

## Les intégrons : un système original de capture de gènes chez les bactéries

Après plusieurs décennies « d'euphorie » consécutives à la découverte des premiers antibiotiques comme la pénicilline ou les sulfamides, nous connaissons aujourd'hui une période plus critique due à l'augmentation et à la dissémination de la résistance des bactéries à de nombreux antibiotiques [1] (*m/s* 1999, n° 10, p. 1177 et 1999, n° 6-7, p. 888). Les bactéries possèdent en effet différents éléments génétiques très élaborés, dont font partie les plasmides et les transposons, permettant le transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques entre des genres bactériens qui peuvent être très éloignés sur le plan phylogénétique [1, 2].

Au cours des années 1980, des 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. Celles-ci sont en effet intégrées ou excisées par un système de recombinaison spécifique de site qui fait intervenir une intégrase [3]. Les intégrons constituent donc un système original de capture de gènes capable de promouvoir efficacement la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien.

On les trouve principalement dans les bactéries à Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Campylobacter* [4-8]), parfois dans des bactéries à Gram positif [9, 10]. Les intégrons sont insérés dans des plasmides, des transposons ou le chromosome bactérien. En ce qui concerne les mycobactéries, seul un

« vestige » d'intégron a été découvert chez *Mycobacterium fortuitum* [10]. Actuellement, plus de 50 cassettes [4] ont été identifiées qui contiennent essentiellement des gènes de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques (Tableau I).

### Structure des intégrons

Les intégrons sont constitués de deux régions 5' et 3' conservées, entre lesquelles peuvent s'intégrer une ou plusieurs cassettes. Contrairement aux transposons, les cassettes ne contiennent pas de gène codant pour une enzyme catalysant leur mouvement. Seule, en effet, la région 5' immobile de l'intégron contient

un gène *intI*, codant pour une intégrase IntI1, qui s'apparente aux recombinases spécifiques de site et plus particulièrement aux intégrases des bactériophages [3] (figure 1). Plusieurs classes d'intégrons ont été définies en fonction de leur intégrase et trois d'entre elles (classes 1, 2 et 3), bien caractérisées, sont impliquées à ce jour dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Les intégrons de classe 1 sont souvent localisés dans des transposons de la famille *Tn21* et contiennent le gène *intI1* codant pour l'intégrase IntI1, une protéine de 337 acides aminés. Les intégrons de classe 2, présents sur *Tn7* et ses dérivés, possèdent le gène *intI2* codant pour l'intégrase IntI2,

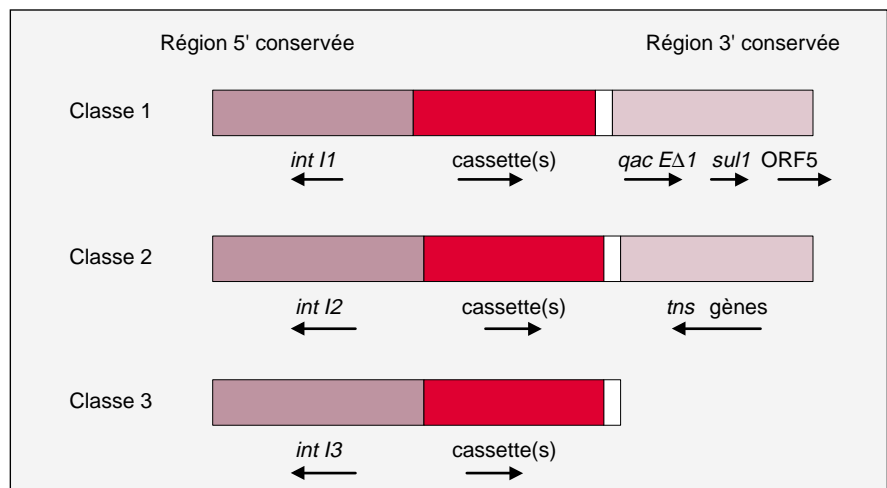


Figure 1. Les trois classes d'intégrons impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Les flèches indiquent le sens de la transcription. Le rectangle en aval de la cassette représente le site de recombinaison attC. La région 5' conservée contient le gène *int* codant pour une intégrase. La région 3' conservée est différente selon les intégrons. Les intégrons de classe 1 contiennent 3 cadres de lecture ouverts : *qacEΔ1*, *sul1* et *ORF5*. Les intégrons de classe 2 contiennent les gènes *tns* codant pour des fonctions de transposition. La région 3' des intégrons de classe 3 n'a pas été décrite.

