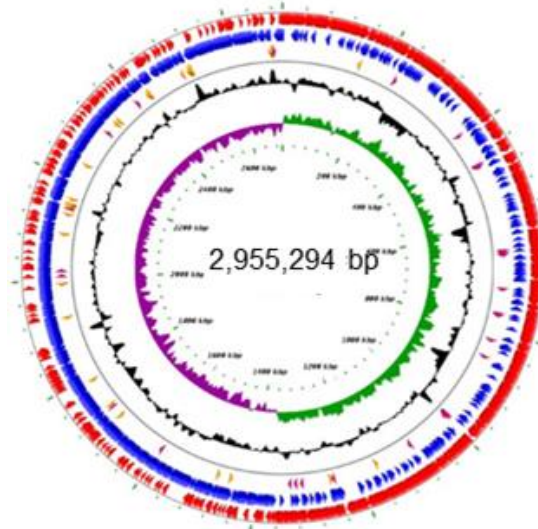
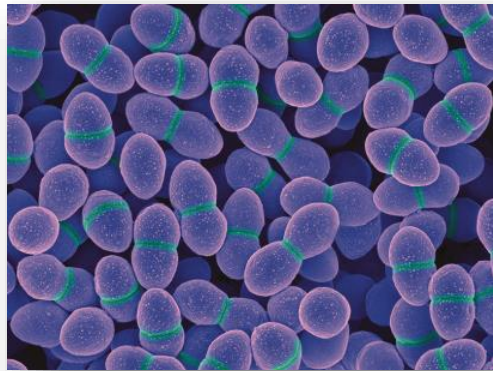
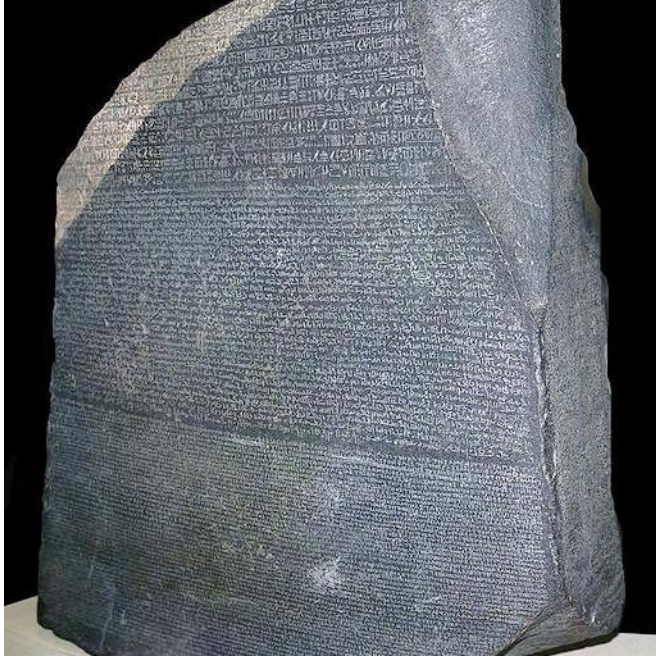


LA GENOMIQUE: UN OUTIL POUR COMPRENDRE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Une histoire Caennaise en 3 épisodes



LA GENOMIQUE: La pierre de Rosette des biologistes



La pierre de Rosette
196 avant J-C

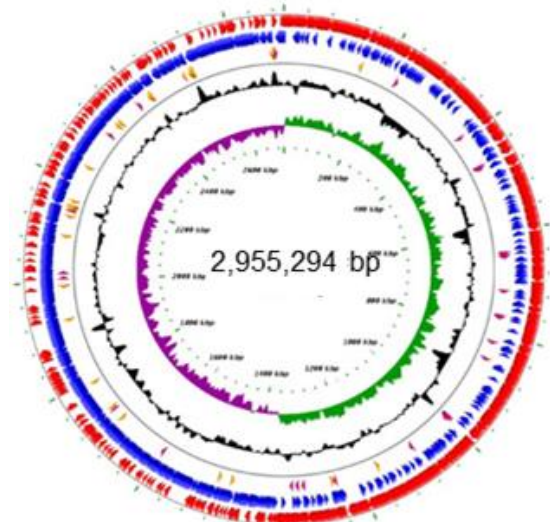
Découverte en juillet 1799 durant la campagne de Bonaparte en Égypte

