

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	3
I-Généralités sur les <i>Shigella</i>	4
I-1-Classification des <i>shigelles</i>	4
I-2-Caractères bactériologiques.....	5
I-3- Caractères culturels.....	5
I-4-Pouvoir pathogène.....	6
I-5-Epidémiologie.....	7
I-6-Situation actuelle des <i>Shigella</i> au Sénégal.....	7
I-7-Tendance des résistances observées chez les souches de <i>Shigella sonnei</i> au Sénégal.....	8
II/ Résistance bactérienne	9
II-1-Les types de résistances.....	9
II-2-La dissémination de la résistance.....	10
II-2-1-Les plasmides.....	10
II-2-1-1-Mécanisme de la dissémination des plasmides	12
II-2-2-Les transposons.....	13
II-2-3-Les intégrons.....	15
II-2-3-1-Structure des intégrons.....	16
II-2-3-2-Structure des cassettes.....	17
II-2-3-3-Mouvement des cassettes.....	18
II-2-3-4-Expression des cassettes.....	19
II-2-3-5-Les intégrons de classe 1.....	19
II-2-3-6-Les intégrons de classe 2.....	20
II-2-3-7-Les intégrons de classe 3.....	22
II-2-3-8-Les intégrons de classe 4.....	25
II-2-3-9-Origine des intégrons.....	26

TRAVAIL PERSONNEL.....	28
III- MATERIELS ET METHODES.....	29
III-1- MATERIELS.....	29
III-2- METHODES.....	29
III-2-1-Technique de l'antibiogramme.....	29
III-2-2-Extraction de l'ADN par la thermolyse.....	29
III-2-3-RAPD.....	30
III-2-4-Détection des intégrons.....	30
IV- RESULTATS.....	32
IV-1-Phénotypes de résistance.....	32
IV-2- RAPD.....	33
IV-3-Détection des intégrons.....	34
V- ANALYSE-INTERPRETATION DES RESULTATS.....	36
V-1-Analyse des antibiogrammes.....	36
V-2-Typage moléculaire.....	36
V-3-Détection des intégrons.....	37
V-4-Characterisation des intégrons.....	38
CONCLUSION.....	40
RESUME.....	42
ANNEXE.....	43
BIBLIOGRAPHIE.....	52

Louange à ALLAH l'unique sans associé que la paix et la bénédiction soient sur le prophète Mouhamad

Je dédie ce travail :

A mon regretté père Thiérno Boubacar Diallo dont l'éducation exemplaire, l'initiation aux épreuves de la vie m'ont permis d'affronter toutes sortes de situations. Qu'ALLAH t'accueille dans son paradis. Amin.

A ma très chère maman Aïssatou Ba qui a accepté de tout supporter pour ma réussite dans mes projets. Une mère d'encre ne suffit pas pour te remercier. Qu'ALLAH soit satisfait de toi.

A mes grands frères Ibrahima et Sérigne Moustapha Diallo dont l'effort et l'exemple m'ont servi de référence. Recevez la bénédiction du tout Puissant.

A mes petits frères et sœurs Thiérno Alsaini, Chérif Alassane, Ahmad Tidiane et Mouminatou Diallo. Recevez mes remerciements et mes encouragements.

A mon oncle et ami Abdoulaye Kane et à sa femme Fatou Kane qui ont tout fait pour que je réussisse. Je ne vous oublierai jamais.

A mon oncle Thierno Saliou Diallo et sa famille qui ont accepté de vivre avec moi à Dakar.

A mon oncle Mamadou Kane et à ma tante Astou Kane son épouse de m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles. Ce travail est le votre.

A mon papa Doudou Ndaw et famille, et à mon oncle Mountaga Diallo dont les affections m'ont toujours encouragé.

A tous et à toutes mes ami(e)s et frères qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement :

-Monsieur le Professeur François Simon de m'avoir accepté dans ce temple de la recherche

-le Professeur Abdoulaye Samb de nous avoir honoré en présidant ce jury

-Le Professeur Yaye Kène Gassama DIA, votre accessibilité, votre sympathie votre sens de l'écoute des autres a fini de vous distinguer comme défenseur de la réussite de la jeunesse estudiantine de la faculté des Sciences et Techniques. Soyez en remerciée.

-Madame Le Docteur Amy Gassama SOW, vos hautes qualités humaines, vos compétences votre rigueur scientifique font de vous et de votre laboratoire une référence de haute qualité dans le travail scientifique. Recevez tous mes remerciements et toute ma satisfaction.

-Le Professeur Iyane SOW , vous nous faites un grand bonheur d'accepter de juger notre travail en t'en que membre de jury. Soyez en féliciter

Le Professeur Cheikh Saad-bou Boye , votre collaboration sans faille nous a permis de réaliser un tel travail. Recevez toute notre reconnaissance.

-Je salue la collaboration technique de Abdoul Aziz Wane, un ami, un frère sérieux et travailleur.

Abréviations

ADN :Acide Désoxyribonucléique

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

CDC : Centre for disease control and prevention

CS : Segment Conservé

CNSE : Centre National Sénégalais des Entérobactéries

DNTP : Déoxy ribonucléique Triphosphates

DO :Densité optique

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid

Ipa : Invasion plasmid antigen

IS : séquence d'insertion

LDC : Lysine décarboxylase

MH : Müller Hinton

Mxi : Membrane expression Ipa

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ODC : Ornithine Décarboxylase

OMS : Organisation Mondiale de la santé

ONPG : Ortho-Nitro-Phenyl- β -Galactosidase

pb : paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

Qsq : Quantité suffisante pour

RAPD : Random Amplified Polymorphism DNA

RTI : Répétition Terminale Inversée

SI : Séquence d'insertion

TBE :Tris Bohrate EDTA

TCS : Trypto-Caseine/Soja

VCR : Vibrio Cholera Repeat

VP :Voges Proskauer

INTRODUCTION

Dans les pays en développement, les dysenteries bacillaires sont une cause majeure de mortalité et de morbidité. Elles affectent chaque année 164,7 millions à travers le monde dont 163,2 millions dans les pays en développement et 1,1 million de décès chez les enfants de moins de 5 ans (Kotloff 1999). En Afrique 15 pays connaissent des flambées de shigellose qui touche plus de 30% de la population et 50% des enfants de moins de 5 ans (W.H.O. 1997). En Afrique subsaharienne les entérites à *Shigella* sont considérables : elles représentent 13% des diarrhées et gastroentérites au Mali, et 46% des maladies infectieuses au Gabon (Aubry 2004). A Dakar, les *Shigella* représentent 24,8% des agents entéropathogènes et 4,3% des causes de diarrhées (Sow 1992). Selon les données du CNSE, on note un recrutement croissant des souches de *Shigella sonnei* et *flexneriae* et une disparition de *Shigella dysenteriae*. De plus on note une résistance croissante des souches de *Shigella flexneri* et *sonnei* aux antibiotiques les plus fréquemment prescrits (Perrier 2002).

La résistance aux antibiotiques de ces bactéries à gram négatif est devenue une préoccupation (Lima 1995; Jones 1997). Au delà des résistances phénotypiques, l'avènement de la biologie moléculaire a permis la mise au point l'aspect génétique de la résistance chez les bactéries. Le transfert de cette résistance entre différentes espèces bactériennes est facilité par des éléments génétiques mobiles comme les transposons et les plasmides. Au début des années 80, il a été identifié de nouveaux éléments génétiques qui peuvent conférer la résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Ces éléments génétiques sont appelés intégrons (Stokes 1989) et ont été retrouvés aussi bien chez des bactéries d'origine animale (Terajima 2004) que chez des bactéries environnementales (IASRA 2001). Principalement 3 classes d'intégrons ont été bien caractérisés et sont impliquées dans la multi-résistance aux antibiotiques. Sur ces intégrons, plus de 50 cassettes ont été identifiées (Hall 1998). Les intégrons sont incapables d'auto

réplication et sont généralement portés par des plasmides et des transposons. Ils peuvent aussi se localiser sur le chromosome.

Notre objectif est d'évaluer la contribution des intégrons dans la multi-résistance des souches de *Shigella sonnei* multirésistantes aux antibiotiques isolées au Sénégal.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I- Généralités sur les *Shigella*

Les *Shigella* sont des Entérobactéries responsables de la dysenterie bacillaire et de diarrhée (Avril 1999). Elles ont été isolées pour la première fois par *Chantemasse* et *Widal* des selles d'un malade atteint de dysenterie bacillaire (Le Minor 1982). Elles sont caractérisées par leur faible activité métabolique et leur parenté avec *Escherichia coli* (% GC sont très voisins).

I-1/ Classification des Shigelles

Les bactéries du genre *Shigella* sont subdivisées en 4 espèces se distinguant entre elles par des caractères biochimiques et antigéniques, basées sur l'étude des antigènes O polysaccharidiques (Le Minor 1982). La subdivision des *Shigella* en sous groupes est fondée sur leur réaction sérologique. Quatre espèces de *Shigella* ont été bien identifiées :

***Shigella dysenteriae* ou sous groupe A**

***Shigella flexneri* ou sous groupe B**

***Shigella boydii* ou sous groupe C**

***Shigella sonnei* ou sous groupe D**

L'espèce de *Shigella sonnei* ou sous groupe D est subdivisée en biotype suivants les caractères biochimiques que sont : l'ONPG, le xylose et le rhamnose. Ainsi trois biotypes ont été distingués suivant les réactions biochimiques ci après :

ONPG +, xylose -, Rhamnose + pour le premier biotype

ONPG -, Xylose -, Rhamnose + pour le second biotype

Un autre biotype plus rare est : ONPG -, Xylose +, Rhamnose + (Le Minor 1982).

Entre juin 2001 et Mars 2003 97% des *Shigella sonnei* isolées dans 6 états Américains se sont révélées Rhamnose négative (Sha 2003). Ce qui emmène à quatre le nombre de biotype de ce sérotype. Des souches de

Shigella dysenteriae atypiques ont été identifiées (Coimbra 2001). D'autres souches de *Shigella* n'appartenant à aucune sérovar connu ont été identifié au CNSE (Perrier 2002).

Les caractères discriminatifs des groupes de *shigella* sont résumés dans le tableau I suivant:

Tests	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Fermentation du mannitol	-	+	+	+
Indole	- (sauf 2, 7, 8)	d	d	-
ONPG	d	-	d	+
ODC	-	-	-	+
Sérogroupe	A (10 sérotypes)	B (6 sèrotypes)	C (15 sérotypes)	C (1sérotypes)

d : caractère variable

Tableau I:Caractères différentiels des différentes espèces de Shigella

I-2/Caractères bactériologiques

En plus de leurs caractères d'entérobactéries (CAT-, OX-, NR+), les *shigelles* ont l'ensemble des caractères négatifs :TDA, Uréase, LDC, H2S, VP, CS. Elles ne fermentent pas beaucoup de sucres ni ne produisent du gaz sauf pour les sérotype 6 de *Shigella flexneri* et les sérotypes 13 et 14 de *Shigella boydii* (Le Minor 1982; Avril 1999)

I-3/ Caractères cultureux

Les cultures de *Shigella sonnei* sur milieu nutritif solide dissocient le plus souvent deux types de colonies :

Les unes de petites tailles présentent l'aspect lisse au contour régulier appelées phase 1. Les autres étant de grandes colonies plates et mates de

contour irrégulier appelées phase 2. Le passage de la phase 1 à la phase 2 est associée à la perte de plasmide qui code pour le caractère invasif (Le Minor 1982)

I-4/ Pouvoir pathogène.

Les *shigelles* sont des bactéries essentiellement humaines à point focal le colon et l'iléon terminal. Elles sont résistantes à l'acidité gastrique. La dose minimale infectante est de 10 à 100 bactéries (Avril 1999). Dans le tube digestif ces bactéries sont éliminées par plusieurs processus tels que la sécrétion biliaire et pancréatique, la motricité gastrique, la flore commensale de l'intestin et l'acidité de l'estomac. Mais au niveau du colon grâce à une toxine plasmidique sécrétée par les *shigelles* elles traversent les cellules M et la bordure en brosse des anthérocytes et y pénètrent. Des enzymes codées par les gènes chromosomiques *ipaH*, *mxi* et *spa* leur permettent d'échapper à la vacuole de phagocytose, de se multiplier activement et de passer d'une cellule à une autre. Après une lyse cellulaire, les bactéries atteignent la lamina propria où elles déclenchent des réactions inflammatoires à polynucléaires avec production d'interleukine *II-ib* qui entraînent la formation de microabcès et l'élimination dans les selles de mucus, de granulocytes, d'érythrocytes et de débris cellulaires (Le Minor 1982). Les polynucléaires détruisent les bactéries et peuvent se retrouver dans la lumière intestinale. C'est ce qui empêche la dissémination des bactéries dans le sang.

La détermination du caractère invasif des *shigelles* peut être étudié par le test de Sereny : il consiste à inoculer à la conjonctive du cobaye une goutte de culture bactérienne. Si la souche est invasive, il apparaît entre 2 et 3 jours une kératoconjonctivite purulente suivie d'une kératite qui guérit spontanément après 2 à 4 semaines (Le Minor 1982; Gassama 1997)

D'un point de vue expérimental, il est possible de causer le syndrome dysentérique chez le cobaye en administrant par voie orale une culture de souche virulente au cobaye après que l'animal ait été rendu sensible par

un jeune prolonge. Le singe est sensible sans préparation (Le Minor 1982).

