des Salmonelles de Dakar a reçu entre mars et mai 2000 cinq souches de Salmonelles provenant de prélèvements humains (sang, selles) et animaux (volailles).

Les souches appartiennent à un nouveau sérotype : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 35:c:1,2.

Les souches étaient résistantes à la gentamicine, à la tobramycine, au chloramphenicol, aux tétracyclines restant sensibles aux quinolones et à l'amikacine.

Elles produisent une bêtalactamase à large spectre SHV-12, enzyme qui n'avait jusque là jamais été décrite chez des Salmonelles.

Une première souche de *Salmonella* produisant une bêtalactamase à spectre élargi avait été décrite en 1993 au Sénégal, il s'agissait d'une souche de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Kentucky.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi, J., Ericsson, C.D., Jiang, Z.D., DuPont, M.W., Pallegar, S.R., and DuPont, H.L. (2002). Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. J. Infect. Dis. **185** (1): 1681-3.
- Adrian, P. V., Thompson, C. J., Klugman, K. P., Amyes, S. G. B. (2000). New gene cassettes for trimethoprim resistance, *dfr13*, an streptomycin and spectinomycin resistance, *aadA4*, inserted on a class 1 integron. Antimicrob. Agents and Chemother. **44** (2): 355-61.
- Aïdara, A., Arborio, M., Samb, A., Diop-Mar, I., Boye, C., et Diop, B.M. (1988). Incidence des *Escherichia coli* pathogènes sur le diarrhées aiguës infantiles à Dakar. Bull. Soc. Path. Ex. **81** (2): 202-10.
- Aïdara, A., Gentile, B. (1989). Etiologies bactériennes des diarrhées aiguës infantiles à Dakar. Dakar Med. **34** (1-4): 157-60.
- Aïdara, A., Koblavi, S., Boye, C.S., Raphenon, G., Gassama, A., Grimont, F., and Grimont, P.A.D. (1998). Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates from a recent cholera outbreak in Senegal: comparison with isolates from Guinea Bissau. Am. J. Trop. Med. Hyg. **58** (2): 163-7.
- Albert, J. M. (1994). *Vibrio cholerae* O139 Bengal. J. Clin. Microbiol. **32**: 2345-9.
- Allen, A., Wells, J.G., Olivola, D., Ntakibirora, M., Nyandwi, S., Ntibakivayo, M., Ivey, C.B., D.Greene, K., Tenover, F.C., Wahlquist, P., Griffin, P.M., and Tauxe, R. (1994). Epidemic *Shigella dysenteriae* type 1 in Burundi: Panresistance and implications for prevention. J. Infect. Dis. **164**: 1035-41.
- Altekruse, S., Stern, N.J., Fields, P.I., and Swerdlow, D.L. (1999). *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. Emerg. Infect. Dis. **5** (1): 28-35.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{imp}*. Antimicrob. Agents and Chemother. **39**: 1612-15.
- Arduino, S., Roy, P.H., Jacoby, G.A., Orman, B.E., Pineiro, S., and Centrón, D. (2002). *Bla_{CTX-M-2}* is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. Antimicrob. Agents and Chemother. **46** (7): 2303-06.

- Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., Leotard, S., Page, J.M., Nordmann, P. (2001). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents and Chemother. **45** (6): 1615-20.
- Baas, L., Liebert, C.A., Lee, M.D., Summers, A.O., White, D.G., Thayer, S.G., Maurer, J.J. (1999). Incidence and characterization of integrons, genetics elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents and Chemother. **43**: 2925-9.
- Baggesen, D. L., Sandvang, D., and Aarestrup, F.M. (2000). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. J. Clin. Microbiol. **38** (4): 1581-6.
- Baldwin, T., Knutton, S., Sellers, L., Hernandez, H.A., Aitken, A., and Williams, P.H. (1992). Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile-enterotoxin antigenically related to *Escherichia coli* hemolysin. Infect. Immun. **60**: 2092-95.
- Barbolla, R., Catalano, M., Orman, B.E., Famiglietti, A., Vay, C., Smayevsky, J., Centrón, D., Pineiro, S.A. (2004). Class 1 integron increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Antimicrob. Agents and Chemother. **48** (2): 666-9.
- Barg, N. L., Register, S., Thomson, C., and Amyes, S. (1995). Sequence identity with type VIII and association with IS176 of type IIIc dihydrofolate reductase from *Shigella sonnei*. Antimicrob. Agents and Chemother. **39** (1): 112-16.
- Barker, A., Clark, C.A., Manning, P.A. (1994). Identification of VCR, a repeat sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. J. Bacteriol. **176**: 5450-8.
- Bell, B., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., et al. (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. JAMA **272** (17): 1349-53.
- Benz, I., and Schmidt, M.A. (1989). Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **57**: 1506-11.
- Bern, C. M., J., De Zoysa, I., Glass, R.I. (1992). The magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update. Bull. World Health Organ. **70**: 473-9.