Tableau I  
CASSETTES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DÉCRITES SUR DES INTÉGRONS

	<b>Intégrons de classe 1</b>	<b>Intégrons de classe 2</b>	<b>Intégrons de classe 3</b>
Espèces bactériennes	Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Entérobactéries <i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Fonction des cassettes (bla <sub>IMP</sub> )	Résistance aux β-lactamines β-lactamases classes A, C et D β-lactamases classe B (bla <sub>IMP</sub> ) Résistance aux aminosides 6'-acétyltransférases 3-acétyltransférases 2''-adénylyltransférases 3''-adénylyltransférases Résistance au chloramphénicol acétyltransférases mécanisme non enzymatique Résistance au triméthoprim dihydrofolate réductases Résistance à la rifampicine ADP-ribosyl transférase	Résistance aux aminosides 3''-adénylyltransférases Résistance à la streptothricine acétyltransférases Résistance au triméthoprim dihydrofolate réductase	Résistance aux β-lactamines β-lactamases classe B Résistance aux aminosides 6'-acétyltransférases

qui présente 46 % d'homologie avec IntI1, mais dont la taille est réduite de 12 acides aminés\*. Un seul intégron de classe 3 a été décrit dont l'intégrase, IntI3, a 61 % d'identité avec IntI1 [12].

La région 3' de ces trois classes d'intégrons est en revanche très différente (figure 1). La région 3' des intégrons de classe 1 contient trois cadres de lecture ouverts. Le premier, *qacEΔ1*, est un dérivé tronqué du gène *qacE* codant pour une protéine de résistance aux ammoniums quaternaires. Le second est le gène *sulI* qui code pour une protéine de résistance aux sulfamides et le troisième, désigné *ORF5*, ne code pour aucune protéine de fonction connue. La région 3' des intégrons de classe 2 est composée de gènes impliqués dans la transposition de *Tn7* [13]. Quant à l'intégron de classe 3, sa région 3' n'a pas encore été caractérisée [12].

**Les cassettes sont formées d'un gène et d'un site spécifique de recombinaison**

En dépit de leurs tailles et de leurs fonctions très variables, les cassettes possèdent une organisation commune (figure 2). Elles contiennent un gène flanqué à son extrémité 3' d'une séquence palindromique, le site *attC*. Il s'agit d'un site spécifique de recombinaison reconnu par l'intégrase, et souvent désigné «élément

59-pb» car les premiers sites *attC* décrits avaient une taille de 59pb. Il est constitué de plusieurs séquences relativement conservées, inversées et répétées, capables de réaliser une structure cruciforme. En fait, les séquences conservées recouvrent surtout les 20 premières et les 20 dernières bases, et encadrent une région de séquence et de longueur variables. Ainsi, certains sites *attC* sont formés de 141 paires de bases, d'où l'ambiguïté de la terminologie

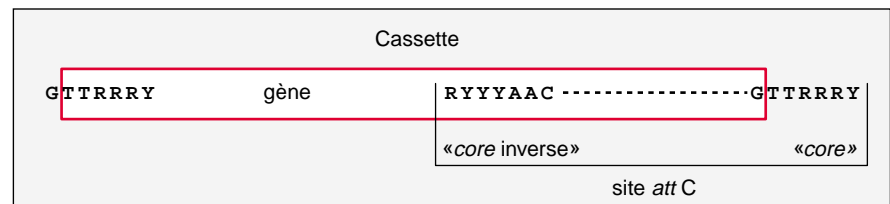


Figure 2. **Structure d'une cassette.** Une cassette contient un gène flanqué à son extrémité 3' du site de recombinaison *attC* excepté les 6 dernières paires de bases. Le site *attC* est flanqué à ces deux extrémités de séquences inversées et répétées, le core et le core inverse. L'extrémité 5' de la cassette est constituée des 6 dernières paires de bases du site *attC* de la cassette précédente. Le point de recombinaison se situe entre le G d'une séquence core et le premier T d'une autre séquence core.