I-5/ Epidémiologie

Les *shigelles* sont des bactéries strictement humaines transmises à partir des selles des malades et des objets ou aliments contaminés. Les sérotypes de *Shigella dysenteriae* et *Shigella flexneri* sont rencontrés plus dans les pays en voie de développement alors que *Shigella boydii* et *Shigella sonnei* sont surtout retrouvés dans les pays occidentaux. Selon l'OMS environ 250 millions de cas de shigellose sont déclarés annuellement avec 775000 morts (W.H.O. 1997).

I-6 Situation actuelle des *Shigella* au Sénégal

Au Sénégal les *Shigella* connaissent un fort accroissement en nombre de souches enregistrées ces dernières années (Perrier 2002). Au CNSE, 63% des souches enregistrés en 2002 constituent un plus par rapport à 2001(cf. tableau II). *Shigella dysenteriae* disparaît, *Shigella boydii* se maintient, *Shigella flexneri* et *sonnei* représentent près de 94% des souches isolées [Perier, 2002] (cf. tableau II). D'une manière générale l'épidémiologie des *Shigella* au Sénégal se calque à celui des pays développés (Perrier 2002).

Total	2000	2001	2002
	59	57	90
<i>Sh.dysenteriae</i>	11	4	1
<i>Sh. flexneri</i>	9	28	49
<i>Sh. sonnei</i>	26	19	36
<i>Sh. boydii</i>	4	3	3
<i>Sh. spp</i>	9	3	1

Tableau II : Répartition des espèces de *Shigella* au Sénégal entre 2000 et 2002 (Perrier 2002)

I-7-Tendances des résistances observées chez les *Shigella*

Phénotype*	<i>Sh. sonnei</i>		
	2000	2001	2002
Amp Sx Te		2	
Cl			
Amp Sx Te		1	
Amp Te Cl			
Sx	1		
Sx Te	25	16	35
Sx Te Cl			1
Te			
Sensible			
Total	26	19	36

* : Amp : résistance (R) ampicilline ; Cl : R chloramphénicol ; Te : R tétracycline ; Sx : R cotrimoxazole ; G : R gentamicine ; T : R tobramycine ; Na : R acide nalidixique ; Pf : R pefloxacin ; St : R streptomycine ; Su : R sulfamide

Tableau III : Phénotype de la résistance chez les *Shigella sonnei* au Sénégal

Une des préoccupations des infections à *Shigella* est sa multi résistance constatée partout où elles ont été étudiées (Lima 1995; Iversen 2003). Au début des années 40 les résistances ont commencé à apparaître chez les *shigelles* (W.H.O. 1997). Vers les années 50 la résistance à la tetracycline et au chloramphenicol est apparue. Le premier plasmide possédant un gène de résistance aux antibiotiques a été isolé pour la première fois chez les *shigelles* en 1950 au Japon (watanabe 1960). Dans les années 70 la résistance à l'ampicilline et dans les années 80 la résistance au triméthoprim sulfométhoxazole ont été détecté (W.H.O. 1997). Aujourd'hui avec presque 90% de *shigella sonnei* multi résistantes signalées au Vietnam (Iversen 2003) et plus de 50% au Japon (IASRA

2001), la multi résistance s'est généralisée. Cette résistance est le plus souvent associée à des facteurs génétiques (Courvalin 1997) et structuraux propres à la bactérie. Dans 80% des cas l'acquisition et la dissémination de la résistance est liée à des éléments génétiques très élaborés dont font parties les plasmides, les transposons et plus récemment les intégrons.

II / Résistance bactérienne

II-1-Les types de résistances

Plusieurs mécanismes de résistances ont été décrits :

-Résistance par modification de l'antibiotique.

La résistance par modification de l'antibiotique est un mécanisme enzymatique codé par des gènes plasmidiques (95%) et observée dans la résistance surtout aux β -lactamines et aux aminosides (Witchitz 1992).

-Résistance par modification de la cible de l'antibiotique.

C'est un mécanisme par lequel les bactéries réduisent l'affinité de l'antibiotique à leur cible. Ce mécanisme est codé par un gène chromosomique. La résistance aux quinolones (Cloekaert 2001) (par modification de la DNA gyrase et de la topoisomérase IV) et aux sulfamides (Ola 2001) (par modification de la cible du DHPS (Dihydropteroate synthétase)) ainsi qu'aux β -lactamines en sont des exemples.

-Résistance par modification de la perméabilité de la paroi bactérienne.

C'est un système non moins important utilisé par les bactéries dans la résistance aux antibiotiques. Ce système est très efficace et utilise la structure et les propriétés de la paroi bactérienne. En fait le diamètre, le nombre, les propriétés électrostatiques et hydrophobes des pores formés par les porines contrôlent le flux des antibiotiques et des toxines à travers la paroi. Par conséquent une insuffisance de la perméabilité aux antibiotiques (quinolones, phenicoles, sulfamides, ou trimetoprime) ou une insuffisance de la concentration intracellulaire (tetracyclines) constitue

un échappatoire des bactéries. Le schéma suivant résume les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques :

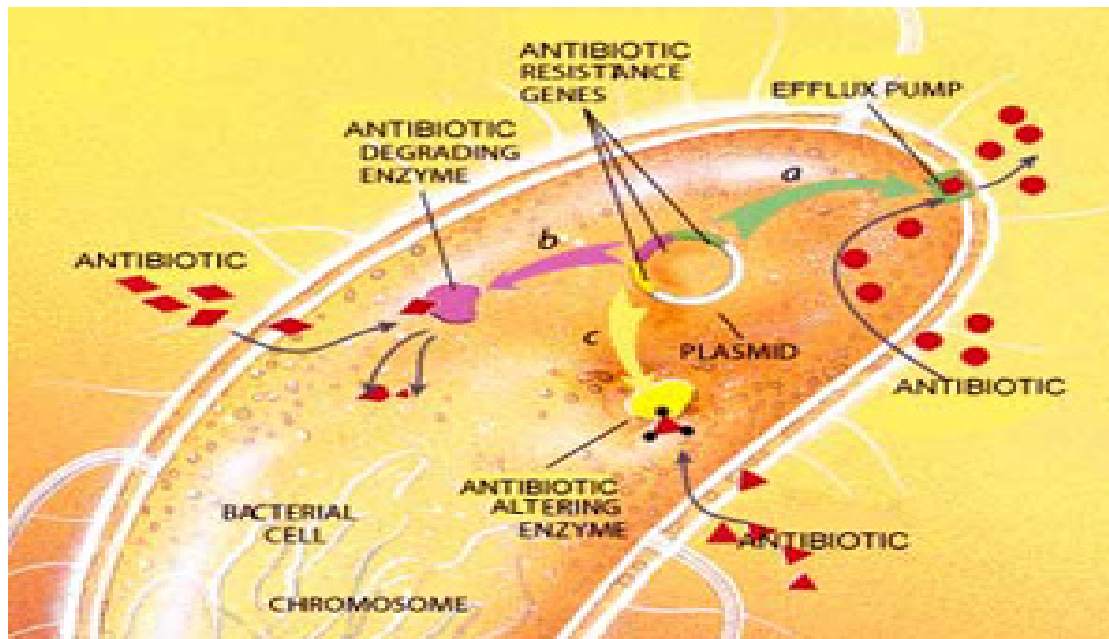


Figure 1 : Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne

- b- Inactivation ou détoxification enzymatique
- a-Interference : efflux, tamis, disparition de porines
- Modification de l'affinité de la cible
- Substitution de la cible
- c-Modification de l'affinité de la cible

II-2-La dissémination de la résistance

II-2-1/ Les plasmides

Les bactéries peuvent héberger outre que l'ADN chromosomique d'autres molécules d'ADN extra chromosomiques : les plasmides (Watson 1992).

Les plasmides sont des molécules d'ADN bi caténares, circulaires, extra chromosomiques (Courvalin 1997) . Ils possèdent une origine de réplication, un site régulateur du nombre de copie et des gènes qui codent selon les plasmides pour une ou plusieurs fonctions : transfert chromosomique (plasmide F), production de colicine (plasmide col), production d'entérotoxine ou d'hémolysine (plasmide *Ent*, *Hly*), résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (plasmide R) (Curtis 1977; Willets

1984). En générale les plasmides des procaryotes ne sont pas indispensables à la vie. Cependant ils permettent soit une meilleure adaptation à l'environnement défavorable ou fluctuant, soit une implantation dans certains hôtes, soit une compétition victorieuse avec certains micro-organismes.

Deux types de plasmides ont été définis suivant le nombre de copies par cellule :

Les petits plasmides dont les gènes régulateurs du nombre de copies par cellule ne sont pas soumis à un contrôle stringent. Ces types de plasmides appelés plasmides non conjugatifs (Courvalin 1997) existent à grand nombre par cellule et n'ont pas de fonctions connues dans la résistance aux agents antibactériens. Ils ne peuvent être transférés d'une bactérie à une autre que par mobilisation (Courvalin 1997).

Les gros plasmides ou plasmides R ou encore plasmides conjugatifs qui ont leur site de régulation soumis à un contrôle stringent. Ces types de plasmides sont présents en une seule copie par cellule et leur réplication est indépendante de celle de l'ADN génomique. Les plasmides de résistance (R) se caractérisent par leur autoréplication, leur autonomie physique (ils peuvent être séparés du DNA par ultracentrifugation sur gradient de densité) et leur perte spontanée à faible fréquence à température ambiante (37°C).

La plupart des plasmides de résistance sont transférables d'une bactérie à une autre par contact (Curtis 1977; Manning 1979). De tels plasmides possèdent un gène codant pour la synthèse d'appendice protéique appelé pili sexuel et un opéron *TRA* regroupant une vingtaine de gènes qui codent pour de nombreuses protéines nécessaires à la conjugaison bactérienne. Les plasmides R renferment en outre d'autres gènes codant pour d'autres fonctions tels que : l'inhibition de l'influx, la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'adénylation de groupements fonctionnels (Witchitz 1982).

Ces plasmides transférables ont une spécificité d'hôte. Ceci implique leur diffusion épidémique que dans les environnements sélectionnant tels que les services hospitaliers ou les antibiotiques sont largement utilisés ou chez les animaux recevant une alimentation supplémentée en antibiotique.

II-2-1-1-Mécanisme de la dissémination des plasmides

Trois mécanismes principaux sont impliqués dans la dissémination des plasmides comme l'indique la figure 2 suivante:

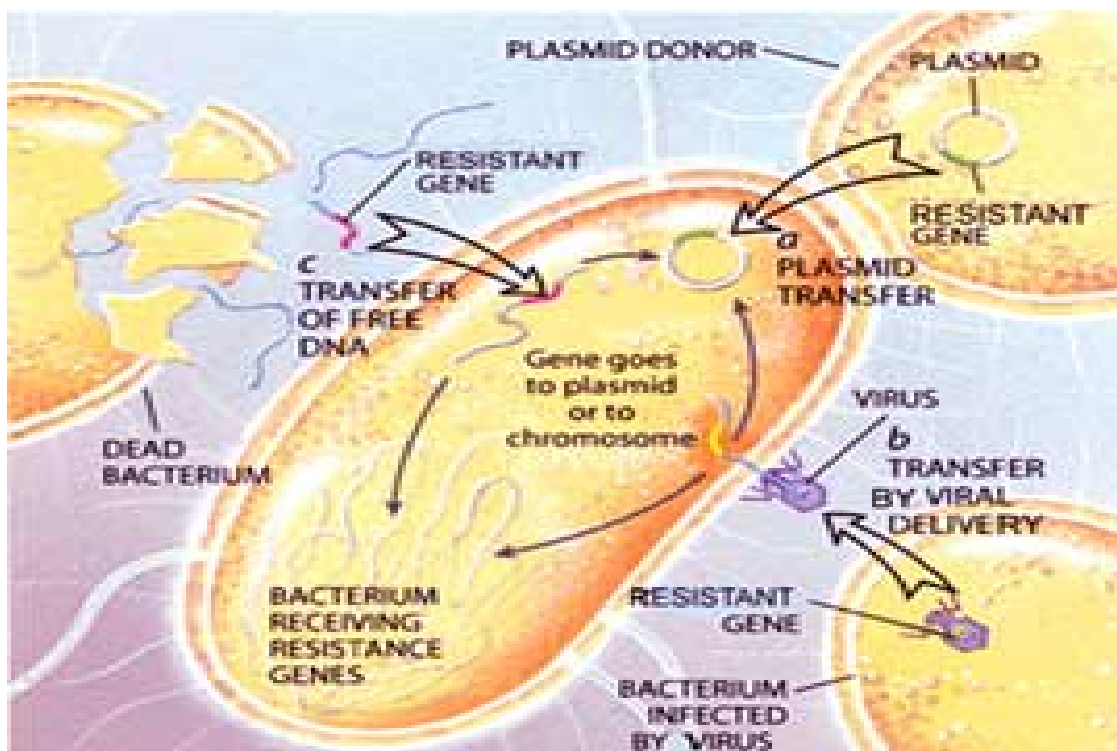


figure 2 :Mécanisme de la dissémination des plasmides

- a- Conjugaison : phénomène de contact bactérien au cour du quel il y a échange de matériel génétique
- b- Transduction : transfert d'ADN bactérien par un bactériophage
- c- Transformation :intégration et expression de séquence génomique étranger en l'absence de toute homologie de séquence