Jean-François Champollion: 1822, déchiffrement des hiéroglyphes

1995: premier génome bactérien (*Haemophilus influenzae*)

2003: Séquence du génome humain

Séquence génomique = Outil de déchiffrement



Liste OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques

Priorité 1: CRITIQUE

Acinetobacter baumannii, résistance aux carbapénèmes

Pseudomonas aeruginosa, résistance aux carbapénèmes

Enterobacteriaceae, résistance aux carbapénèmes, production de BLSE

Priorité 2: ÉLEVÉE

Enterococcus faecium, résistance à la vancomycine

Staphylococcus aureus, résistance à la méthicilline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine

Helicobacter pylori, résistance à la clarithromycine

Campylobacter spp., résistance aux fluoroquinolones

Salmonellae, résistance aux fluoroquinolones

Neisseria gonorrhoeae, résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones

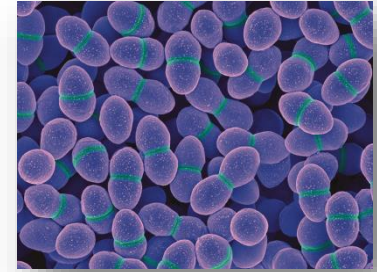
Priorité 3: MOYENNE

Streptococcus pneumoniae, insensible à la pénicilline

Haemophilus influenzae, résistance à l'ampicilline

Shigella spp., résistance aux fluoroquinolones

Enterococcus faecium



- Membre de la microflore intestinale humaine, coque à Gram +, anaérobie, en courtes chaînettes ou paires
- Une des principales causes d'infections associées aux soins dans le monde
- Plasticité génomique importante → acquisition de résistances (ampicilline, **vancomycine**) (ERV)
- Recherche d'alternatives thérapeutiques face aux ERV: **Tigécycline, Daptomycine**

Episode 1: Un nouvel opéron *van* chez *E. faecium*?

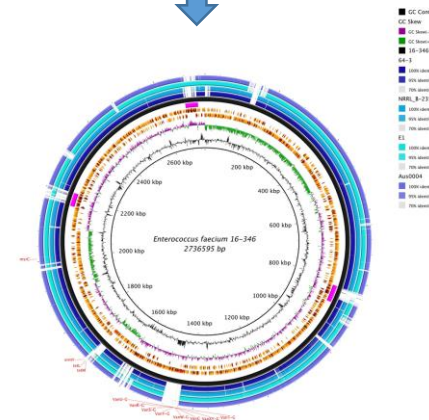
Isolat clinique d'*E. faecium* 16-346 (Rhône)



CMI vancomycine = 8 mg/L (R)
CMI teicoplanine = 0,5 mg/L (S)
CMI erythromycine > 4 mg/L (R)
CMI tetracycline > 16 mg/L (R)
CMI rifampicine > 4 mg/L (R)



PCR gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanM*, *vanN* : **NEGATIVES !**



Séquençage complet du génome

Episode 1: Un nouvel opéron *van* chez *E. faecium*?