\* EMBL/GenBank AJ001816.

« élément 59-pb » [14]. On trouve aux deux extrémités de chaque site *attC* deux séquences inversées et répétées de 7 paires de bases désignées *core* et *core inverse*. Le *core* (GTTRRRY; R: purine; Y: pyrimidine) est localisé à l'extrémité 3' du site *attC* et le *core inverse*, de séquence complémentaire RYYAAC, à l'extrémité 5'.

Lors de la recombinaison, le point de *crossing-over* se situe entre le G d'un site *core* et le premier T d'un deuxième site *core*. Une cassette contient donc un gène, immédiatement suivi, à son extrémité 3', d'un site *attC*, excepté les 6 dernières paires de bases, l'extrémité 5' de la cassette étant constituée des dernières paires de bases du site *attC* de la cassette précédente (figure 2). Il existe une grande variété de sites *attC*. Certains, dont la séquence est très conservée, sont associés à des gènes de résistance très différents et, inversement, des gènes apparentés peuvent être associés à des sites *attC* très différents [15].

### Le mouvement des cassettes se fait par recombinaison spécifique

Le mouvement des cassettes des intégrons de classe I a été principalement étudié. Les cassettes sont intégrées seules ou en tandem entre les deux régions conservées de l'intégron. Lorsqu'elles sont intégrées, les cassettes le sont sous forme linéaire, mais elles peuvent aussi exister sous forme libre, circulaire, après leur excision (figure 3) [16]. L'intégrase IntI catalyse en effet aussi bien l'intégration que l'excision des cassettes [17], ces mouvements (qui ne font pas intervenir la protéine RecA) s'effectuant par recombinaison entre deux sites spécifiques reconnus par l'intégrase. Il s'agit des sites *attC*, situés à l'extrémité 3' de chaque cassette, mais aussi d'un autre site, le site *attI*, localisé à la jonction de la région 5' conservée de l'intégron et de la première cassette (figure 3). Les événements de recombinaison peuvent impliquer 2 sites *attC* ou un site *attC* et un site *attI*. L'intégration des cassettes se fait préférentiellement par recombinaison entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* de la cassette, tandis que leur excision se fait

plutôt par recombinaison entre deux sites *attC*.

Le site *attI* contient la même séquence *core*, GTTRRRY, que le site *attC* mais ne contient pas de séquence complémentaire RYYAAC (*core inverse*) ni de séquence inversée et répétée. Les sites *attI* des trois classes d'intégrons sont très différents hormis la séquence GTTRRRY et la présence de nombreuses bases A localisées dans la région 5' [18]. L'activité de ce site ne semble donc pas liée à une séquence particulière ni à une structure secondaire, contrairement aux sites de recombinaison habituellement reconnus par les intégrases dont les sites *attC* [18]. Cependant, une région minimale de 33 paires de bases paraît nécessaire à l'activité du site *attI* des intégrons de classe I [14].

Exceptionnellement, l'événement de recombinaison peut impliquer un site spécifique et un site non spécifique, appelé site secondaire [18, 19] dont la séquence, généralement GWTMW (W:T/A; M:A/C), est semblable à celle du *core* GTTRRRY [19]. L'intégration est alors stable car l'excision d'une cassette au niveau d'un site secondaire est peu probable.