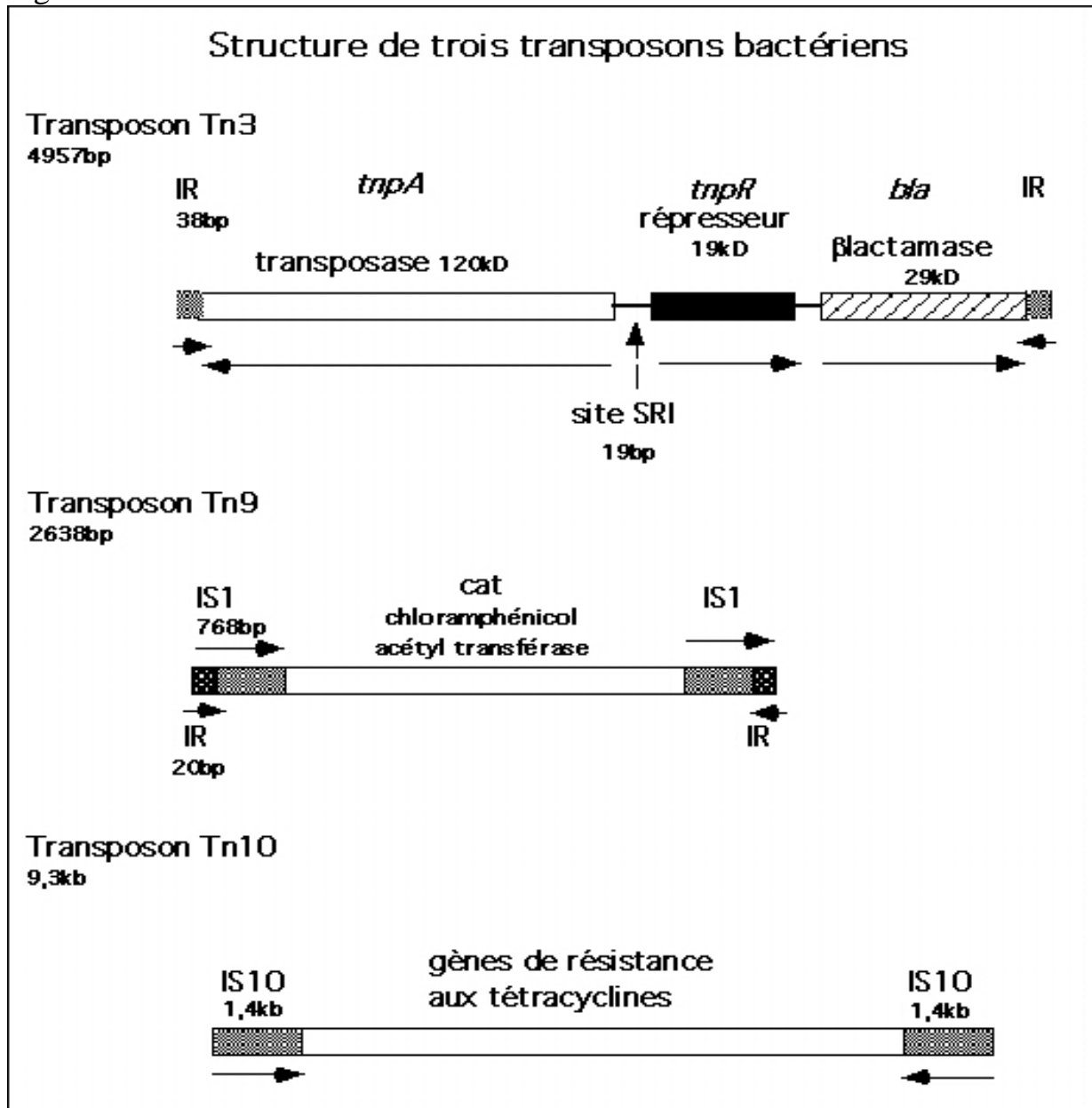
II-2-2- Les transposons

Les transposons sont des fragments mobiles d'ADN capables de se transférer de façon autonome entre un plasmide et un chromosome ou entre plasmide et plasmide (Roy 1997). Les transposons peuvent être simples ou complexes suivant leur structure. Les transposons simples sont constitués uniquement de séquences d'insertion (*IS*) qui sont autonomes et codent pour une protéine nécessaire à leur propre mobilité. Ils présentent à leurs extrémités des répétitions terminales inversées (*RTI*) suivi de répétition directe (Lewis 1992)

Les transposons complexes sont constitués d'une région centrale qui porte un ou plusieurs marqueurs de résistances aux drogues bordées de chaque côté par un module *IS* (Lewis 1992)

Les modules *IS* bordant les gènes de résistances peuvent être dans la même orientation (la répétition est dite directe) ou en orientation opposée (la répétition est dite indirecte). La région centrale en plus des marqueurs de résistance, possède un gène codant pour la transposition. La transposase reconnaît les répétitions terminales inversées (*RTI*) des modules *IS* et effectue à leur niveau une coupure en bout cohésif. Cette coupure permet l'ouverture du transposon à partir de laquelle se fait la réplication de la région limitée par les séquences d'insertions. La figure 2 donne la structure de transposons bactériens

Figure :2



Les transposons sont répartis en familles suivants leur organisation fonctionnelle (Courvalin 1997; kholodii 2003). Ainsi trois familles de transposons ont été décrits (Courvalin 1997).

Les transposons de la famille de Tn3.

Ces transposons sont majoritairement retrouvés chez les bactéries à gram négatifs à l'exception de Tn551 et de Tn917 qui ont été détecter respectivement chez *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. La structure fonctionnelle de cette famille montre la présence des gènes de la

transposage, de la résolvasse et de la β -lactamase en plus des séquences d'insertions.

La famille des transposons composites.

Ce sont des structures moléculaires dans lesquelles un ou plusieurs gènes éventuellement de résistances sont encadrés par deux copies *IS*. La synthèse de la transposase par l'une des deux *SI* entraîne la translocation complète du transposon. Par ailleurs il n'existe aucune homologie entre les *IS* bordant les gènes de résistances.

La famille des transposons conjugatifs.

Ces transposons ont la particularité d'être capable de promouvoir leur transfert d'une bactérie à une autre par un mécanisme similaire à la conjugaison. Dans cette famille l'élément le mieux caractérisé est le Tn1545. L'anatomie fonctionnelle de Tn1545 montre qu'il n'est pas flanqué de *IS* et ne possède pas de *RTI* à ses extrémités (Courvalin 1997).

Deux types de transpositions ont été décrits :

La transposition conservative pour laquelle le réplicon donneur perd entièrement le transposon au profit du receveur. Le réplicon donneur est alors cassé (Lewis 1992). Ce type de transposition est surtout rencontrée lors de la transposition des éléments *IS*.

La transposition répllicative qui fait intervenir un intermédiaire de transposition en chi entre le réplicon donneur et le site receveur.

Les transposons peuvent héberger des intégrons.

II-3/-Les intégrons

Les bactéries possèdent différents éléments génétiques mobiles dont font partie les plasmides, les transposons, permettant le transfert horizontal ou vertical de gènes de résistance aux antibiotiques entre des genres bactériens qui peuvent être éloignés sur le plan phylogénétique. Au cours des années 1980, des éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistances aux antibiotiques ont été identifiés et désignés sous le nom d'intégrons (Stokes 1989). Les intégrons peuvent

héberger des gènes de résistances insérés sous forme de cassettes (Stokes 1989). Les cassettes sont ces éléments intégrés ou excisés des intégrons par un mécanisme de recombinaison spécifique médié par une intégrase (Stokes 1989; Ploy 2000).

II-2-3-1-Structure des intégrons

Incapables de se répliquer les intégrons sont portés par des plasmides, transposons ou le chromosome. Les intégrons sont constitués :

- d'une région 5'conservée contenant un gène *intI1* qui code pour une intégrase (Stokes 1989), d'un ou de 2 promoteur. Ce gène est adjacent à un site spécifique de recombinaison *attI*. Les sites *attI* des différentes classes d'intégrons n'ont pas de séquence commune excepté le motif GTTRRRY(R : purine ; Y : pyrimidine) (Hansson 1997).

Cette région 5' est conservée pour tous les intégrons et se présente comme suit :

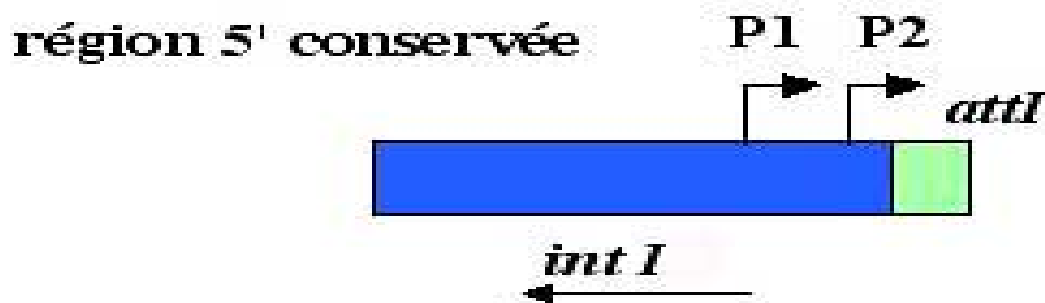


Figure 3 : Région 5' conservée des intégrons

- Une région variable qui héberge un ou plusieurs cassettes

- Et une région 3'qui n'est pas présente chez toutes les classes d'intégrons.

Plusieurs classes d'intégrons ont été décrits en fonction de la composition des acides aminés de l'intégrase (Stokes 1997). Trois d'entre eux ont été bien caractérisées et sont impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

II-2-3-2-STRUCTURE DES CASSETTES

Les cassettes sont des éléments génétiques mobiles intégrées ou excisées par un système de recombinaison spécifique de site qui fait intervenir une intégrase (Stokes 1989). Elles sont constituées d'un gène adjacent à un site spécifique de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase. La longueur d'une cassette varie de 262 à 1549 pb (Jones 2003). Le site *attC* est constitué de séquences répétées inversées à ses deux extrémités appelées respectivement core et core inverse (Ploy 2000) comme le montre la figure 4 suivante :

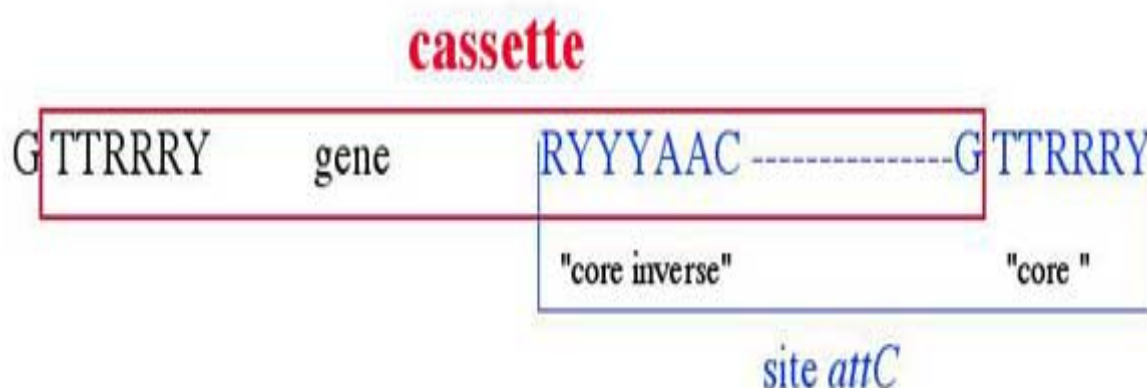


figure 4 : Structure d'une cassette (Recchia 1997)

Le premier site *attC* à être décrit avait 59 paires de base d'où l'appellation « élément 59 pb ». Cette appellation est aujourd'hui erronée puisque toutes les études ultérieures ont montré que cette région peut avoir une longueur très variable (Stokes 1989).