- Bilge, S., Clausen, C.R., Lau, W., Moseley, S.L., (1989). Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. J. Bacteriol. **171**: 4281-9.
- Biskri, L., and Mazel, D. (2003). Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (10): 3326-31.
- Bissonnette, L., Roy, P. H. (1992). Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **174**: 1248-57.
- Black, R. (1990). Epidemiology of traveler's diarrhea and relative importance of various pathogens. Rev. Infect. Dis. **12** (Suppl.1): S73-9.
- Blaser, M. (1997). Epidemiology and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. J. Infect. Dis. **176** (Suppl 2): 103-5.
- Bogaerts, J., Verhaegen, J., Munyabikali, J.P., Mutakantaba, B., Lemmens, P., Vandeven, J., and Vandepitte, J. (1997). Antimicrobial resistance and serotypes of *Shigella* isolates in Kigali, Rwanda (1983 to 1993): Increasing frequency of multiple resistance. Diag. Microbiol. Infect. Dis. **28** (4): 165-71.
- Bonfiglio, G., Simporé, J., Pignatelli, S., Musumeci, S., Solinas, M.L. (2002). Epidemiology of bacterial resistance in gastro-intestinal-pathogens in a tropical area. Int. J. Antimicrob. Agents **20**: 387-9.
- Bottone, E. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. **10** (2): 257-76.
- Boyd, D., Cloeckert, A., Chaslus-Dancla, E., and Mulvey, M. (2002). Characterization of variant *Salmonella* genomic Island 1 multidrug resistance regions from serovars DT104 and Agona. Antimicrob. Agents and Chemother. **46** (6): 1714-22.
- Boyd, D., Geoffrey, A.P., Cloeckert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., and Mulvey, M.R. (2001). Complete nucleotide sequence of 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT104 and serovar Agona. J. Bacteriol. **183** (19): 5725-32.
- Boyd, D., Peter, G.A., Ng, L.G., and Mulvey, M.R. (2000). Partial characterization of a genomic island associated with multidrug resistance region from *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. **189**: 285-91.

- Brown, A., Rankin, S.C., Platt, D.J. (2000). Detection and characterization of integrons in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. FEMS Microbiol. Lett. **191**: 145-149.
- Cardinale, E., Colbachini, P., Perrier Gros-Claude, J.D., Gassama, A., Aïdara-Kane, A. (2001). Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 35:c:1, 2. J. Clin. Microbiol. **39** (6): 2373-4.
- Casin, I., Breuil, F., Brisabois, A., Moury, F., Grimont, F., Collatz, E. (1999). Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* Typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome-and-integron-encoded β -lactamase PSE-1. J. Infect. Dis. **179**: 1173-82.
- Centrón, D., and Roy, P.H. (2002). Presence of a group II intron in multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. Antimicrob. Agents and Chemother. **46** (5): 1402-9.
- Chang, C. Y., Chang, L.L., Chang, Y.H., Lee, T.M., and Chang, S.F. (2000). Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. J. Med. Microbiol. **49**: 1097-1102.
- Chiew, Y. F., Yeo, S.F., Hall, L.M.C., and Livermore, D. (1998). Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. **41**: 241-51.
- Chu, Y. W., Houang, E.T.B., Lyon D.J., Ling, J.M., NG, T.K., and Cheng, A.F.B. (1998). Antimicrobial resistance of *Shigella flexneri*, and *Shigella sonnei* in Hong Kong, 1986-1995. Antimicrob. Agents.Chemother. **42** (2): 440-3.
- Clark, C., Purins, L., Kaewrakon, P., Focareta, T., and Manning, PA. (2000). The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. Microbiol. **146**: 2605-12.
- Clark, C. A., Purins, L., Kaewrakon, P., Manning, P. A. (1997). VCR repetitive sequence elements in the *Vibrio cholerae* chromosome constitute a mega-integron. Mol. Microbiol. **26**: 1137-43.
- Clark, N., Olsvik, O., Swensen, J.M., Spiegel, C.A., Tenover, F.C. (1999). Detection of a streptomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents and Chemother. **43** (1): 157-60.
- Cloackert, A., Boumedine, S.K., Flaujac, G., Imberechts, H., D'Hooghe, I., Chaslus-Dancla, E. (2000). Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including *floR* gene in *Salmonella enterica* serovar Agona. Antimicrob. Agents and Chemother. **44** (5): 1359-61.

- Coimbra, R. S., Lenormand, P., Grimont, F., Bouvet, P., Matsushita, S., and Grimont P.A.D. (2001). Molecular and phenotypic characterization of potentially new *Shigella dysenteriae* serotype. J. Clin. Microbiol. **39** (2): 618-21.
- Collis, C., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H.W., Hall, R.M. (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. Mol. Microbiol. **9**: 41-52.
- Collis, C. M., and Hall, R.M. (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. Mol. Microbiol. **6**: 2875-85.
- Collis, C. M., and Hall, R.M. (1992). Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by integron DNA integrase. J. Bacteriol. **174**: 1574-85.
- Collis, C. M., Kim M.J., Stokes H.W., R.M. Hall (1998). Binding of the purified integron DNA integrase IntI to integron-and cassette-associated recombination sites. Mol. Microbiol. **29** (2): 477-90.
- Collis, C. M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Stokes, H.W., and Hall, R.M. (2002). Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. J. Bacteriol. **184** (11): 3017-26.
- Collis, C. M., R.M. Hall (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob. Agents and Chemother. **39**: 155-62.
- Coppo, A., Colombo, M., Pazzani, C., Bruni, R., Mohamud, K.A., Omar, K.H., Mastrandrea, S., Salvia, A.M., Rotigliano, G., and Maimone, F. (1995). *Vibrio cholerae* in the Horn of Africa: epidemiology, plasmids, tetracycline resistance gene amplification, and comparison between O1 and non-O1 strains. Am. J. Trop. Med. Hyg. **53** (4): 351-9.
- Corneles, G., Landre, Y., Balligant, G., Sory, M.P., Wanters, G. (1987). *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. Rev. Infect. Dis. **9**: 69-87.
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., Mendo, S., and Duarte, A. (2003). Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (9): 2838-43.
- Cravioto, A., Reyes, R.E., and Ortega, R. (1988). Prospective study of diarrheal disease in a cohort of rural mexican children : incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidemiol. Rev. **101**: 123.
- Crump, J. A., Luby, S.P., and Mintz, E.D. (2004). The global burden of typhoid fever. Bull. World Health Organ. **82** (5): 346-53.
- Dalsgaard, A., Forslund, A., Petersen, A., Brown, D.J., Dias, F., Monteiro, S., Molbak, K., Aaby, P., Rodrigues, A., and Sandström, A. (2000). Class 1 integron-borne, multiple antibiotic resistance encoded by a 150-kilobase conjugative plasmid in epidemic

- Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Guinea-Bissau. J. Clin. Microbiol. **38**(10): 3774-9.
- Dalsgaard, A., Forslund, A., Sandvang, D., Arntzen, L., and Keddy, K. (2001). *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiply drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene, located on class 1 integrons. J. Antimicrob. Chemother **48**: 827-38.
- Dalsgaard, A., Forslund, A., Serichantalergs, O., and Sandvang, D. (2000). Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. Antimicrob. Agents and Chemother. **44** (5): 1315-21.
- De la Cruz, F., Grinsted, J. (1982). Genetic and molecular characterization of Tn21, a multiple resistance transposon from R-100-1. J. Bacteriol. **151**: 222-8.
- DeLappe, N., O'Halloran, Fanning, S., Corbett-Feeney, G., Cheasty, T., and Cormican, M. (2003). Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from western Ireland, an area of low incidence of infection. J. Clin. Microbiol. **41** (5): 1919-24.
- Di Conza, J., Ayala, J., Power, P., Mollerach, M., and Gutkind, G. (2002). Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar Infantis. Antimicrob. Agents and Chemother. **46** (7): 2257-61.
- Diallo, A., Diop, M.B., Guèye, M.M., Etard, J.F. (2001). Investigation d'une épidémie de shigellose en zone rurale au Sénégal. Cahiers Santé **11**: 217-9.
- Doublet, B., Butaye, P., Imberechts, H., Chaslus-Dancla, E., Cloeckaert, A. (2004). *Salmonella* Agona harboring genomic Island 1-A. Emerg. Infect. Dis. **10** (4): 756-8.
- Doublet, B., Lailler, R., Meunier, D., Brisabois, A., Boyd, D., Mulvey, M.R., Chaslus-Dancla, E., Cloeckaert, A. (2003). Variant *Salmonella* genomic Island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. Emerg. Infect. Dis. **9** (5): 585-591.
- Dubois, V., Arpin, C., Quentin, C., Poirel, L., Nordmann, P. (2003). Decreased susceptibility to cefepime in a clinical strain of *Escherichia coli* related to plasmid- and integron-encoded OXA-30 β -lactamase. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (7): 2380-1.
- Dupont, H., and Ericsson, C.D. (1993). Prevention and treatment of traveler's diarrhea. N. Engl. J. Med. **328**: 1821-7.
- Dutta, S., Dutta, D., Dutta, P., Matsushita, S., Bhattacharya, SK., and Yoshida, S. (2003). *Shigella dysenteriae* serotype 1, Kolkata, India. Emerg. Infect. Dis. **9** (11): 1471-4.

- Engberg, J., Aarestrup, M., Taylor, D. E., Smidt-Gerner, P., Nachamkin, I. (2001). Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg. Infect. Dis. **7** (1): 24-34.
- Flores, C., Qadri, M. I., Lichtenstein, C. (1990). DNA sequence analysis of five genes: *tnsA, B, C, D* and *E*, required for transposition. Nucleic Acids Res. **18**: 901-11.
- Francia, M., Avila, P., De la Cruz, F., Garcia Lobo, J.M. (1997). A hot spot in plasmid F for site-specific recombination mediated by Tn21 integron integrase. J. Bacteriol. **179**: 4419-25.
- Francia, M., De la Cruz, F., Garcia Lobo, J.M. (1993). Secondary sites for integration mediated by Tn21 integrase. Mol. Microbiol. **10**: 823-8.
- Frost, J., Willshaw, G.A., Rowe, B., Lemmens, P., Vandepitte, J. (1985). Plasmid characterization of drug-resistant *Shigella dysenteriae* 1 from an epidemic in Central Africa. J. Hyg.(Lon). **94** (2): 163-72.
- Gassama, A., Boye, C.S., Aïdara-Kane, A., Raphenon, G., Samb, A., MBoup, S. (1997). *Shigella* au Sénégal (1993-1994): distribution par sérovar, sensibilité aux antibiotiques et virulence. Méd. Mal. Infect. **27**: 267-70.
- Gebreyes, W. A., Thakur, S., Davies, P.R., Funk, J.A., Altier, C. (2004). Trends in antimicrobial resistance, phages types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. J. Antimicrob. Chemother. **53**: 997-1003.
- Germani, Y., Minssart, P., Vohito, M., Yassibanda, S., Glaziou, P., Hocquet, D., Berthélémy, P., and Morvan, J. (1998). Etiologies of acute, persistent, and dysenteric diarrheas in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. Am. Trop. Med. Hyg. **59** (6): 1008-14.
- Ghosh, A., Kar, A.K., Kundu, M. (1998). Alterations in high molecular mass penicillin-binding protein 1 associated with beta-lactam resistance in *Shigella dysenteriae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **248**: 669-72.
- Goldstein, F., Gerbaud, G., Courvalin, P. (1986). Transposable resistance to trimethoprim and O/129 in *Vibrio cholerae*. J. Antimicrob. Chemother. **17**: 559-69.
- Gomes, T., Rassi, V., Macdonald, K.L., Ramos, S.R.T.S., Trabulsi, L.R., Vieira, M.A.M., Guth, B.E.C., Candeias, J.A.N., Ivey, C., Toledo, M.R.F., Blake, P.A. (1991). Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. J. Infect. Dis. **164**:331-7.