### Les cassettes sont exprimées à partir d'un promoteur commun

Toutes les cassettes sont orientées dans la même direction [17] puisque la recombinaison a lieu au niveau du *core* GTTRRRY, situé en 3' du site *attC*, et non du *core inverse*, situé en 5'. Les cassettes ne contiennent le plus souvent pas de promoteur, et la transcription de leurs gènes est, comme dans un opéron, sous le contrôle d'une région promotrice localisée dans la région 5' conservée de l'intégron [20].

Le promoteur P1 des intégrons de classe I a été caractérisé (figure 3). Il existe plusieurs variants de P1 (fort, moyen et faible) dont l'activité varie selon les combinaisons de séquences situées entre -35 et -10 pb [4]. Pour certains intégrons possédant le variant faible de P1, un second promoteur P2, plus fort, est présent et compense la faible activité promotrice de P1, la combinaison P1 faible et P2 restant tout de même d'activité inférieure à celle du variant fort de P1.

Généralement les transcrits sont plus courts que l'intégron, les terminaisons des transcrits semblant correspondre à la fin des cassettes. Cela peut s'expliquer par la présence du

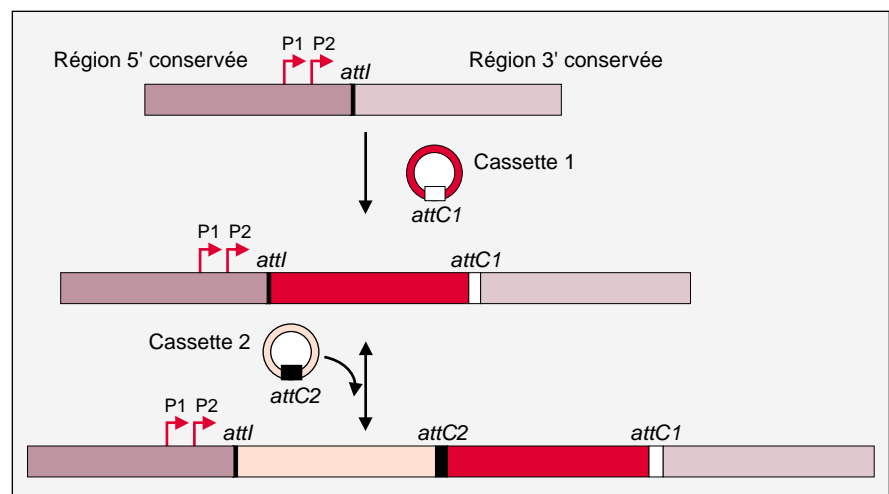


Figure 3. **Intégration des cassettes dans un intégron.** L'intégration des cassettes 1 puis 2 se fait préférentiellement au niveau du site de recombinaison *attI* situé dans la région 5' conservée de l'intégron. Différentes cassettes peuvent être intégrées, chacune possédant un site *attC* unique. L'expression des cassettes se fait à partir d'un promoteur commun P1-P2 situé également dans la région 5' conservée de l'intégron. L'excision de la cassette 1 se fait sous forme circulaire et a lieu par recombinaison entre le site *attC1* et le site *attC2*.

site *attC* qui pourrait arrêter la transcription (du fait de la formation de structures en boucles), ou bien agirait comme signal de clivage des transcrits [20]. Une même cassette aura un niveau d'expression différent selon qu'elle est proche ou éloignée de P1. Ainsi, les gènes localisés dans des cassettes éloignées du promoteur seront faiblement exprimés. La pression de sélection antibiotique peut favoriser des réarrangements de cassettes par recombinaison afin de positionner une cassette faiblement exprimée à une localisation plus proche du promoteur [20].

Dans le cas particulier où 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 [13]. Enfin, de rares cassettes possèdent leur propre promoteur telles que *cmlA1* [21], *cmlA2* [22], *qacF* [22].

L'expression des cassettes des intégrons de classe 2 serait aussi sous la dépendance d'un promoteur situé dans la région 5' conservée [23], celle des intégrons de classe 3 n'est pas encore documentée.