II-2-3-3- Mouvement des cassettes

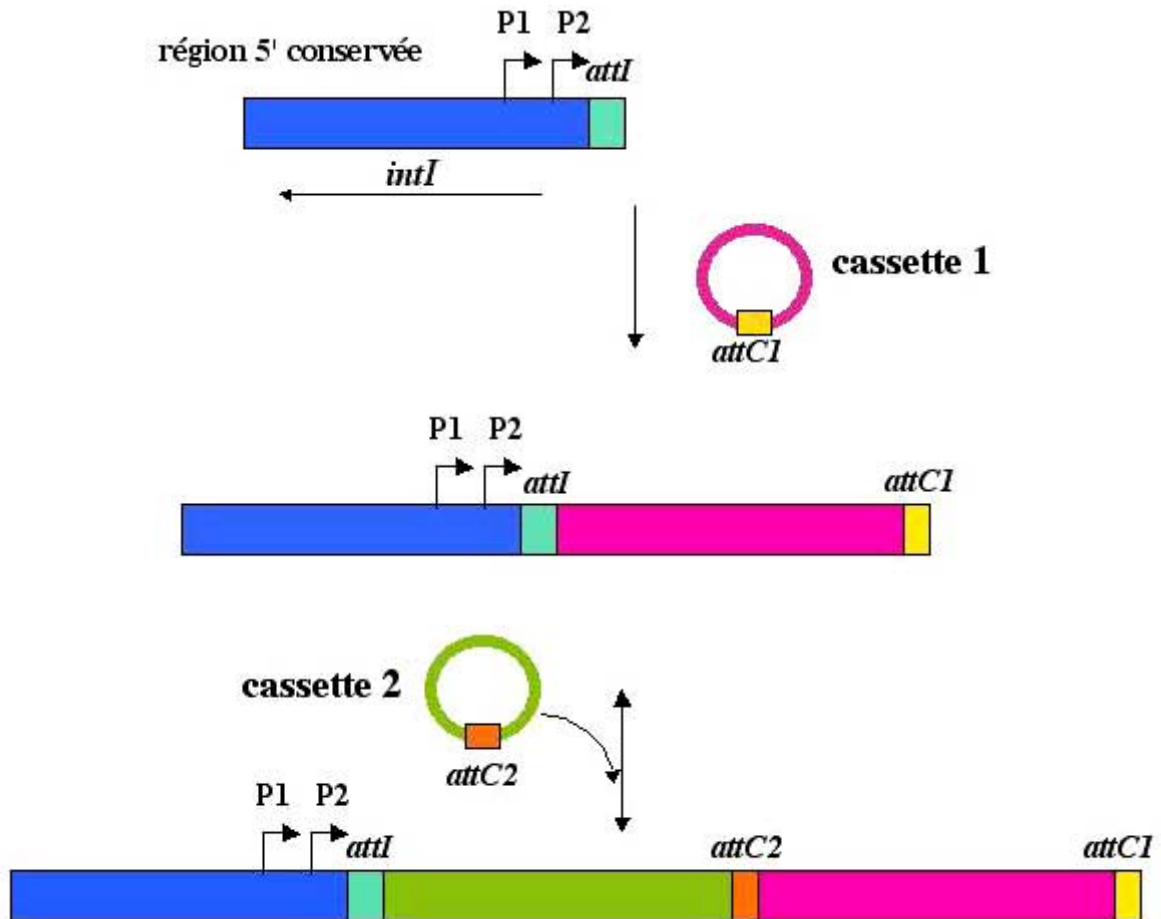


figure 5 : Mouvement des cassettes

Le mouvement des cassettes se fait essentiellement par insertion-excision entre deux sites catalysé par l'intégrase (Collis 1992). L'intégration des cassettes se fait préférentiellement par recombinaison entre le G du site *attI* de l'intégron et le T du site *attC* de la cassette (Collis 1992) . Les cassettes sont intégrés seules ou en tandem. Lorsqu'elles sont intégrées, les cassettes sous forme linéaire. La recombinaison d'une deuxième cassette se fait le plus souvent entre deux sites spécifiques et se produit entre le G d'un site core GTTRRRY et le T d'un deuxième site core mais se fait préférentiellement avec le T du site *attI*. L'événement de recombinaison peut impliquer un site spécifique et un site non spécifique

appelle site secondaire (généralement riche en A/T et C/T) qui présente des similarités avec le core GTTRRRY (De la Cruz 1993). C'est ce qui fait que la recombinaison est stable.

L'excision des cassettes se fait plutôt par recombinaison entre deux sites attC médiée par l'intégrase ou entre un site attC et le site *attI*. Les cassettes excisées sont sous forme circulaires ou libres.

II-2-3-4- Expression des cassettes

Les cassettes possèdent des cadres de lecture ayant toutes la même orientation mais sont pour la plupart dépourvues de promoteur (Ploy 1998). La transcription des gènes des cassettes est sous la dépendance d'un promoteur localisée dans la région 5' conservée en amont et leur expression est tributaire de la position du promoteur. Les gènes localisés dans des cassettes éloignées du promoteur sont faiblement exprimés à cause de leur éloignement de celui-ci (Collis 1995).

Par ailleurs la pression de sélection des antibiotiques peut favoriser des réarrangements des cassettes afin de permettre le positionnement d'une cassette à une location plus proche du promoteur. De rares cassettes possèdent leurs propres promoteurs tels que *cmIA*, *cmIA2* et codant la résistance au chloramphénicol et *ereA2* codant la résistance à l'erythromycine (Ploy 1998).

II-2-3-5-Les intégrons de classes 1

Les intégrons de classe 1 sont les mieux caractérisés des intégrons et ont été retrouvé chez la presque totalité des entérobactéries d'importance clinique (Fluit 1999) mais aussi chez quelques bactéries à gram positif (Silly 2002) ou provenant de l'environnement. Les intégrons de classe 1 ont été retrouvés sur les transposons Tn21, Tn3, Tn402 (encore appelé In16 ou Tn5090) (Silly 2002), In111 (Vourli 2003), Tn1404 (Silly 2002), Tn1405 (Silly 2002) et sur des transposons défectifs In0, In2, In10, In4, In5, In56, In58 et In31 (Brown 1996). La région 5' de cette classe d'intégron est formée d'un gène *intI1* qui code pour une intégrase de

recombinaison des cassettes de 337 acides aminés. Sa région 3' possède trois cadres de lecture ouverts (Stokes 1989) que sont:

- QacEΔ1* qui est un dérivé délété d'un gène *QacE* codant la résistance aux ammoniums quaternaires
- Sul1* qui est un gène de résistance aux sulfamides
- ORF5 qui est un gène dont la fonction n'est pas encore connue. Cette classe d'intégron est très fréquente dans les entérobactéries(White 2001).

Sur le transposon Tn402, on retrouve parfois à la place de ORF5 un gène *tni* codant pour une transposase (Vourli 2003)

La région variable de l'intégron héberge une très grande variabilité de cassettes conférant la résistance à une multitude de famille d'antibiotiques (Fling 1983) . Mais la prévalence de cette classe dans le support des cassettes de résistance aux aminosides a été noté pour la totalité des entérobactéries (Reyes 2003).

II-2-3-6-Les intégrons de classes 2

Ces intégrons sont retrouvés sur le transposon Tn7 (Hansson 2002) et trois autres de ses dérivés que sont Tn1825, Tn1826 (Tietze 1987) et Tn 4132 (Young 1994) comme le montre la figure 6 suivante. L'intégrase *intI2* n'est pas fonctionnelle car interrompue par des codons stop TAA (Hansson 2002). La région 5' code pour une intégrase de 325 acides amines et présente près de 46% d'homologie avec l'intégrase normale *IntI1* (Sundström 1991). La région 3' présente un nombre variable (1 à 5) de gènes *tns* qui codent pour une transposase. La présence de ces gènes fait que la transposition des cassettes est plus importante dans cette classe d'intégrons. Sur Tn7 on trouve souvent trois types de cassettes dont l'une code pour une résistance à la triméthoprimine (*dfrA1*) (Sundström 1991), la seconde code pour une résistance à la streptothricine (*sat*) (Sundström 1991) une troisième code pour une résistance à la streptomycine (*aadA1*). Une quatrième cassette *orfX* dont

la fonction est inconnue a été récemment été décrit sur Tn7. Sur Tn1825 une cassette supplémentaire de fonction inconnue est localisée à la première position. Par contre sur Tn1826 on ne trouve pas de cassette *dfrA1*. Sur Tn4132, *dfrA1* est remplacée par la cassette *dfr-Ib* (Young 1994). Le séquençage complet de *intI 2* sur Tn7 montre qu'il est étroitement apparenté à *intI1* de Tn21 et ressemble également à l'intégrase de classe 3 (Arakawa 1995). Il a été montré que l'intégrase de classe 2 peut promouvoir une recombinaison entre différents sites de recombinaison des cassettes présents sur le même plasmide (en vue d'une excision) s'il change la terminaison de leur codon stop en codon sens par altération de leur triplet GAG qui code pour l'acide glutamique. Une analyse comparative des sites de recombinaison *attI* de *intI2* montre que celui de Tn7 est moins exigeante que celui de Tn21 (Hansson 2002). Par ailleurs des études menées sur *Acinetobacter baumannii* en France ont décrit des intégrons hybrides présentant *intI2* dans leur région 5' et une région 3' formée de la région 3' des intégrons de classe 1 (Ploy 2000).

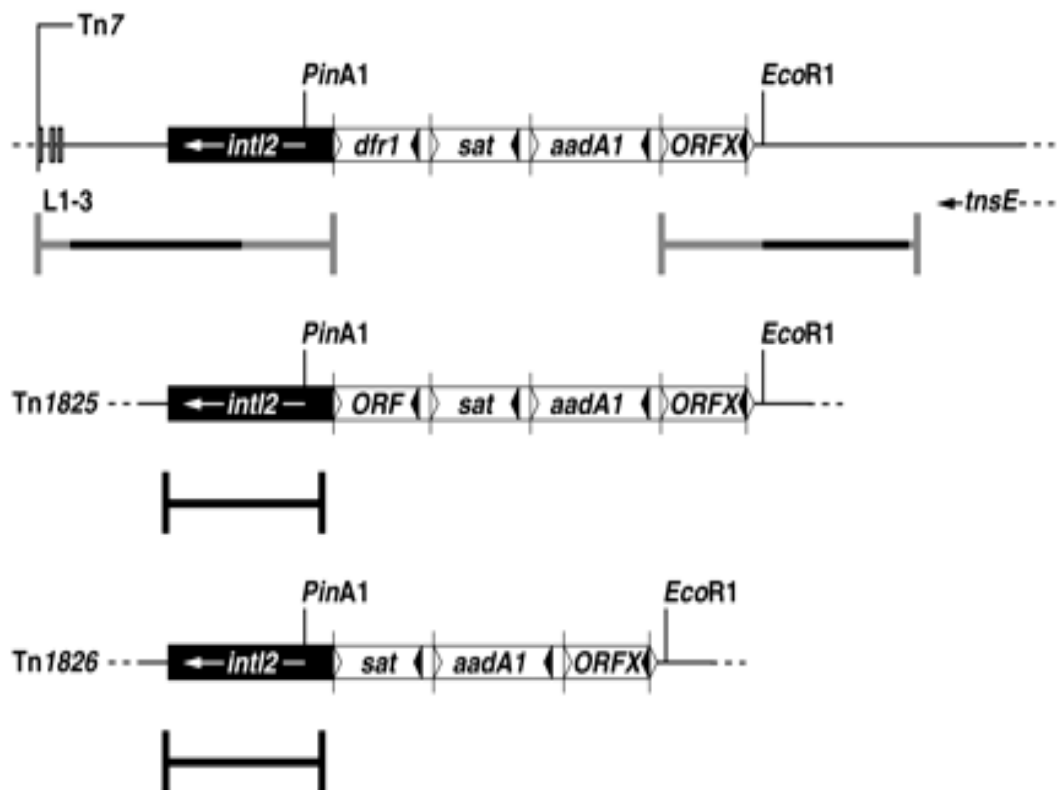


figure 6 : Schéma des transposons Tn7, Tn1825 et 1826 portant des intégrons de classe 2 (Hansson 2002)

II-2-3-7-Les intégrons de classes 3

Le premier intégron de classe 3 a été décrit chez *Serratia marcesens* (Arakawa 1995). La caractérisation de cet intégron (Collis 2002) révèle qu'il est constitué dans sa région 5' d'un gène *intI* associé à un promoteur et recombinaison à un site *attI*. L'ensemble présente la même orientation et est identique à ce qu'on trouve sur l'intégron de classe 1. L'intégrase 3 présente 61% d'homologie avec *intI1* (Arakawa 1995). Un deuxième intégron de classe 3 a été identifié chez *Klebsiella pneumoniae* à large spectre de résistance aux céphalosporine (Correia 2003). Il possède une région 5'CS qui présente 98,8% d'homologie avec la région 5'CS de l'intégron de classe 1 de *S. marcesens*. Il possède en outre deux promoteurs et au niveau du site *attI* s'insère la cassette *bla_{GES-1}* et un autre provenant de la fusion des cassettes *bla_{oxa-10}* et *aac (6') Ib*. Des expériences d'hybridation de cet intégron ont montré qu'il est situé sur le

plasmide *pRM808* et qu'il peut héberger la cassette *aadA2* et *aacA4* (Correia 2003) comme le montre la figure 7 de la page suivante :

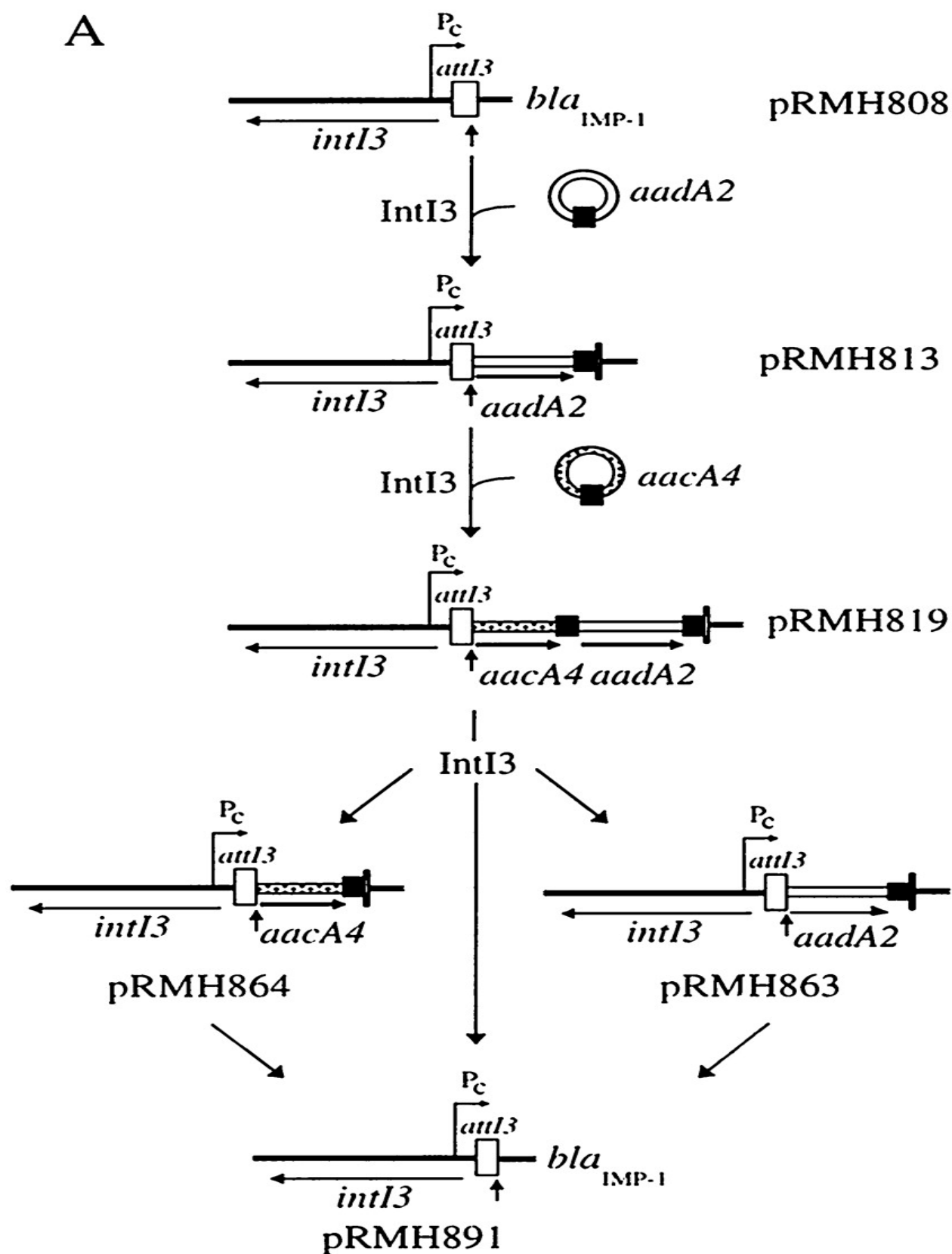


figure 7 : Mécanisme d'insertion et d'excision de cassettes de *intI3* (Correia 2003)