- Gonzales, G., Sossa, K., Bello, H., Mella, S., Zemelman, R (1998). Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. FEMS Microbiol. Lett. **161**: 125-8.
- Grape, M., Sundstrom, L., Kronvall, G. (2003). New *dfr* gene as a single -gene cassette in a class 1 integron from a trimethoprim-resistant *Escherichia coli* isolate. Microb. Drug Resist. **9** (4): 317-22.
- Gribeel, A., Sköld, O. (1998). High-level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (*dfrI*, and *dfr9*) expressing drug-intensive dihydrofolate reductases. Antimicrob. Agents and Chemother. **42** (12): 3059-64.
- Guerineau, F., Brooks, L., Millinaux, P. (1990). Expression of sulfonamide resistance gene from plasmid R46. Plasmid **23**: 35-41.
- Guerra, B., Soto, S.M., Argüelles, J., and Mendoza, C. (2001). Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. Antimicrob. Agents and Chemother. **45** (4): 1305-8.
- Hall, R. M., Brookes, D.E., Stokes, H W. (1991). Site-specific insertion genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. Mol. Microbiol. **5**: 1941-59.
- Hall, R. M., Brown, H.J., Brookes, D.E., Stokes H.W. (1994). Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. J. Bacteriol. **176**: 6286-94.
- Hall, R. M., Collis, CM. (1998). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria: the role of gene cassette and integrons. Drug. Resist. updates **1**: 109-19.
- Hall, R. M., Collis, CM., Kim, M.J., Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes H.W. (1999). Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Ann. N. Y. Acad. Sci. **18**: 68-80.
- Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Casin, I., Collatz, E. (2002). An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. Mol. Microbiol. **44** (1): 119-30.
- Hansson, K., Sköld, O., Sundström, L. (1997). Non-palindromic *attI* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. Mol. Microbiol. **26**: 441-53.
- Hansson, K., Sunström, L., Pelletier A., and Roy P. H. (2002). Int2 integron integrase in Tn7. J. Bacteriol. **184** (6): 1712-1721.
- Henderson, I., Czczulin, J., Eslava,C., Noriega, F., and Nataro, J.P. (1999). Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. **67** (11): 5587-96.

- Hochhut, B., Lofti, Y., Mazel, D., Faruque, S.M., Woodgate, R., and Waldor, M.K (2001). Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O:139 and O1 SXT constins. Antimicrob. Agents and Chemother. **45** (11): 2991-3000.
- Hoge, C. W., Gambel, J.M., Srijan, A., Pitarangski, C., Echeverria, P. (1998). Trends in antibiotic resistance among diarrheal pathogens isolated in Thailand over 15 years. Clin. Infect. Dis. **26** (2): 341-5.
- Hoque, S., Faruque, A.S., Mahalanabis, D., and Hasnat, A. (1994). Infectious agents causing acute watery diarrhea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications. J. Trop. Pediatr. **40**: 351-4.
- Houang, E., Chu, Y.W., Lo, W.S., Chu, K.Y., Cheng, A.F. (2003). Epidemiology of rifampicin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo-beta-lactamase (*bla_{IMP-4}*) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (4): 1382-90.
- Iversen, J., Sandvang, D., Srijan, A., Cam, P.D., Dalsgaard, A. (2003). Characterization of antimicrobial resistance, plasmids, and gene cassettes in *Shigella spp* from patients in Vietnam. Microb. Drug Resist. **9** (1): 17-24.
- Iwalokun, B.A., Gbenle, G.O., Smith, S.I., Ogunledun, A., Akinsinde, K.A., and Omonigbehin, E.A. (2001). Epidemiology of shigellosis in Lagos, Nigeria: Trends in antimicrobial resistance. J. Health. Popul. Nutr. **19** (3): 183-90.
- Jones, M.E., Peters, E., Weersink, A.M., Fluit, A., Verhoef, J. (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. Lancet **349**: 1742-3.
- Kariuki, S., Revathi, G., Muyodi, J., Mwituria, J., Munyalo, A., Mirza, S., and Hart, C.A. (2004). Characterization of multidrug-resistant typhoid outbreaks in Kenya. J. Clin. Microbiol. **42** (4): 1477-82.
- Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Arai, T. (1998). Distribution of the antiseptic resistance genes *qacE* and *qacEΔ1* in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **159**: 173-8.
- Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Arai, T. (1998). Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in Gram- positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **165**: 295-9.
- Keush, G. T. (1998). Shigellosis. Infect. Dis. **2nd Edition**: 694-8.
- Kimura, C. A., Johnson, K., Palumbo, M.S., Hopkins, J., Boase, J.C., Reporter, R., Goldoft, M., Stefonek, K.R., Farrar, J.A., Van Gilder, T.J., and Vugia, D.C. (2004). Multistate outbreak and commercially prepared food, United States. Emerg. Infect. Dis. **10** (6): 1147-9.