Analyse du Résistome:

Gènes *erm*(Y) et *msr*(C): Résistance aux macrolides

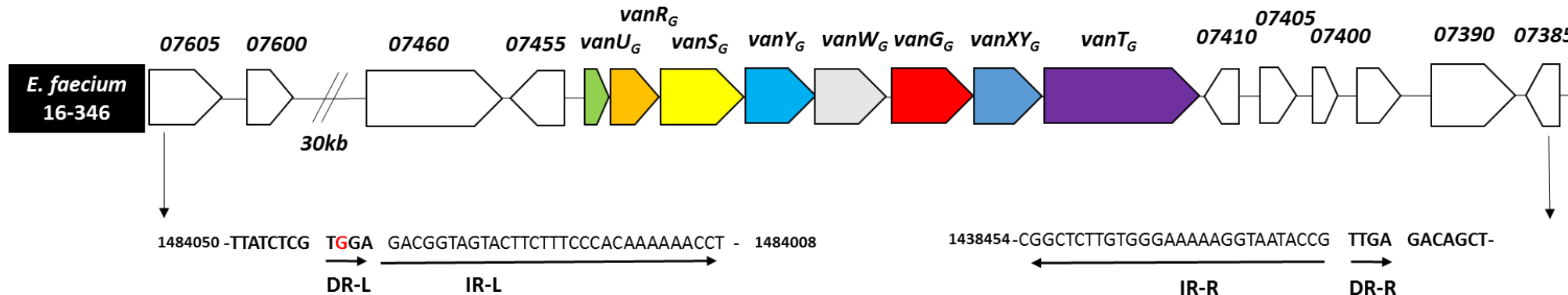
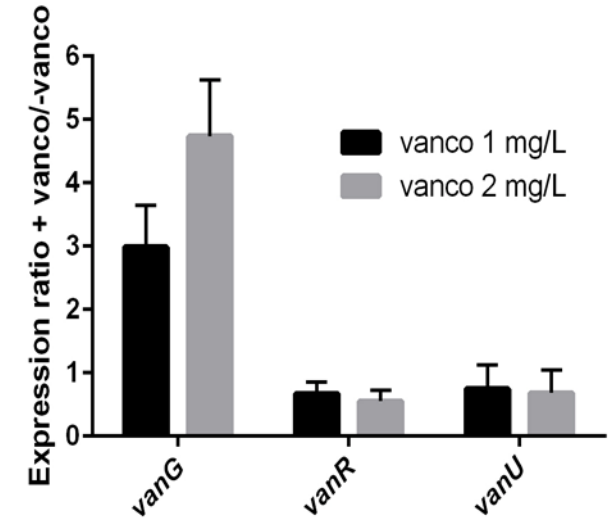
Gènes *tet*(M) et *tet*(L): Résistance à la tétracycline

Un nouvel opéron *van*!

Homologue à l'opéron *vanG* d'*E. faecalis*

Expression inductible par la présence d'antibiotique

Dans un élément génétique mobile putatif



Episode 1: Un nouvel opéron *van* chez *E. faecium*?

	Type of resistance					
	VanA	VanM	VanB	VanD	VanN	VanG
Level of resistance	High	High	Variable	Moderate	Low	Low
MIC (mg/L)						
Vancomycin	64-1,000	>256	4-1,000	64-128	16	8
Teicoplanin	16-512	48-128	0.5-1	4-64	1	0.5
Expression	Inducible	?	Inducible	Constitutive	Constitutive	Inducible
Location	Plasmid (Chromosome)	Plasmid (Chromosome)	Chromosome (Plasmid)	Chromosome (Plasmid)	Chromosome	Chromosome
Conjugative transfer	+	+	+	-	+	-
Precursors end	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Prevalence	Very high	Very low	High	Low	Very low	Very low

Résistance par modification de la cible (acides aminés terminaux des précurseurs du peptidoglycane)