II-2-3-8-Les intégrons de classe 4

Cette classe a été très rarement détectée par les études sur les intégrons. Elle n'a été caractérisée pour l'instant que chez *Vibrio cholerae* (Mazel 1998). L'étude montre qu'elle contient une région 5'CS qui code pour une intégrase qui présente 40 à 50% d'identité avec les trois autres intégrases (Mazel 1998). En amont du gène *intI4* il a été retrouvé des séquences appelées VCR (Vibrio cholera repeat) et en aval un gène codant pour un amas de protéines ribosomal. On ne sait pas encore s'il est associé à des gènes de résistance aux antibiotiques (Gombac 2002).

Tout récemment, des types distinctifs d'intégrons ont été découverts et localisés sur un petit chromosome circulaire du génome de *Vibrio cholerae* (Mazel 1998). Ces éléments ont été appelés super-intégrons. Les super-intégrons ont été identifiés aussi chez *Shewanella*, *Xanthomonads* (Clark 2000 ; Rove-Magnus 1999) et chez *Pseudomonas* (Rove-Magnus 1999). Ils ont été bien étudiés : et possèdent en 5' un gène *intI* codant pour une intégrase (Mazel 1998 ; Rove-Magnus 1999) ayant 45% à 50% d'identité avec les trois intégrases *intI1*, *intI2* et *intI3*. En aval du gène *intI* se situe un site *attI* et de nombreuses séquences répétées inversées flanquées de séquences core et core inverse homologues au site *attC* des cassettes de résistance aux antibiotiques. Les séquences répétées inversées sont appelées VCR (vibrio cholerae repeat) (Barker 1994). Les super-intégrons ont une structure identique à celle des intégrons de résistance aux antibiotiques mais diffèrent par :

- Les super-intégrons ont une très grande taille et hébergent un grand nombre de cassettes.
- Les séquences VCR sont très conservées alors que les sites *attC* sont variables.
- Les cassettes des super-intégrons ne codent pas pour une fonction connue alors que celles des intégrons codent pour la résistance aux antibiotiques.

-Les super-intégrons sont spécifiques de l'espèce, ce qui n'est pas le cas des intégrons

Les super-intégrons constitueraient donc un système d'adaptation aux différentes pressions de l'environnement.

II-2-3-9-origine des intégrons

Il existe une grande ambiguïté quant à l'origine des intégrons. Néanmoins des hypothèses ont été avancées à ce sujet :

La présence de séquence palindromique au niveau du site *attC* dans la région 5' de la cassette laisse croire que les intégrons proviendraient d'une reverse transcription à partir d'ARNm (Recchia 1997). Mais cette hypothèse n'est pas de l'avis de tous car le site *attC* est très variable par sa taille et il s'associe à des gènes qui peuvent être de taille très différentes.

La deuxième hypothèse la mieux partagée sur l'origine des intégrons est que les intégrons auraient évolué à partir des "super intégrons" par le biais de la capture des gènes *intI* et des sites *attI* dans les structures mobiles de type transposon. Ces structures auraient ensuite capturées, sous l'effet de la pression de sélection des antibiotiques, des gènes de résistance provenant de pools de cassettes contenues dans différents "super intégrons" (Rowe-Magnus 2002).

De nouvelles études ont montrée que les "super intégrons" sont reconnus par l'intégrase *intI1*. C'est ce qui suggère que les intégrons ont des fonctions proche de celle des "super intégrons" (Mazel 1998).

Quant à l'origine des cassettes de résistance aux antibiotiques, il reste à confirmer le processus évolutif remontant à leur origine (kholodii 2003). Des gènes de résistance au chloramphénicol trouvés chez *Acinetobacter* ont montré une homologie entre beaucoup de cassettes mais elles n'ont aucun motif commun entre elles.

La figure 8 fait le résumé de la structure des trois principales classes d'intégrons

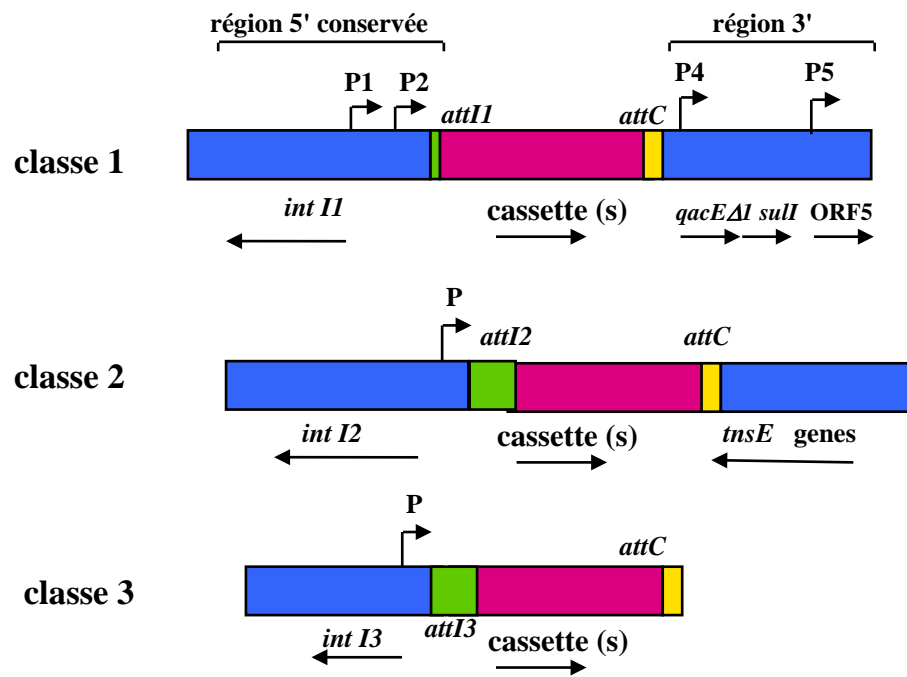


Figure 8 : Structure des principales classes d' intégrons de résistance

TRAVAIL PERSONNEL

III-MATERIEL ET METHODES

III-1- MATERIEL

Le matériel pour la réalisation des antibiogrammes, pour la préparation des lysats, pour l'amplification génique sont indiqués à l'annexe

III-2- METHODE

III-2-1-Technique de l'antibiogramme

L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été effectuée selon la technique de la CASFM (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie) (Garret 2001).

III-2-2-Extraction d'ADN bactérienne par thermolyse

On effectue une culture d'une bactérie en une nuit dans 1ml de milieu A (milieu Caye) .

Après agitation on transvase la culture dans un tube eppendorf 2ml

Centrifuger les tubes eppendorf 6000tours/mn en 5minutes

Verser le surnageant et le culot est repris dans 500µl d'eau distillée et centrifuger à nouveau à 6000tours/mn en 5minutes.

Verser le surnageant et le culot est à nouveau repris avec une faible agitation dans 500µl d'eau distillée. On fait ensuite bouillir les tubes pendant 10minutes à 100°C. Ne pas oublier de percer les tubes avant de les faire bouillir.

Laisser refroidir les tubes sur la paillasse puis les centrifuger à 10000tours/mn en 5minutes

Récupérer juste après la centrifugation 300µl du surnageant sans pour autant toucher le culot.

III-2-3- RAPD(Polymorphisme du DNA amplifié au hasard).

Principe : C'est une technique d'épidémiologie moléculaire qui consiste à amplifier simultanément à l'aide de courtes amorces (10pb) 3 à 10 sites de taille variable du génome (0,5 à 5kb). Les amplicons sont séparés ensuite par électrophorèse sur gel d'agarose. Le polymorphisme est alors détecté par la présence ou l'absence de bande d'une certaine taille.

Technique :

- Extraction du DNA bactérien par thermolyse ou par kit.
- Amplification des fragments de l'ADN par PCR
- Séparation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose
- Lecture par visualisation directe sous UV

Méthode : La méthode utilisée et le mélange réactionnel se trouvent à l'annexe

III-2-4-Détection des intégrons

Les conditions de réaction et la composition du mélange sont indiquées à l'annexe