- Kosek, M., Bern, C., Guerrant, R.L. (2003). The global burden of diarrheal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull. World Health Organ. **81** (3): 197-204.
- Kotler, D., Giang, T.T., Thiim, M., Nataro, J.P., Sordillo, E.M., and Orenstein, J.M. (1995). Chronic bacterial enteropathy in patients with AIDS. J. Infect. Dis. **171**: 552-8.
- Kotloff, K., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., Adak, J.K., Levine, M.M. (1999). Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull. World Health Organ. **77** (8): 651-66.
- Lee, M. D., Sanchez, S., Zimmer, M., Idris, U., Berrang, M.E., and McDermott, P.F. (2002). Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken house environment. Antimicrob. Agents and Chemother. **46** (11): 3660-4.
- Levesque, C., Brassard, S., Lapointe, J., Roy, P.H. (1994). Diversity and relative strength of tandem promoters of the antibiotic-resistance genes of several integrons. Gene **142**: 49-54.
- Levesque, C., Larose, C., Roy, P.H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents and Chemother. **39** (1): 185-91.
- Levine, M., Ferreccio, C., Prado, V., Cayazzo, M., Abrego, P., Martinez, J., Maggi, L., Baldini, M.M., Martin, W., Maneval, D., Kay, B., Guers, L., Lior, H., Wasserman, S.S., and Nataro, J.P. (1993). Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrhea infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am. J. Epidemiol. **138**: 849-69.
- Liebert, C. A., Hall, R.M., and Summers, A.O. (1999). Transposon Tn21, flagship of floating genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63** (3): 507-22.
- Lima, A. A. M., Lima, V.L., Pinho, M.C., Barros, E.A., Teixeira, M.J., Martines, M.C.V., and Guerrant, R.L. (1995). High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, chloramphenicol, and tetracycline, isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988-1993. Antimicrob. Agents.Chemother. **39** (1): 256-9.
- Ling, J. M., Shaw, P. C., Kam, K. M., Cheng, A. F., and French, G.L. (1993). Molecular study of plasmids of multiply- resistant *Shigella spp* in Hong Kong. Epidemiol. Infect. **110**: 437-446.

- Lucey, B., Crowley, D., Moloney, P., Cryan, B., Daly, M., O'Halloran, F., Threfall, E. J., and Fanning, S. (2000). Integronlike structured in *Campylobacter spp.* of human and animal origin. Emerg. Infect. Dis. **6** (1): 50-54.
- Malengreau, M. (1984). Nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* outbreaks. Lancet **2**: 172.
- Martin, C., Timm, J., Rauzier, J, Gomez-Lus, R., Davies, J., Gicquel B. (1990). Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. Nature **345**: 739-43.
- Martinez, E., De la Cruz, F. (1990). Genetics elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. EMBO **9**: 1275-81.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Verhoef, J., Jones, M.E. (1999). Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. Antimicrob. Agents and Chemother. **43** (3): 686-9.
- Martinez-Freijo P., F. A. C., Schmitz F.J., Grek V. S. C., Verhoef J., Jones M.E. (1998). Class 1 integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. J. Antimicrob. Chemother. **42**: 689-696.
- Mathewson, J., Oberhelman, R.A., Dupont, H.L., De la Cabada, J.F., and Garibay, E.V. (1987). Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. J. Clin. Microbiol. **25** (10): 1917-9.
- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., and Harel, J. (2003). Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23 year period from pigs. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (10): 3214-21.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., and Davies, J. (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. Science **280**: 605-608.
- McIver, J. C., White, P. A., Jones, L. A., Karagiannis, T., Harkness, J., Marriott, D., Rawlinson, W. (2002). Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. J. Clin. Microbiol. **40** (4): 1538-40.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., and Helmuth, R. (2003). Multiple-drug resistance in D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates from poultry is mediated by class 2 integrons inserted into the bacterial chromosome. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (11): 3640-3.

- Mills-Robertson, F., Addy, M.E., Mensah, P., and Crupper, S.S. (2002). Molecular characterization of antibiotic resistance in clinical *Salmonella* Typhi isolated in Ghana. FEMS Microbiol. Lett. **215** (2): 249-253.
- Mirza, S., Beeching, N.J., Hart, C.A. (1996). Multi-drug resistant typhoid: a global problem. J. Med. Microbiol. **44**: 317-9.
- Munoz, J., Bello, H., Dominguez, M., Mella, S., Zemelman, R., Gonzalez, G. (2003). Integrons and antimicrobial resistance in *Shigella flexneri* strains. Rev. Med Chil. **131** (7): 727-33.
- Mwachari, C., Batchelor, B.I.F., Paul, J., Waiyaki, P.G., and Gilks, C.F. (1998). Chronic diarrhea among HIV-infected adult patients in Nairobi, Kenya. J. Infect. **37**: 48-53.
- Naas, T., and Nordmann, P. (2002). OXA-type β -lactamases. Curr. Pharm. Des. **5** (11): 865-79.
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2001). Characterization of In53, a class 1 plasmid-and composite transposon located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. J. Bacteriol. **183** (1): 235-49.
- Naas, T., Sougakoff, V., Casetta, A., and Nordmann, P. (1998). Molecular characterization of OXA-20, a novel class D β -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents and Chemother. **42** (8): 2074-83.
- Nachamkin, I., Allos, B.M., Ho, T. (1998). *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **11**: 555-67.
- Nadjar, D., Labia, R., Cerceau, C., Bizet, C., Phillipon, A., and Arlet, G. (2001). Molecular characterization of chromosomal class C β -lactamase, and its regulatory gene in *Ochrobactrum anthropi*. Antimicrob. Agents and Chemother. **45** (8): 2324-30.
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., and Summers, A.O. (2004). Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101** (18): 7118-22.
- Nataro, J. P., Kaper, J.B. (1998). Diarrhegenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. **11** (1): 142-201.
- Navarro-Garcia, F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A., Nataro, J.P. (1999). Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. **67** (5): 2184-92.
- Navia, M. M., Capitano, L., Ruiz, J., Vargas, M., Urassa, H., Schelleberg, D., Gascon, J., and Vila, J. (1999). Typing and characterization of mechanisms of resistance of