### **Les intégrons semblent être des structures anciennes mais leur origine est méconnue**

L'origine des intégrons, des gènes de résistance aux antibiotiques et des sites *attC* constitue une énigme qui n'a, pour l'instant, pas été élucidée de façon satisfaisante. On ignore également quand les gènes se sont associés aux sites *attC* pour former les cassettes. L'hypothèse selon laquelle les cassettes proviendraient d'une transcription inverse à partir d'une molécule d'ARNm permettrait d'expliquer la présence de la séquence palindromique *attC* située en 3' du gène [15] et serait cohérente avec la fonction de terminaison de la transcription du site *attC*. Cependant, certaines observations vont à l'encontre de cette hypothèse et suggéreraient plutôt une origine différente pour les gènes et les sites *attC*. En effet, la taille et la séquence des sites *attC* sont très variables. De plus, certains gènes homologues sont associés à des sites *attC* très différents (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*), et inversement, des gènes dif-

férents sont parfois associés à des sites *attC* homologues (*aadA*, *aadB*, *catB3*). Enfin, certains gènes possèdent leur propre promoteur.

L'origine des gènes de résistance retrouvés dans les cassettes est également inconnue. Des cadres ouverts de lecture présentant des homologies importantes avec des gènes associés à des cassettes ont été identifiés sur le chromosome de différentes espèces bactériennes. Ainsi les gènes *catB1* et *catB7*, apparentés aux gènes *catB2*, *catB3* et *catB5* conférant une faible résistance au chloramphénicol, ont été décrits respectivement sur le chromosome d'*Agrobacterium tumefaciens* et de *Pseudomonas aeruginosa* [15]. Cependant, aucun motif apparenté aux sites *attC* n'a été trouvé en aval de ces séquences, ce qui peut constituer un argument de plus en faveur d'une origine distincte des gènes et de leurs sites *attC*.

L'origine des sites *attC* reste elle aussi mystérieuse. Il existe sur le chromosome de certaines bactéries des groupes de séquences, inversées et répétées, comme les séquences ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) ou REP (*repetitive extragenic palindromic*) situées dans des régions intergénomiques. Cependant, leurs séquences consensus sont distinctes de la séquence consensus des sites *attC* [15].

Récemment, des structures assez semblables aux intégrons, les « super-intégrons », ont été décrites sur le chromosome de différentes espèces de bactéries notamment de *Vibrio cholerae*. Au moins 100 copies de séquences répétées sont en effet présentes en aval de gènes codant pour des toxines, des protéines ayant des fonctions métaboliques mais aussi en aval de cadres ouverts de lecture ne codant pour aucune protéine connue. Ces séquences, désignées VCR (*Vibrio cholerae repeat*), ont la même orientation et sont associées à un ou deux gènes. Les VCR sont homologues aux sites *attC* et possèdent en particulier la même séquence GTTRRRY en position 3' ainsi que la séquence complémentaire RYYAAC en position 5'. Cette organisation gène-VCR est donc très semblable à celle des cassettes des intégrons de résistance aux antibiotiques. Ces structures, qui peuvent comporter

une centaine de cassettes, ont donc été nommées « super-intégrons ». Elles ont été trouvées dans plusieurs souches de *Vibrio* isolées entre 1888 et 1992, ce qui indique qu'elles existaient avant l'ère des antibiotiques. D'autres « super-intégrons » ont aussi été mis en évidence chez *Xanthomonas*, *Pseudomonas* et *Shewanella* [24]. Chaque « super-intégron » contient aussi un site *attI* et un gène *intI* spécifiques, codant pour des intégrases ayant 40 % à 50 % d'identité avec les intégrases IntI1, IntI2 et IntI3 des intégrons. Il a été récemment montré que ces VCR sont des sites reconnus par l'intégrase IntI1, ce qui suggère que la fonction des « super-intégrons » est proche de celle des intégrons de résistance aux antibiotiques [25].