Détection des intégrons de classe 1

-PCR 36839/37246

La taille recherchée est : 580pb

Caractérisation des intégrons de classe 1

-PCR de 36855/36854

-PCR de 36856/36854

Détection de la région 3' des intégrons de classe 1

-PCR orf4/sul1 et orf6/ sul3

Détection des intégrons de classe 2

-PCR Int2F/int2R

La taille recherchée est de : 806pb

Caractérisation des intégrons de intI 2

-PCR int2s/sat1

Taille recherché 1100pb

-PCR int2s /aadA2

Taille recherchée 1700-1800pb

-PCR Orfx3/sat1

Taille recherchée ≥ 1000 pb

Détection de la région 3' de intI 2

-PCR IntCS2/Int7S

Détection des intégrons de classe 3

-Int3F/int3R

IV-RESULTATS

IV-1-Résultat sur le phénotype de résistance aux antibiotiques

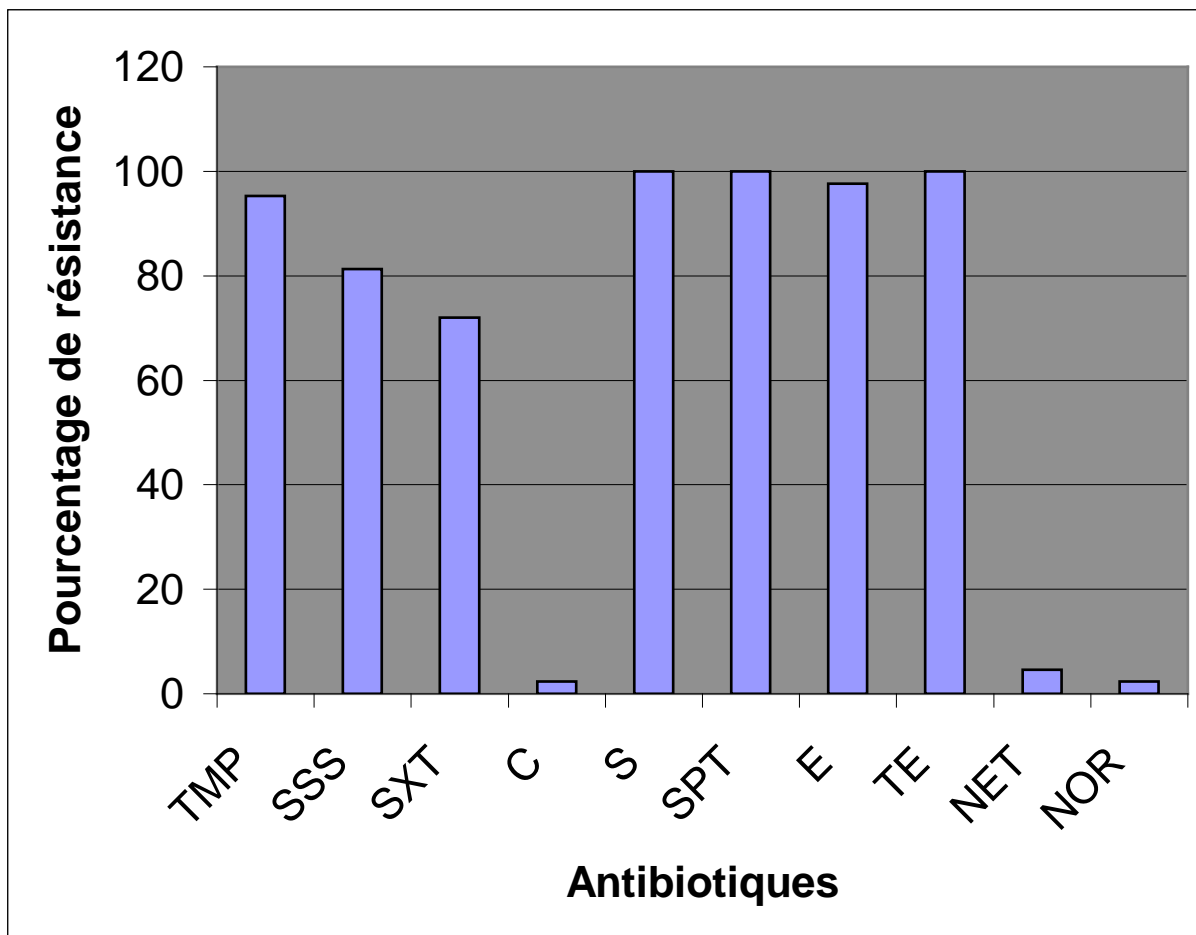


Figure 9 : Prévalence des résistances des souches de *Shigella sonnei*

IV-2-Résultat RAPD

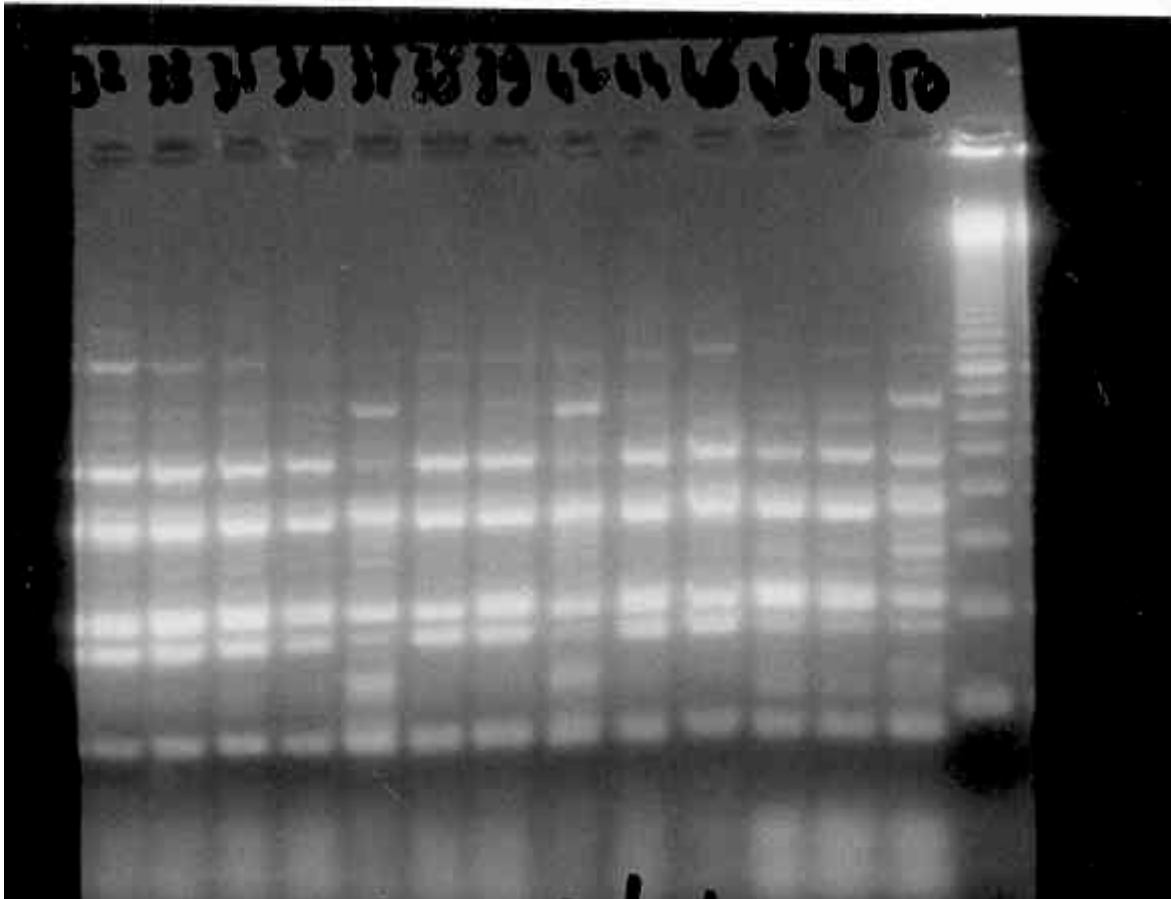
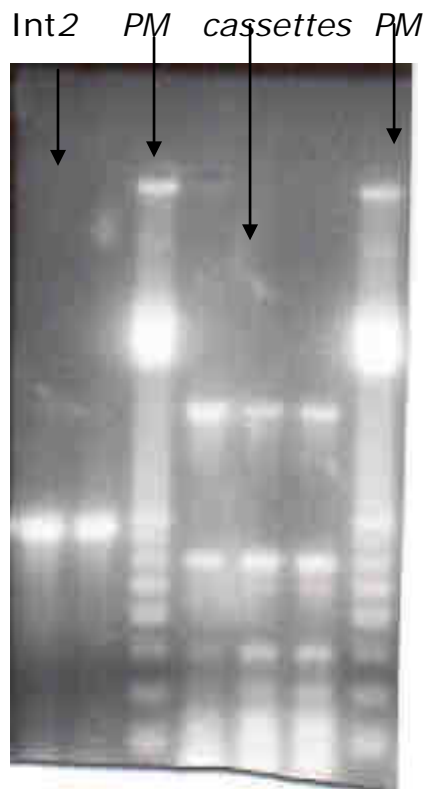


figure 10 : diversité clonale des souches de *Shigella sonnei*

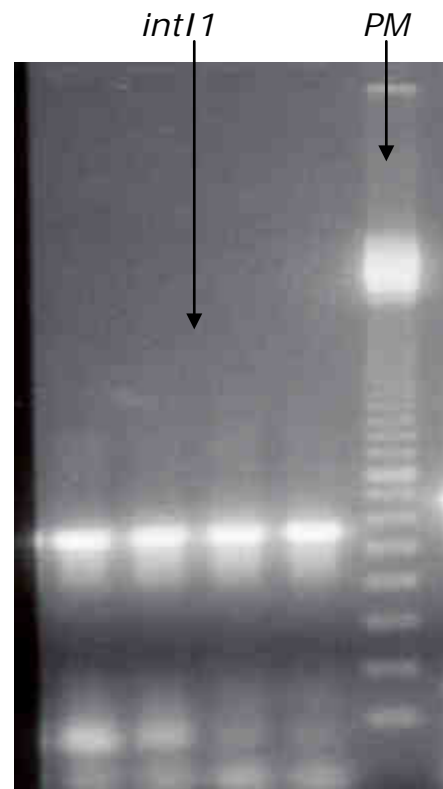
IV-3-Détection d'intégron et de cassettes



A : Intégron de classe 2 et Cassettes

PM : marqueur de taille en (pb)

intI2 : intégron de classe 2



B : intégron de classe 1

intI1 : intégron de classe 1

Figure 11 : Détection des intégrons et cassettes

Résultat du RAPD	Phénotype de résistance ^R	Gène <i>intI</i> « région 5'CS »	Produit PCR orf4/sul1 « région 3'de <i>intI1</i> »	Produit PCR <i>intCS2/int7S</i> « région 3'de <i>intI2</i> »	Cassettes « région variable »
Type A N=7	S ^R , Spt ^R , E ^R , TE ^R , SSS ^R	<i>intI2</i>	—	—	- <i>dfrA1</i> - <i>sat-aadA1</i>
Type B N=11	S ^R , Spt ^R , E ^R , TE ^R , SSS ^R , SXT ^R , TMP ^R	<i>intI2</i>	—	—	<i>dfrA1-sat-</i> <i>aadA1-orfx</i>
Type C N=2	S ^R , Spt ^R , E ^R , TE ^R , SSS ^R , SXT ^R , TMP ^R	<i>IntI1, intI2</i>	—	—	<i>aadA1-orfx</i>
Type D N=9	S ^R , Spt ^R , E ^R , TE ^R , SSS ^R , TMP ^R	<i>intI1, intI2</i>	—	—	<i>dfrA1-sat-</i> <i>aadA1</i>
Type E N=10	S ^R , Spt ^R , E ^R , TE ^R , SSS ^R , SXT ^R , TMP ^R	<i>intI1, intI2</i>	—	—	<i>dfrA1-sat-</i> <i>aadA1-orfx</i>
Type F N=3	S ^R , Spt ^R , E ^R , TE ^R , SSS ^R , SXT ^R , TMP ^R	—	—	—	—
Type G N= 1	S ^R , Spt ^R , E ^R , TE ^R , SSS ^R , SXT ^R , TMP ^R	<i>intI2</i>	—	—	<i>orfx</i>

S: streptomycine, **SPT:** spéctinomycine, **E:** erytromycine, **TE:** tétracycline, **sss:** sulfamides, **SXT:** trimethoprime sulfométhoxazole, **TMP:** triméthoprime,

V-ANALYSE INTERPRETATION

V-1-Analyse des antibiogrammes

Notre étude a porté sur 43 souches de *Shigella sonnei* isolées entre 1998 et 2002 dans les différentes structures de santé de Dakar.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques sont faites par la méthode de diffusion sur milieu solide gélosé selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie communiqué en 2001 (Garret 2001).

8 familles d'antibiotiques incluant 24 antibiotiques (ampicilline, cefotaxime, imipéném, aztreonam, amoxicilline clavulanique, ticarcilline, tobramycine, cefalotine, ceftazidime, streptomycine, amikacine, netilmycine, kanamycine, spectinomycine, erytromycine, gentamycine, norfloxacin, flumequine, tétracycline, sulfamides, triméthoprime sulfaméthoxazole, triméthoprime, chloramphénicol, rifampicine) ont été testé pour chaque souche.

Les souches de *Shigella sonnei* sont très résistantes à la spectinomycine (100%), à la streptomycine (100%), à l'erythromycine (97,6%), à la triméthoprime (95,3%), au sulfamides forts (81,3) et au triméthoprime-sulfaméthoxazole (72%). Mais elles sont très faiblement résistantes au chloramphénicol (2,3%), à la netilmycine (4,6%) et à la norfloxacin (2,3%) .

V-2-Typage moléculaire

La méthode de typage moléculaire que nous avons utilisée (RAPD) nous a permis d'identifier 7 clones chez les *sonnei*.

V-3-Détection des intégrons

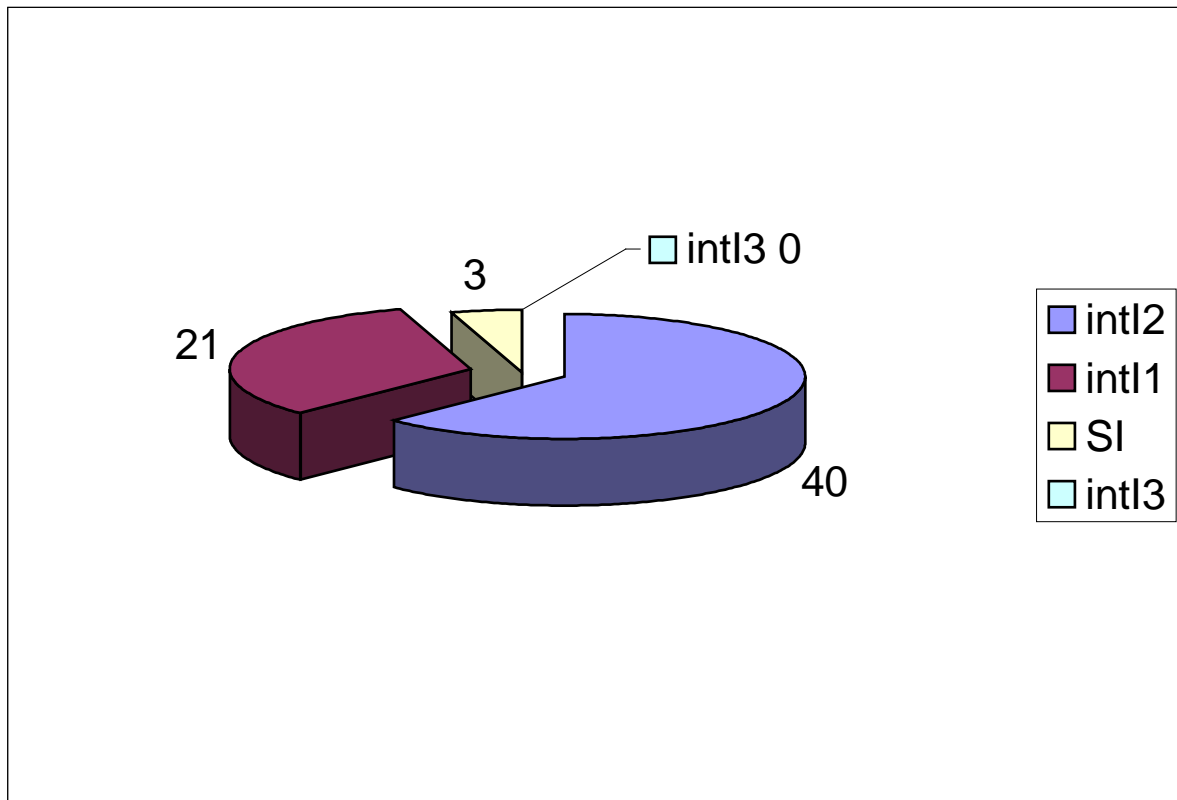


Figure 12 : Prévalence des intégrons chez les *Shigella sonnei*

SI : Sans Intégron

Les intégrons de classe 2 ont été détectés dans une forte proportion chez les *Shigella sonnei* (93%). Les intégrons de classe 1 ont été détectés dans une proportion moyenne (48,8%). Les intégrons de classe 1 étaient associés aux intégrons de classe 2.

Les intégrons de classes 3 n'ont pas été détectés par notre étude.