- Shigella spp.* isolates from faeces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. J. Clin. Microbiol. **37**: 3113-7.
- Navia, M. M., Ruiz, J., Vila, J. (2004). Molecular characterization of integrons in *Shigella* isolated from patients with traveler's diarrhea. Diag. Microbiol. Infect. Dis. **48** (3): 175-9.
- Nesvera, J., Hochmannova, J., Patek, M. (1998). An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. **169**: 391-5.
- Obi, C. L., Coker, A.O., Epoke, J., Ndip, R.N. (1997). Enteric bacterial pathogens in stools of residents of urban and rural regions in Nigeria: a comparison of patients with and without diarrhoea and controls without diarrhoea. J. Diarrhoeal Dis. Res. **15**(4): 241-7.
- Oh, J. Y., Yu, H.S., Kim, S.K., Seol, S.Y., Cho, D.T., and Lee, J.C. (2003). Changes patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic period. J. Clin. Microbiol. **41** (1): 421-3.
- Ojo, K. K., Waturangi, D. E., Odelola, H. A., Suwanto, A., and Schwarz, S. (2002). Identification of a cassette-borne *dfrA7*-like gene that shows a 97 bp extension at the 3'- end of the reading frame. J. Antimicrob. Chemother. **49**: 573-84.
- Okeke, I., Steinrück, H., Kanack, J. K., Elliott, J. S., Sunström, L., Kaper, J. B., and Lamikanra, A. (2002). Antibiotic-resistant cell-detaching *Escherichia coli* strains from Nigerian children. J. Clin. Microbiol. **40** (1): 301-305.
- OMS, W. H. O. (1999). WHO report on infectious diseases. Removing obstacles to healthy development. www.who.int/infectious-diseases-report/index.html.
- OMS, W. H. O. (2002). Cholera 2001. Weekly epidemiological record **77** (31): 257-68.
- Pai, H., Byeon, J.H., Yu, S., Lee, B.K., Kim, S. (2003). *Salmonella enterica* serovar Typhi strains isolated in Korea containing a multidrug resistance class 1 integron. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (6): 2006-8.
- Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., Altwegg, M. (1995). Typhoid fever and others salmonellosis: a continuing challenge. Trends Microbiol. **3**: 253-5.
- Petermann, S., Sherwood, J., Nolan, L.K., White, D.G. (1999). Characterization of integron mediated multiple antimicrobial resistance among bovine diarrheagenic *Escherichia coli* isolates. Abstract A-28.99th General Meeting of American Society for Microbiology.

- Peters, E. D. J., Leverstein-van Hall, Box, A. T. A., Verhoef, J., and Fluit, C. A. (2001). Novel gene cassettes and integrons. Antimicrob. Agents and Chemother. **45** (10): 2961-64.
- Petersen, A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Olsen, J.E. (2000). Class 1 integrons containing a *dhfrI* trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp. FEMS Microbiol. Lett. **182**: 73-6.
- Piddock, L. (1998). Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. Brit. Med. Jour. **317**: 1029-30.
- Piva, I., Prereira A.L., Ferraz, L.R., Silva, R.S.N.,Vieira, A.C., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., and Giugliano, L. (2003). Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. J. Clin. Microbiol. **41** (5): 1827-32.
- Plante, I., Centrón, D., Roy, P.H. (2003). An integron cassette encoding erythromycin esterase, *ere (A)*, from *Providencia stuartii*. J. Antimicrob. Chemother. **51**: 787-90.
- Ploy, M., Chainier, D., Nhu Hoa Tran Thi, Poilane, I., Cruaud, P., Denis, F., Collignon, A., and Lambert T. (2003). Integron-associated antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi from Asia. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (4): 1427-29.
- Ploy, M., Denis, F., Courvalin, P., and Lambert, T. (2000). Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: Description of a hybrid class 2 integron. Antimicrob. Agents Chemother. **44** (10): 2684-2688.
- Ploy, M. C., Denis F., Courvalin P., and Lambert T. (1998). Characterization of In0 of *Enterobacter aerogenes* BM2688 a class 1 integron with two new cassettes, *cmlA2*, and *qacF*. Antimicrob. Agents and Chemother. **42** (10): 2557-63.
- Ploy, M. C., Gassama, A. Denis, F., Courvalin, P., and Lambert, T. (2000). Characterization of a defective integron in clinical strains of *Corynebacterium striatum*." Poster N° C1-1152. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., and Nordmann, P. (2000). Biochemical sequence sequence analysis of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents and Chemother. **44** (3): 622-32.
- Poirel, L., Weldhagen, G.F., De Champs, C., and Nordmann, P. (2002). A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. J. Antimicrob. Chemother. **49**: 561-5.