Les « super-intégrons » se différencient cependant des intégrons impliqués dans la résistance aux antibiotiques par certaines caractéristiques. Ils ont une taille plus importante, jusqu'à 100 cassettes, les gènes situés sur ces cassettes ne sont pas toujours orientés dans la même direction, et leurs séquences répétées sont très conservées. Chaque « super-intégron » semble spécifique de l'espèce qui l'héberge puisque le degré de divergence de leurs séquences répétées est semblable à celui de leur gène *intI*.

Ces « super-intégrons » pourraient constituer la source des trois classes d'intégrons impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Les intégrons de résistance aux antibiotiques auraient évolué à partir des « super-intégrons » par le biais de la capture d'un gène *intI* et un site *attI* dans des structures mobiles, de type transposon. Ces structures auraient ensuite capturé, sous l'effet de la pression de sélection antibiotique, des gènes de résistance provenant des différents *pools* de cassettes contenus dans les « super-intégrons » [24].

### **Conclusions**

Les intégrons possèdent de nombreux gènes de résistance et jouent probablement un rôle important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Bien que leur découverte soit récente, la description des « super-

intégrons » indique qu'il s'agirait en fait de structures anciennes qui pourraient donner aux bactéries une capacité d'adaptation rapide par un système de capture de gènes permettant d'acquérir un avantage sélectif (fonctions biochimiques, facteurs de virulence, résistance aux antibiotiques).

L'importance théorique et pratique des intégrons justifie les nombreuses études récentes entreprises afin de comprendre leur genèse et leur fonctionnement ■

**Marie-Cécile Ploy**  
**François Denis**

*Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, EP Cnrs 118, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges Cedex, France.*

**Thierry Lambert**

*Hôpital Saint-Michel, Paris, Faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry, France.*

## RÉFÉRENCES

1. Courvalin P. Évolution de la résistance aux antibiotiques. *Med Sci* 1997; 13: 925-6.
2. Roy PH. Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. *Med Sci* 1997; 13: 927-33.
3. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989; 3: 1669-83.
4. Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updates* 1998; 1: 109-19.
5. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-91.
6. Gonzalez G, Sossa K, Bello H, Dominguez M, Mella S, Zemelman R. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 161: 125-8.
7. Dalsgaard A, Forslund A, Tam NV, Vinh DX, Cam PD. Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class 1 integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 734-41.
8. Gibreel A, Skold O. 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 Chemother* 1998; 42: 3059-64.
9. Nesvera J, Hochmannova J, Patek M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 169: 391-5.
10. Clark NC, Olsvik O, Swenson JM, Spiegel CA, Tenover FC. Detection of a streptomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 157-60.
11. Martin C, Timm J, Rauzier J, Gomez-Lus R, Davies J, Gicquel B. Transposition of an antibiotic resistance element in Mycobacteria. *Nature* 1990; 345: 739-43.
12. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, et al. A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1612-5.
13. Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 1995; 141: 3015-27.
14. Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 1997; 26: 731-45.
15. Recchia GD, Hall RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 1997; 5: 389-94.
16. Collis CM, Hall RM. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* 1992; 6: 2875-85.
17. Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 1992; 174: 1574-85.
18. Hansson K, Skold O, Sundstrom L. Non-palindromic *attI* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol Microbiol* 1997; 26: 441-53.
19. Francia MV, de la Cruz F, Garcia Lobo JM. Secondary sites for integration mediated by the Tn21 integrase. *Mol Microbiol* 1993; 10: 823-8.
20. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 155-62.
21. Bissonnette L, Champetier S, Buisson JP, Roy PH. Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J Bacteriol* 1991; 173: 4493-502.
22. Ploy MC, Courvalin P, Lambert T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2557-63.
23. Sundstrom L, Roy P, Skold O. Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *J Bacteriol* 1991; 173: 3025-8.
24. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Super-integrons. *Res Microbiol* 1999; 150: 641-51.
25. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 1998; 280: 605-8.

## TIRÉS À PART

M.-C. Ploy.