Les intégrons contribuent largement à la résistance des bactéries gram négatif aux antibiotiques (Hyams 2003). Les résistances des *Shigella sonnei* retrouvées au Sénégal impliquent dans 93% la présence d'intégron. Plusieurs études sur les intégrons ont montré que les intégrons de classe 1 sont majoritaires chez les bactéries à gram négatif (Iversen 2003; Barlow 2004). Une récente étude (White 2001) a révélé que les intégrons de classe 2 sont majoritaires chez *Shigella sonnei*. Des études antérieures sur les *Shigella* menées au Sénégal (Gassama 2003) ont

indiqué que *intI1* était majoritaire et que *intI 1*, *intI2* étaient retrouvés dans 37,1% des souches. La forte prévalence des intégrons de classe 2 dans notre étude peut être lié à une évolution rapide des intégrons de classe 2 chez les *Shigella sonnei* circulant au Sénégal. La co-existence de *intI1* et 2 retrouvée dans 48,8% des souches laisse penser qu'ils sont localisés sur les mêmes plasmides conjugatifs.

L'absence de gène *tns* chez les intégrons de classe 2 suppose qu'ils ont été délaîté au cours de leur évolution.

Chez de rares souches 3/43 (6,9%) la multi résistance aux antibiotiques n'a pu être corrélée à la présence d'intégron. Il est probable que ce type de résistance soit codée par des éléments autres que les intégrons. Des études sur les *Shigella sonnei* ont révélé des plasmides conjugatifs codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques (DeLappe 2003).

V-4-Characterisation des intégrons

La caractérisation des gènes par PCR chez les intégrons de classe 2 a permis d'identifier les cassettes associées au transposon Tn7 (Hansson 2002) que sont *dfrA1*, *sat*, *aadA1* et *orfx*

En fait les cassettes *dfrA1*, *sat* et *aadA1* ont été décrits sur le transposon Tn7 et sur ses dérivés Tn1825, Tn1826 (Tietze 1987) et Tn4132 (Young 1994). La cassette *dfrA1* codant pour la résistance à la triméthoprine a été retrouvée dans 86% des souches. En effet la triméthoprine est utilisée en association au sulfamides dans le traitement des diarrhées. Des études menées sur les entérobactéries indiquent que la cassette *dfrA1* est très diversifiée et représente près de 27% des cassettes détectées chez les entérobactéries (White 2001). La cassette *aadA1* très répandue chez les entérobactéries, nous l'avons retrouvée dans 90,6% des souches impliquées dans notre étude. Cette cassette code la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine ; or ces antibiotiques sont très peu utiles. Il est donc probable que la cassette *aadA1* apporte aux *Shigella sonnei* des avantages sélectifs autres que la résistance aux antibiotiques.

La prévalence des trois cassettes de Tn7 pourrait s'expliquer par le fait que l'intégrase 2 étant défectif donc ne peut insérer ou exciser de nouvelles cassettes. Nous avons noté chez certaines souches de *Shigella sonnei* une délétion des cassettes *aadA1*, *dfrA1* et *sat*.

Il est probable que l'absence de ces cassettes *dfrA1*, *Sat* et parfois de *aadA1* chez quelques souches soit liée à leur élimination momentanée. Il a été montré que les cassettes de résistances aux antibiotiques peuvent être perdues si elles ne sont pas nécessaires, mais l'intégon peut avoir leur mémoire à l'extrémité 3' de l'endroit où elles étaient fixées. Et dès que la bactérie est réexposée à nouveau à l'antibiotique, la cassette est repositionnée par l'intégrase près du promoteur (Collis 1995). Nous n'avons pas pu caractériser les intégrons de classe 1 pour défaut de la présence de la région 3'. D'autres expériences sont en cours afin de caractériser les intégrons de classe 1 dans leur totalité.

CONCLUSION

Au Sénégal, l'épidémiologie des *Shigella sonnei* se calque à celui des pays développés à la seule différence qu'au Sénégal il circule une très grande diversité génétique de *Shigella sonnei*. Les résistances constatées sont assez homogène. Ces résistances de plus en plus croissantes et diversifiées sont fortement imputables à la présence d'intégrons puisque la résistance implique dans 93% la présence d'intégrons. Les intégrons de classe 2 sont majoritaires (40/43), les intégrons de classe 1 sont associés aux intégrons de classe 2 dans 21/43 souches. Aucun intégron de classe 3 n'a été trouvé. Par contre les souches sans aucune classe d'intégron sont faiblement représentées. Les cassettes détectées sont celles de *intI2* retrouvées sur Tn7 que sont : *aadA1* (39/ 43), *Sat* (37/43), *dfrA1* (37/43). La cassette *orfx* sans fonction connue est aussi retrouvée (24/43). Notre étude vient en confirmation de la prédominance des intégrons de classe 2 chez les *Shigella sonnei* et indique qu'on retrouve les même cassettes même en présence de diversité clonale chez les *Shigella sonnei*.

En perspective, la détermination de la région variable des intégrons de classe 1 par PCR et séquençage serait un complément à l'étude des intégrons chez les souches de *Shigella sonnei*. Les intégrons peuvent être portés par des plasmides, des transposons ou par le chromosome. Des expériences de conjugaison bactérienne nous permettront de vérifier leur transférabilité et les expériences de clonage permettront dans un futur proche de localiser les deux classes d'intégrons sur leur support.

Résumé

Sujet : Caractérisation moléculaire d'intégrons chez des souches de *Shigella sonnei* multi résistantes isolées au Sénégal

Nom : Mamadou Hadi DIALLO

Nature : Mémoire de DEA de Chimie et Biochimie des Produits Naturels

Composition du Jury :

Président du jury : Abdoulaye Samb (Professeur)

Yaye Kène Gassama-Dia (Professeur)

Amy Gassama-sow (Assistante)

Ahmed Iyane Sow (Professeur)

Cheikh Saad-bou Boye (Professeur)

La multi résistance des bactéries aux antibiotiques est un phénomène mondial. L'acquisition de cette résistance est reliée à des éléments très élaborés dont font partie les plasmides et les transposons. Au début des années 80 de nouveaux éléments génétiques ont été découverts et désignés sous le nom d'intégrons. Ces intégrons seraient en grande partie responsables de la multi résistance.

Notre objectif est d'évaluer la contribution des intégrons dans la multi résistance des souches de *shigella sonnei* multi résistantes isolées au Sénégal.

L'étude a impliqué 43 souches de *Shigella sonnei* multi résistantes isolées dans les différentes structures de santé de Dakar.

-L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée par antibiogramme.

-L'étude de la clonalité des souches est réalisée par RAPD.

-La détection des intégrons et des cassettes est faite par PCR. Les résultats ont montré que : La résistance à la streptomycine et à la spectinomycine sont de 100%, la résistance à l'érythromycine est de 97,6%, la résistance au triméthoprim est de 95,3%, la résistance aux sulfamides forts 81,3%, la résistance au triméthoprim sulfométhoxazole, 72% et la résistance à la netilmycine, 4,6%.

Les résultats du RAPD indiquent la présence de 7 clones notés de A à G.

Les intégrons de classe 2 sont à forte prévalence 40 /43 (93%) ; les intégrons de classe 1 sont associés aux intégrons de classe 2 dans 21/43 (48,8%). La caractérisation des cassettes révèle que la cassette *aadA1* est la plus retrouvée avec 39/43, la cassette *dfrA1* et *sat*, 37/43. Il existe une parfaite corrélation entre le phénotype de résistance des sulfamides et des aminosides et la présence de cassette (*dhfr*, *sat*, *aadA1*) codant pour cette résistance.

Au Sénégal il circule une grande diversité génétique de *Shigella sonnei*. Les intégrons de classe 2 sont majoritaires. La présence de ces intégrons participe directement à la résistance des *shigella sonnei* aux antibiotiques.

Mot clés : Intégron, *Shigella sonnei*, Sénégal

ANNEXE

I- Préparation des milieux de culture

Préparation de tampon de migration TAE 50X

- Tris base242g
- Acide acétique glacial.....57,1ml
- EDTA 0,5M, pH 8.....100ml
- Eau distillée qsq1000ml

dissoudre, ajuster à pH, 8

Autoclaver 20mns à 110°C et conserver à la température du laboratoire

Préparation de tampon de migration TBE

- Tris base.....108g
- EDTA9,3g
- Acide borique.....55g
- Eau distillée qsq.....1000ml

Préparation de solution de bleu pour dépôt

- Glycérol.....5ml
- Tampon TEK.....5ml
- Bleu de bromophénol.....7mg
- Dissoudre, aliquoter et conserver à +4°C

EDTA 0,5M

Triplex III.....186g

Eau distillée qsq1000ml

Dissoudre avec un barreau aimanté sur un agitateur magnétique, ajuster à pH 8

Se conserve à la température du laboratoire

Préparation des Nucléotides

-dATP.....250µl

-dCTP.....250µl

-dGTP.....250µl

-dTTP.....250µl

Eau distillée.....19ml

Aliquoter et conserver à -20°C

Préparation de la gélose Tripto-caseine-soja(TCS)

C'est un bouillon hautement nutritif qui permet une croissance abondante de la plus part des germes aérobies ou anaérobies sans l'adjonction de substances nutritives.

Formule(g/l)

-Hydrolysate trypsine de caséine.....17

-Peptone de soja.....3

-Chlorure de sodium.....5

-Phosphate de potassium.....2,5

-Glucose.....2,5

préparation

Verser 40g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dilution complète. Stériliser à l'autoclave

Préparation de gélose Mueller-Hinton(MH)

C'est un milieu utilisé pour la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

Formule : Amidon, Agar, Hydrolysate de Caséine

Préparation

Verser 35g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave

II-Matériel utilisé

1-Matériel pour la réalisation des antibiogrammes

Tubes à hémolyse

Boîtes carres à MH

Ecouvillons

Etuve à 37°C

Les disques d'antibiotiques à tester

Un distributeur automatique d'antibiotiques

2-Pour la préparation des lysats

Tube à hémolyse

Centrifugeur 6000-12000rpm

Eppendorf 2ml

Système de chauffage 100-150°C

3-Materiel pour les amplifications génique (PCR)

Hote

Cônes : jaune, bleu

Pipettes : 1-10ul

Pipettes : 10-50ul

Pipettes : 50-100ul

Pipettes : 100-1000ul

Tubes ePendorf 2ml

Tubes 150ul

Thermocycleur

Balance

four

Générateur

cuve de migration

4-Matériel pour le RAPD

C'est le même que celui de l'amplification génique

III-Technique de la RAPD

Eau —————→ 27,8μl

Tampon 10x —————→ 5μl

DNTPs —————→ 4μl

A5 —————→ 4μl

A4 —————→ 4μl

Taq —————→ 0,2μl

Lysat —————→ 5μl

Programme

94°C → 3mn
 35°C → 3mn 25 cycles

72°C → 5mn

94°C → 1mn
 35°C → 2mn 35 cycles
 72°C → 1mn

72°C → 10mn

4°C → infini

IV-Amorces pour les amplifications géniques

Nom de l'amorce	Séquence	DO
36839	3' ACA-TG-TGA-TGG-CGA-CGC-ACG-A 5'	41
37246	3' ATT-TCT-GTC-CTG-GCT-GGC-GA 5'	46
Orf4	5' CAA-ACT-ATC-AGG-TCA-AGC-CTG-CTT 3'	7
Sul1	5' GTC-CGA-CAT-CCA-CGA-CGT-CTGATC 3'	5
Orf6	5' GTC-GCT-GCA-ACT-CGC-GAC-T 3'	6
Sul3	5' CCT-GGA-GAT-CTG-CGA-AGC-GCA-ATC 3'	10

36855	5' AAC-CGA-ACT-TGA-CCT-GAT-AGT-TTG 3'	12
36854	5' GGC-ATC-CAA-GCA-GCA-AGC-GCG-TTA 3'	5
36856	5' GCA-CAA-TTA-TGT-GCT-ATG-GCA 3'	4
Int2F	5' CAC-GGA-TAT-GCG-ACA-AAA-AGG-T 3'	23
Int2R	5' GTA-GCA-AAC-GAC-TGA-CGA-AAT-G 3'	14,5
aadA2	5' GAA-TGA-TGC-CGT-CGT-GCA-CAA-A 3'	2
Int2S	5' -AAC-TTT-TTG-TCG-CAT-ATC-CGT-G- 3'	11
Sat2	5' -TCG-ATG-AGA-CTG-TGC-GCG-ACT- 3'	7
Orfx3	5' -ATC-TAG-TTC-GAC-ATA-GTC-TG-3'	14
Sat1	5' AGT-CGC-GCA-CAG-TCT-CAT-CGA-3'	11
intCS2	5'-TAC-CTGTTC-TGC-CCG-TAT-CT-3'	17
Int7S	5' -TGC-CCT-GCG-TAA-GCG-GGT-GTG-GGC-GGA-CA-3'	27
Int3F	5' GCC-CCG-GCA-GCG-ACT-TTC-AG 3'	52
Int3R	5' ACG-GCT-CTG-CCA-AAC-CTG-ACT 3'	45
A5	5' GCC-GGG-GCC-T 3'	11,5
A4	5' TGC-CCG-GAC-G 3'	

Tableau :Amorces utilisées et leur caractère essentiel

V-Programmes d'amplification génique

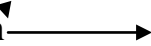
Programme PCR 36839/37246

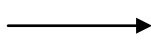
réactifs	Quantité pour une réaction(en µl)	Quantité pour 10 réactions(en µl)
Tampon 10x	5	35
Dntps	2	25
MgCl ₂	2	15
36839	3	30
37246	3	30
H ₂ O	29	255
Taq	1	10