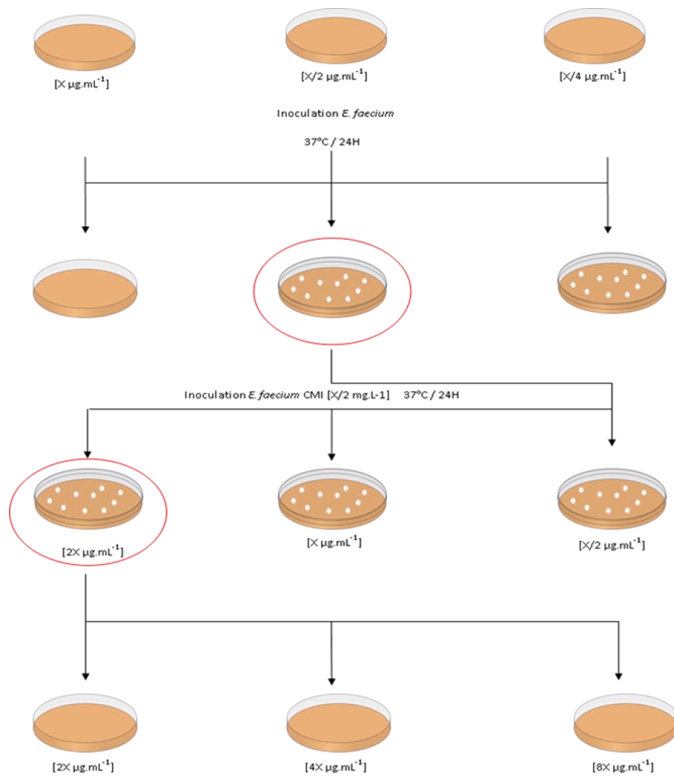
Nouvel opéron chez *E. faecium* à intégrer dans le panel des gènes de résistance à surveiller

Episode 2: Acquisition de résistance à la Tigécycline

Très peu d'Entérocoque résistants à la tigécycline (tétracycline dérivée de la minocycline)

Développement de résistance *in vitro* par accroissement progressif de la concentration en antibiotique

Comparaison Souche de départ (sensible) / Souche résistante (mutant isogénique)



WT CMI $0,03\mu\text{g}/\text{mL}$

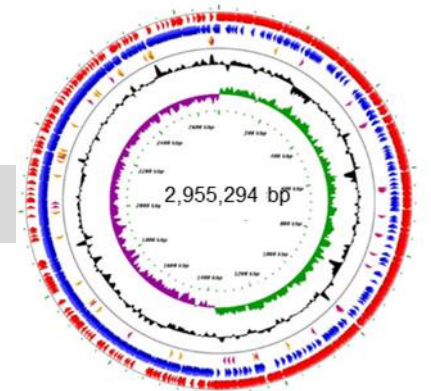


Mutant CMI $0,25\mu\text{g}/\text{mL}$

Pas « résistant » mais de « sensibilité diminuée »



Génomique comparative

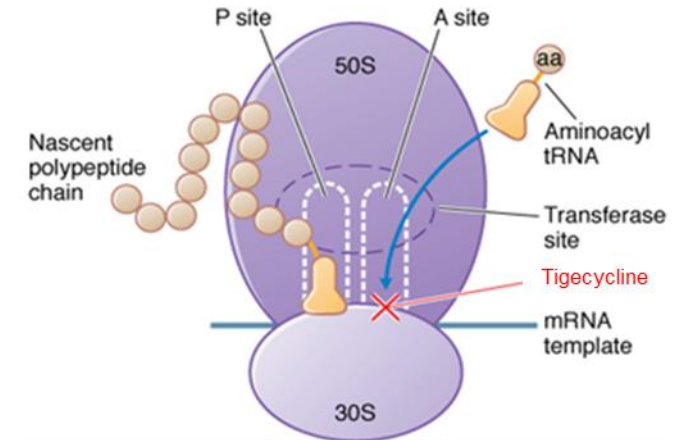


Episode 2: Acquisition de résistance à la Tigécycline

TABLE 4 Sequence changes in the AusTig mutant compared to the sequence of wild-type strain *E. faecium* Aus0004^a

Gene	Product	Nucleotide change (position)	Predicted amino acid change
<i>efau004_00094</i>	S10 protein of the 30S ribosomal subunit	G → T (97,523)	Asp60 → Tyr
<i>efau004_01228</i>	Cation transporter	T → A (1,257,670)	Asn80 → Ile
<i>efau004_01636</i>	Hypothetical protein	G → T (1,651,985)	Val54 → Leu
<i>efau004_02455</i>	L-Lactate oxidase	G → A (2,474,071)	Ala100 → Thr

^a Gene names and nucleotide positions are from the annotated sequence of the *E. faecium* Aus0004 strain (GenBank accession no. NC_017022) (14).