- Randall, L., Cooles, S;W., Osborn, M;K., Piddock, L.J., Woodward, M.J. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in UK. J. Antimicrob. Chemother. **53** (2): 208-16.
- Rankin, S., Aceto, H., Cassidy, J., Holt, J., Young, S., Love, B., Tewari, D., Munro, D.S., and Benson, C.E. (2002). Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. J. Clin. Microbiol. **40** (12): 4679-84.
- Rankin, S., Coyne, M.J. (1998). Multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. Lancet **351**: 1740.
- Recchia, G. D., and Hall, R.M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiol. **141**: 3015-27.
- Recchia, G. D., and Hall, R.M. (1995). Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the incQ plasmid RSF 1010. Mol. Microbiol. **15** (1): 179-87.
- Recchia, G. D., and Hall, R.M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends Microbiol. **5**: 389-94.
- Recchia, G. D., Stokes, H. W., Hall, R. M. (1994). Characterization of specific and secondary sites recognized by the integron DNA integrase. Nucleic Acids Res. **22**: 2071-78.
- Roe, M., Byrd, J.A., Smith, D.P., and Pillai, S.D. (2003). Class 1 and class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. J. Food Prot. **66** (8): 1426-31.
- Roe, M., Vega, E., and Pillai, S.D. (2003). Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. Emerg. Infect. Dis. **9** (7): 822-6.
- Rosser, S., Young, H.K. (1999). Identification and characterization of class1 integrons in bacteria from an aquatic environment. J. Antimicrob. Chemother. **44**: 11-8.
- Rowe-Magnus, D., Guerout, A.M., Mazel, D. (1999). Super-integrons. Res. Microbiol. **150** (9-10): 641-51.
- Rowe-Magnus, D., Mazel, D. (1999). Resistance gene capture. Curr. Opin. Microbiol. **2**: 483-8.
- Rowe-Magnus DA., G. A., Ploncard P., Dychinco B., Davies J., and Mazel D. (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2): 652-657.

- Rowe-Magnus DA., M. D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. Int. J. Med. Microbiol. **292** (2): 115-25.
- Roy, P. H. (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. Médecine Sciences **13**: 927-33.
- Ruiz, J., Goni, P., Marco, F., Gallardo, F., Mirelis, B., Jimenez DE Anta, T., Vila, J. (1998). Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: a genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistan clinical isolates. Microbiol. Immun. **42**: 223-6.
- Sabtcheva, S., Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T. (2003). The *ant (4')-IIb* gene of *Pseudomonas aeruginosa* BM4492 is part of a multiple antibiotic resistance gene cluster homologous to the genomic Island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Abstract C1-1181. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial and Chemotherapy.
- Sack, A. D., Lyke, C., Mc Laughlin, C., and Swanvanichkij, V. (2001). Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. WHO CDS/CRS/DRS: 21-30.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenes, S., Mabilat, C. (1995). Molecular epidemiology of integron associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Microb. Drug Resist. **1**: 195-202.
- Sandvang, D. Aerestrup, F.M., Jensen, L.B. (1997). Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. **157**: 177-81.
- Scaletsky, I., Fabbriotti, S.H., Silva, S.O.C., Morais, M.B., and Fagundes-Neto, U. (2002). Hep-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. Emerg. Infect. Dis. **8** (8): 855-8.
- Schmidt, F. R., Nucken, E.J., and Henschke, R.B. (1988). Nucleotide sequence analysis of 2"-aminoglycoside nucleotidyl-transferase ANT(2") from Tn 4000: its relationship with AAD (3') and impact on Tn 21 evolution. Mol. Microbiol. **2** (6): 709-17.
- Schultz, C., Ende, J.V.D., Cobelens, F., Vervoort, T., Gompel, A.V., Wetsteyn, J.C.F.M., and Dankert, J. (2000). Diarrhegenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. J. Clin. Microbiol. **38** (10): 3550-4.
- Schumacher, H., Nir, M., Mansa, B., Grassy, A.(1992). β -lactamases in *Shigella*. APMIS **100**: 954-6.
- Scott, D. A., Kaper, J.B. (1994). Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. Infect. Immun. **62**: 242-51.

- Shapiro, R., Kumar, L., Phillips-Howard, P., Wells, J.G., Adcock, P., Brooks, J., Ackers, M.L., Ochieng, J.B., Mintz, E., Wahlquist, S., Waiyaki, P., and Slutsker, L. (2001). Antimicrobial-resistant bacterial diarrhea in rural western Kenya. J. Infect. Dis. **183** (1): 1701-4.
- Siu, K., Lo, J.Y.C., Yuen, K.Y., Chau, P.Y., NG, M.H., Ho, P.L. (2000). β -lactamases in *Shigella flexneri* isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like β -lactamase, OXA-30. Antimicrob. Agents and Chemother. **44** (8): 2034-8.
- Skirrow, M. (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. J. Comp. Pathol. **111**: 113-49.
- Soto, S., Gonzalez-Hevia, M.A., Mendoza, M.C. (2003). Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. J. Antimicrob. Chemother. **51** (5): 1287-91.
- Soto, S., Lobato, M.J., Mendoza, M.C. (2003). Class 1 integron-borne gene cassettes in multidrug-resistant *Yersinia enterocolitica* strains different phenotypic and genetic types. Antimicrob. Agents and Chemother. **47** (1): 421-5.
- Speed, B., Kaldor, J., Cavanagh, P. (1984). Guillain-Barré syndrome associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. J. Infect. **8**: 85-6.
- Stokes, H., Hall, R.M. (1989). A novel family of potential mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol. Microbiol. **3**: 1669-83.
- Stokes, H., O'Gorman, D.B., Recchia, G.D., Parsekhian, M., Hall, R.M. (1997). Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. Mol. Microbiol. **26**: 731-45.
- Stokes, H. W., Holmes, J. M., Nield, B., Holley, M. P., Helena Nevalainen, K. M., Mabbutt, B.C., Gillings, M. R. (2001). Gene cassette PCR: Sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. Appl. Environ. Microbiol. **67** (11): 5240-6.
- Stokes, H. W., Tomaras, C., Parsons, Y. Hall R. M. (1993). The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. Plasmid **30**: 39-50.
- Sunde, M., Sorum, H. (1999). Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. Microb. Drug Resist. **5** (4): 279-87.
- Sundström, L., Radström, P., Swedberg, G., Sköld, O (1988). Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim and sulfonamide resistance genes. Sequence