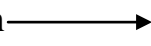
On prendra 10ul de lysat pour un volume final de 50ul

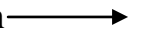
Le témoin positif est *Salmonella Keurmassar*

Le programme utilisé est :

94°C en 3mn  dénaturation

94°C en 30s  dénaturation

58°C en 1mn  hybridation 35 cycles

72°C en 1mn  élongation

72°C en 10mn

L'électrophorèse se fait sur gel d'agarose 1% dans 1X TBE

La taille recherchée est : 580pb

Programme ORF6/Sul3, Orf4/Sul1, 36854/36855, 36854/36856 est le même que celui 36839/37246

Programme PCR int2F/int2R

L'enzyme est la promega et le mélange est le suivant

réactifs	Volume pour une réaction (en µl)	Volume pour 10 réactions (en µl)
Tampon 10x	4,5	35
Dntps	2	25
MgCl ₂	2,5	15
Int2S	2	30
Int2R	2	30
H ₂ O	30	255
Taq	1	10

On prendra 6ul de lysat pour un volume final de 50ul

Le témoin positif est le *Salmonella keurmassar*

Le programme utilisé est :

94°C en 3mn → dénaturation

94°C en 30s → dénaturation

58°C en 1mn → hybridation 25cycles

72°C en 1mn → élongation

72°C en 10mn → élongation

On programme pour 35cycles : les 34 cycles font une élongation en une minute et le 35^{ème} en 11mn. L'électrophorèse se fait sur gel d'agarose 1% dans TBE 1x

La taille recherchée est de : 806pb

Programme PCR aadA2 /int2S

Les conditions de la PCR sont les suivantes

réactifs	Volume pour une réaction (µl)
Tampon 10X	4,5
Dntps	2
MgCl ₂	2,5
W	3
Int2s	3
aadA2	3
H ₂ O	27
Taq	1

Programme

94°C en 3mn	→	dénaturation	
94°C en 30s	→	dénaturation	
58°C en 1mn	→	hybridation	25 cycles
72°C en 1mn	→	élongation	
72°C en 10mn	→	élongation	

Le programme des PCR int2S/Sat2, int2S/aadA2, int2CS/int7S et int3F/int3R sont les mêmes que ceux de int2S/aadA2

BIBLIOGRAPHIE

- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki K., Lot, H., Wakarotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., and Ohta, M.** (1995). A novel integron carrying the metallo- β lactamase gene *bla-IMP*. Antimicrob. Agents and Chemother. 39: 1612-5.
- Aubry, P.** (2004). Shigellose et dysenterie bacillaire. Actual. 2004.
- Avril, J. L., Dabernat, H., Denis F., Monteil, H.** (1999). Les *Shigella*. Bactériologie clinique :183-8. 3ème édition: 183-8.
- Barker, A., Clark, C.A. and Manning, P.A.** (1994). Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J. Bacteriol.* 1976: 5450-58
- Barlow, R. S., Pemberton, J. M., Desmarchelier, P. M., and Gobius, S.** (2004). Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. Antimicrob. Agents and Chemother.: 838-43.
- Bauer, A. N., Coll.** (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method. J. Clin. Microbiol. 45: 493-96.
- Brown, H. J., Stokes, H.W. and Hall, R.M.** (1996). The integrons In0, In2 and In5 are defective transposon derivatives. Bacterial. 178 N° 15: 4429-37.
- Garret, G., Carvalho, J.D., Chardon, H., Chidiac, P., Choutet, P., Courvalin, P.; Dabernat, H., Drugeon, H., Dubreil, L., Goldstein, F.; Jarlier, V., Lecercq, R., Nicolas-chanoine, M.H. Philippon, A.; Quentin, C. Rouveix, B. Sirot, J., Soussy, C.J.** (2001). Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. Communiqué 2000-2002.
- Cloekaert, A. Chaslu, D. E.** (2001). Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. Vet. Res 32: 291-300.

- Coimbra, R. S., Lefevre, M., Grimont, F., and Grimont, P. A. D.** (2001). Clonal Relationships among *Shigella* Serotypes Suggested by Cryptic Flagellin Gene Polymorphism. J. Clin. Microbial. 39: 670-74.
- Collis, C. M., 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., Hall, R.M.** (1992). Specific deletion and rearrangement of integron insert gene catalysed by the integron DNA integrase. 147: 1574-85.
- Collis, C. M., Hall, R.M.** (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob. Agents and Chemother. 39: 155-62.
- 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: 3017-26.
- Correia, M. F., Grosso, F., Salgado, L. M., Lito, J., Mendo, M. C. S.** (2003). Molecular characterisation a new class 3 Intégron in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents and Chemother. 47: 2838-43.
- Courvalin, P., Trieu, C. P.** (1997). Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques.: 316-31.
- Curtis, R., Fenwick, R. G., Goldshmidt, R. et coll.** (1977). The mecanism of conjugation in S. Mutsuhashi, Transferable drug resistance factor. Tokyo University Press, 109-34.
- De la Cruz, E. F. M., Garcia, L. J.M.** (1993). Secondary sites for integration mediated by the Tn21 integrase. Mol. Microbiol. 10: 823-8.
- DeLappe, N., Fiona, O., Fanning, T. and Cormican, M.** (2003). Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Shigella Sonnei*

Isolates from west Ireland, an Area of low Incidence of Infection.
J. Clin. Microbial.: 1919-24.

Fling, M. E., and Richards, C. (1983). Richards Nucleotid sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzym, 3'(9)-o-nuclotydyltransferase. Nucleic Acids Res. 13: 7095-106.

Fluit, A. C. and Schmitz, F. J. (1999). Class 1 integons, genes cassettes, mobility, epidemiology. European journal of Microbiology and Infectious Diseases 18: 761-70.

Gassama, A., Aidara, A., Boye, C.S., Mboup, S., Samb, A. (1997). Caractérisation phénotypique des souches de *Shigella* isolées au Sénégal. Med. Mal.infect.

Gassama, A., Aidara, A.K., Chainier, D., Denis, F. (2003). Detection and characterization of class 1 and 2 integron in *Shigella* strains isolated in Sénégal.” Poster Nr. P586/eccmid.

Gombac, F., Letiszia, R.M., Rossolini, G.M., Lagatolla, C., Tonin, E., Monti-Bragadin, C., Annamaria, Lavenia, A., and Dolzani, L. (2002). Molecular Characterization of Integrons in epidemiologically Unrelated Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian Hospitals Reveals a Limited. Diversity of Gene cassette Arrays. Antimicrob. Agents and Chemother.: 3665-68.

Hall, R. M., Collis, C.M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. Drug Resist. Updates 1: 109-19.

Hansson, K., Skold, 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., Sundström, L., Pelletier, A., and Roy, P. H.** (2002). IntI2 Integron Integrase in Tn7. J. Bacteriol. 184: 1712-21.
- Hyams, K. C. A. L., Bourgeois, B.R., Merrell, R., Rizmaji, J., Escamilla, S.A., Thornton, G. M. , Wasserman, A., Burke, P., Echeverria, K. Y., Green, A. Z.; and Woody, J.N.** (2003). Diarrheal Disease during operation desert Shield. N.Engl. J.Med. . 325: S1423-28.
- IASRA** (2001). Shigellosis, Japan, 1999-2000. The Topic Of This Month 22: 81-2.
- 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(S17-24).
- Jones, L. A., McIver, C. J., Rawlinson, W. D., White, A.P.** (2003). Polymerase chain reaction screening for integrons can be use to complement resistance surveillance programs. Commun. Disea. Intellig.- suppl.
- Jones, M. E., Peters, W. A.M., Fluit, A. and Verhoef, J.** (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. Lancet 349.
- kholodii, G., Mindin, S., Mayya, P., Svetlana, M.** (2003). Tn5060 from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of Tn21 prior to integron acquisition. FEMS Microbiol. Letters 226: 2551-55.
- Kotloff, K. L., 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 developpement and implementation of control strategies. W.H.O. 77(8): 651-66.

- Le Minor, L., veron, M.** (1982). *Shigella*. Bactériologie médicale Tome2: 253-58.
- Lewis, B.** (1992). Genes. III: 590-603.
- Lima, A. A., Lima, NL, Pinho, MC., Barros, EA., Junior, MJ. Teixeira, MC. Martins, and Guarrant, RL.** (1995). High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sufamethoxazole, streptomycin isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. Antimicrob. Agents and Chemother. 39(1): 256-9.
- Manning, P. A., Achtman, M.** (1979). Cell to cell interactions in conjugating *E. Coli*: the involvement of the cell envelope. In M. Inouye, Bacterial outer membranes. John Wiley and Sons, New York. Bacterial. outer memb.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V., Davies, J.** (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. Science 280: 605-8.
- Ola, S.** (2001). Résistance to trimethoprim and sulfonamides. Vet. Res. 32: 261-73.
- Perrier, G. C. J. D. M. D., M.S.C J.A., Dromigny, P.D.; M.S.C.** (2002). Rapport d'activité 2002. Centre National Sénégalais des Entérobactéries.: 22-5.
- Ploy, M. C., Denis, F., Courvalin, P.L.** (2000). Molecular Characterization of on Integron in *Acinobacter baumannii* : Description of a hybrid class 2 Integron. Antimicrob. Agents and Chemother.: 2684-88.
- Ploy, M. C., Lambert, C. P.** (1998). Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688. A class 1 integron with two new gene cassette, *cmlA* and *qacE*. Antimicrob. Agents and Chemother. 42: 2257-63.
- Recchia, G. D., Hall, R.M.** (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends Microbiol. 5: 389-94.

- Reyes, A., Bello, H., Domingez, M., Malla, S., Zemelman, R., Gonzalez, M.** (2003). Prevalence and type of class1 integron in aminoglycoside-resistant enterobacteriaceae from several children hospitals. J. Antimicrob. chemother. 51: 317-21.
- Rowe-Magnus, D. A. A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davis, J. and Mazel, D.** (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrins provides an ancestry for multi-resistant integrins. *Proceedings of the national Academy of sciences of united States of America.* 98: 652-57.
- Rowe-Magnus, D. A. A., Guerout, A.M., Mazel, D.** (2002). Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. Mol. Microbiol 43(6): 1657-69.
- Roy, P. H.** (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques: la génie génétique à l'oeuvre des bactéries. Med/Sciences 13: 927-33.
- Sha, A. L., Tucker, N.A., Mintz, E.D., Painter, J.A.** (2003). Sharing *Shigella*: risk factors for a multi community outbreak of shigellosis. Arch. Pediatr. Adolesc.Med 157: 601-3.
- Silly, R. P., Collis, C. M. , and Hall, M. R.** (2002). Class 1 Integron Containing a new Gene Cassette, aadA10, Associated with Tn1404 from R151. Antimicrob. Agents and Chemother. 46: 2400-08.
- Sow, A. I., Cisse, M.F., Deggla, C., Samb, A.** (1992). Bacteriology of *Shigella* isolated in a tropical zone CHU. Dakar Med. 37(2): 127-30.
- Stokes, H. W., Hall, R.M.** (1989). A novel family of potentially Mobil DNA element engoing site-specific gene-integration function: integrins. Mol. Microbiol 3: 1669-83.
- Stokes, H. W., O'Gorman, D.B., Recchia, G.D., Parsekhian, M., Hall, R.M.** (1997). Stucture and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes.” Mol. Microbiol 26: 4316-45.

- Sundström, L., Roy, P. H. and Skold, O.** (1991). The *dhfrI* trimethoprim resistance gene of Tn7 can be found at specific sites in other genetic surroundings. Antimicrob. Agents and Chemother. 34: 642-50.
- Sundström, L., Roy, P. H. and Ola, S.** (1991). Site -specific Insertion of Three Structural Gene Cassette in Transposon Tn7. J. Bacteriol.: 3025-3028.
- Terajima, J., Tamura, K., Hirose, K., Izumiya, H., Miyahara, M., Konuma, H., and Watanabe, H.** (2004). A multi-prefectural outbreak of *Shigella Sonnei* infection associated with eating oysters in Japan. Microb. Immunol. 48(1): 49-52.
- Tietze, E., Brevet, J., Tschape, H.** (1987). Relationships among the streptothricin resistance transposons Tn 1825 and Tn 1826 and the trimethoprim resistance transposon Tn7. Plasmid 18(3): 246-49.
- Vourli, S., Tzouvelekis, L.S.; Tzelepi, E., Lebessi, E., Legakis, N.J. and Mirigou, V.** (2003). Characterization of In111, a class 1 integron that carries the extended-spectrum b-lactamase gene bla_{IBC-1}. FEMS Microbiol. Letters 225(1): 1491-583.
- W.H.O.** (1997). "Weekly Epidemiological Record." 72: 73-80.
- Watanabe, T., Fukasawa, T.** (1960). Episome mediated transfer of drug resistance in enterobacteriaceae. J. Bacteriol. 81: 669-78.
- Watson, G., Witkowski, Z.** (1992). DNA Recombinant. 2ème edition: 26-7.
- White, P. A., McIver, J. C. and Rawlinson, W. D.** (2001). Integrons and gene cassettes in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents and Chemother. 45: 2658-61.
- Willets, N., Wilkins, B.** (1984). Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. Microbiol. Rev 48: 24-41.
- Witchitz, J. L.** (1982). Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens. Bactériologie Médicale, Tome 2 : 193-224.

Young, H. K., Qumsieh, M.J., McIntosh, M.L. (1994). Nucleotide sequence and genetic analysis of the type *Ib* trimethoprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase. Antimicrob. Agents and Chemother. 34(5): 715-25.