Action de la tigécycline

Protéine S10 de la SU ribosomique 30S ... Cible des tétracyclines



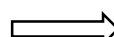
Recherche de cette mutation sur d'autres souches

2 nouveaux mutants *in vitro* à partir d'une autre souche

2 isolats cliniques de «sensibilité diminuée» à la tigécycline

Episode 2: Acquisition de résistance à la Tigécycline

Validation de notre hypothèse avec d'autres souches

-  Mutants *in vitro*
-  Souches cliniques résistantes à la tigécycline
-  Souches WT

	Aus004	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKD	60
	HM1070	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKD	60
	AusTig	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYK Y	60
	HMtig1	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYK Y	60
	HMtig2	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYK Y	60
	EF16	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATH E YKD	60
	EF22	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATH E YKD	60
	Aus004	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
	HM1070	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
	AusTig	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
	HMtig1	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
	HMtig2	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
	EF16	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
	EF22	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	

FIG 1 Alignment of RpsJ sequences from *E. faecium* strains. Mutant AusTig and mutants HMtig1 and HMtig2 are *in vitro* mutants from the *E. faecium* Aus0004 and HM1070 wild-type strains, respectively. EF16 and EF22 are *vanA*-positive *E. faecium* clinical isolates. Amino acid substitutions (compared to the sequences of the wild-type strains) are indicated in bold.

Augmentation des CMI aux autres tétracyclines (tétracycline, doxycycline, minocycline)

Episode 2: Acquisition de résistance à la Tigécycline

- Mutants «résistants» difficiles à obtenir... c'est une bonne nouvelle!
- La sensibilité diminuée est essentiellement liée à une mutation sur le gène *rpsJ*
- Cette résistance s'accompagne d'une baisse de sensibilité aux autres tétracyclines
 - Mutation à surveiller! (attention à la pression de sélection)