- characterization of *dhfrV* and *sull* and a recombination active locus of Tn 21. Mol. Gen. Genet. **213**: 191-201.
- Sundström, L., Roy, P., Sköld, O. (1991). Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. J. Bacteriol. **173**: 3025-8.
- Talukder, K., Dutta, D.K., Safa, A., Ansaruzzaman, M., Hassan, F., Alam, K., Islam, K.M.N., Carlin, N.I.A., Nair, G.B., and Sack, D.A. (2001). Altering trends in the dominance of *Shigella flexneri* serotypes and emergence of serologically atypical *S. flexneri* strains in Dhaka, Bangladesh. J. Clin. Microbiol. **39** (10): 3757-9.
- Taylor, D.E., De Grandis, S.A, Karmali, M.A., Fleming, P.C. (1981). Transmissible plasmid from *Campylobacter jejuni*. Antimicrob. Agents and Chemother. **19** (5) : 831-5.
- Taylor, D.E. (1992). *Campylobacter jejuni*- current status and future trends. In Nachamkin, I. Blaser, M.J., Tompkins L.S., editors American Society for Microbiology, Washington (74-86).
- Tennigkeit, J., Matzura, H. (1999). Nucleotide sequence analysis of a chloramphenicol-resistance determinant from *Agrobacterium tumefaciens* and identification of its gene product. Gene **98**: 113-6.
- Tenover, F. C., Williams, S., Gordon, K.P., Nolan, C., Plorde, J.J. (1985). Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob. Agents and Chemother. **27** (1) : 37-41.
- Threlfall, E. J., and Ward, L.R. (2001). Decreased susceptibility to ciprofloxacin *Salmonella enterica* serotype Typhi in U.K. Emerg. Infect. Dis. **7** (3): 448-50.
- Thungapathra, M., Amita, Sinha, K.K., Chaudhuri, S.R., Garg, P., Ramamurthy, T., Nair, G.B., Ghosh, A. (2002). Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac(6')-Ib*, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class1 integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. Antimicrob. Agents and Chemother. **46**: 2948-55.
- Tomalsky, M., Crosa, J.H. (1993). Genetic organization of antibiotic resistance genes (*aac(6')-Ib*, *aadA*, and *oxa9*) in multiresistance transposon Tn1331. Plasmid **29**: 31-40.
- Tornieporth, N., John, J., Salgado, K., De Jesus, P., Latham, E., Melo, M.C.N., Gunzburg, S.T., and Riley, L.W. (1995). Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. J. Clin. Microbiol. **3** (5): 1371-4.
- Tosini, F., Visca, P., Luzzi, I., Dionisi, A.M., Pezzella, C., Petrucca, A., Carattoli, A. (1998). Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by InL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Antimicrob. Agents and Chemother. **42** (12): 3053-8.

- Tribuddharat, C., Fennewald, M. (1999). Integron-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents and Chemother. **43** (4): 960-2.
- Valentine, C. R., Heinrich, M. J., Chissoe, S. L., Roe, B. A. (1994). DNA sequence of direct repeats of the *sull* gene of plasmid pSa. Plasmid **32** (2): 222-7.
- Verdet, C., Arlet, G., Barnaud, P.H., Lagrange, P.H., and Philippon, A. (2000). A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*_{DHA-1} gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. Antimicrob. Agents and Chemother. **44**: 222-5.
- Vila, J., Gascon, J., Abdalla, S., Gomez, F., Marco, F., Moreno, A., Corachan, M., and De Anta, T. J. (1994). Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates causing traveler's diarrhea. Antimicrob. Agents.Chemother. **3** (11): 2668-70.
- Waldor, M., Tschäpe, H., Mekalanos, J.J. (1996). A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O:139. J. Bacteriol. **178** (14): 4157-65.
- Watanabe, T. (1963). Infectious heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. **27**: 87-115.
- White, P., McIver J., Rawlinson D. (2001). Integrons and genes cassettes in the Enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother. **45** (9): 2658-2661.
- White, P., Stokes, H.W., Bunny, K.L., Hall, R.M. (1999). Characterization of a chloramphenicol acetyltransferase determinant found in the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters **175** (1): 27-35.
- White, P. A., and Rawlinson, W. D., (2001). Current status of the *aad* and *dfr* gene cassette families. J. Antimicrob. Chemother. **47**: 495-502.
- White, P. A., McIver, C.J., Deng, Y.M., Rawlinson, W.D. (2000). Characterization of two new cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. FEMS Microbiol. Lett. **182**: 265-9.
- Witte, W. (2000). Selective pressure by antibiotic use in livestock. Int. J. Antimicrob. Agents **16**: S19-S24.
- Young, H., Qumsieh, M.J., McIntosh, M.L. (1994). Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim- resistance, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase. J. Antimicrob. Chemother. **34**: 715-25.
- Yu, H., Lee, J.C., Kang, H.Y., Ro, D.W., Chung, J.Y., Jeong, Y.S., Tae, S.H., Choi, C.H., Lee, E.Y., Seol, S.Y., Lee, Y.C., and Cho, D.T. (2003). Changes in genes cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. J. Clin. Microbiol. **41**(12): 5429-33.

Zhao, S., White, D., G., Ge, B., Ayers, S., Friedman, S., English, L., Wagner, D., Gaines, S., Meng, J. (2001). Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. Appl. Environ. Microbiol. **67** (4): 1558-64.