Episode 3: Acquisition de sensibilité à la daptomycine

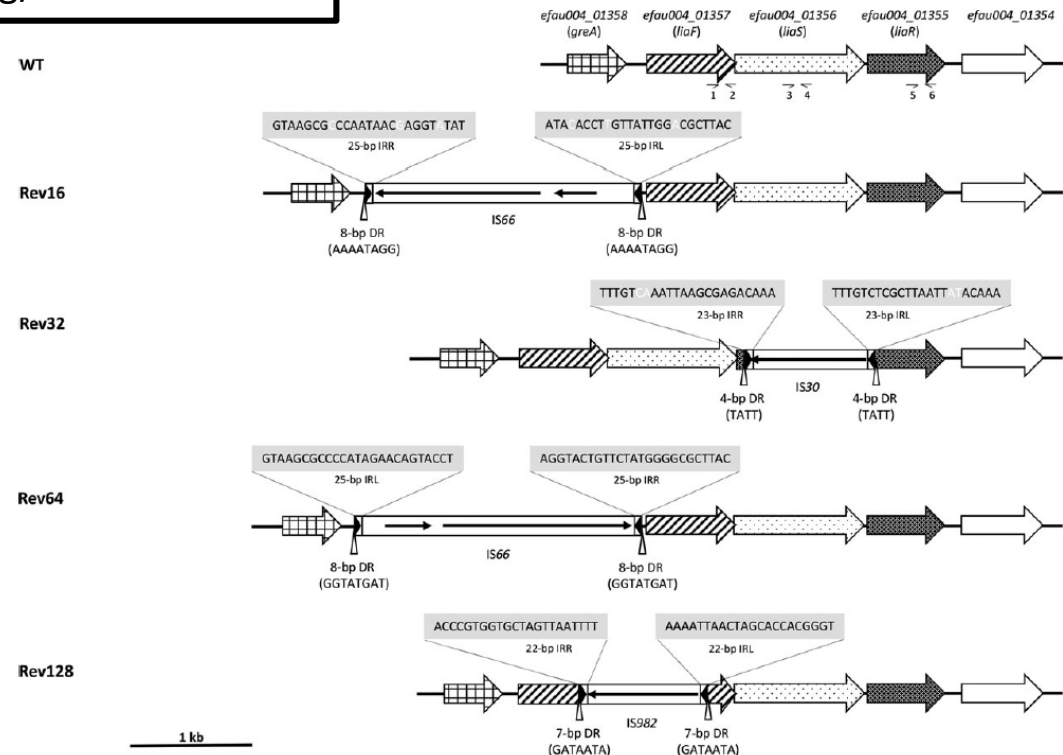
MUTANTS		REVERTANTS	
Mut16	CMI 16 mg/L → Mutation <i>liaS</i>	→ Rev16	CMI 0,12 mg/L IS66
Mut32	CMI 32 mg/L → Mutation <i>liaS</i>	→ Rev32	CMI 0,06 mg/L IS30
Mut64	CMI 64 mg/L → Mutations <i>liaS+cls</i>	→ Rev64	CMI 1 mg/L IS66
Mut128	CMI 128 mg/L → Mutations <i>liaS+cls</i>	→ Rev128	CMI 0,12 mg/L IS982

(CMI souche sauvage 2 mg/L)

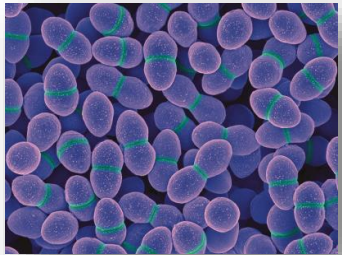
Accumulation séquentielle de mutations permettant la résistance

Inactivation de l'opéron *liaFSR* par insertion d'IS permettant une réversion vers une hypersensibilité

Adaptation à la **présence** ou **absence** de pression de sélection



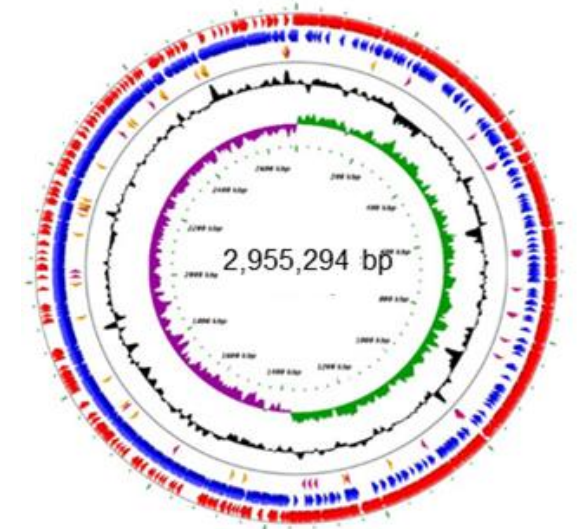
LA GENOMIQUE: UN OUTIL POUR COMPRENDRE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES



Identification d'un nouvel élément génétique mobile responsable de la résistance à la vancomycine chez *E. faecium*.

Identification d'un mécanisme de résistance à la tigécycline

Identification d'un mécanisme expliquant un retour à la sensibilité à la daptomycine



MERCI DE VOTRE ATTENTION

Equipe « Antibio-résistance »

Anne Dhalluin
Marion Aubourg

Sébastien Galopin
Mamadou Godet



Vincent Cattoir



Simon Le Hello
Olivier Join-Lambert
Christophe Isnard
François Guérin