



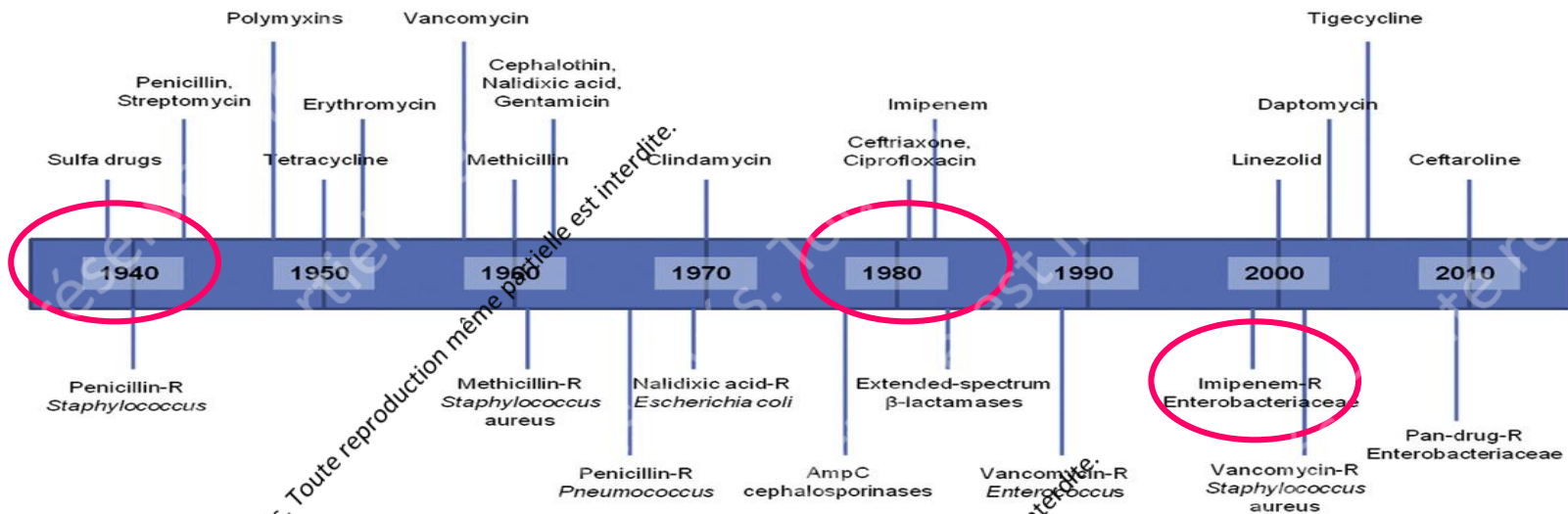
UNIVERSITE TUNIS EL MANAR
FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS



Séquences d'insertion et résistance aux carbapénèmes chez
Acinetobacter baumannii




CHIHI HELA



L'émergence récente et la propagation dans le monde entier des gènes codant pour des carbapénémases chez les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, confirme que les gènes de résistance peuvent se propager rapidement entre bactéries, et constitue l'inquiète de la communauté scientifique .

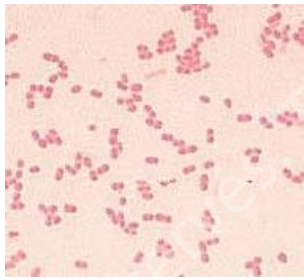
INTRODUCTION



Restées longtemps méconnues en raison de leur faible pouvoir pathogène et de leur taxonomie imprécise, les bactéries du genre *Acinetobacter* sont marquées par une évolution impressionnante de la résistance aux antibiotiques en termes de rapidité et de diversité des mécanismes et de matériels génétiques mis en jeu.



L'espèce *A.baumannii* apparaît comme l'un des pathogènes les plus problématiques au sein des établissements de soins et se place parmi les organismes qui menacent l'arsenal thérapeutique actuel.



- ★ bacilles ou coccobacilles à Gram négatif, immobiles, aérobies stricts, non sporulés.
- ★ Les Acinetobacter sont des bactéries ubiquitaires présentes dans le sol, l'eau mais aussi dans les végétaux. Le germe a été également isolé sur des animaux, des produits alimentaires.
- ★ Isolé chez l'homme : tube digestif, peau (zones humides) et sphère ORL.

Infections à *A. baumannii*

Infections nosocomiales

- Pneumonies
- Infections de la peau et des tissus mous.
- Bactériémies .
- Méningites secondaires .
- Infections de l'appareil urinaire .

Infections communautaires

- Pneumonies en zone tropicale.
- Méningites.

L'espèce *A. baumannii*, qui représente plus de 90 % des isolats cliniques, possède des caractéristiques uniques qui favorisent sa persistance dans le milieu hospitalier. Ce microorganisme se propage facilement dans l'environnement et peut persister dans ce milieu pendant plusieurs jours, un facteur qui peut expliquer sa capacité à entraîner des épidémies.

A. baumannii et résistance aux β -lactamines

Résistance naturelle

Enzymatique:

- Gène *bla_{ampC}* codant pour la céphalosporinase

AmpC

- Gène *bla_{OXA-51}* codant pour l'oxacillinase

OXA-51

Non enzymatique:

-Faible perméabilité

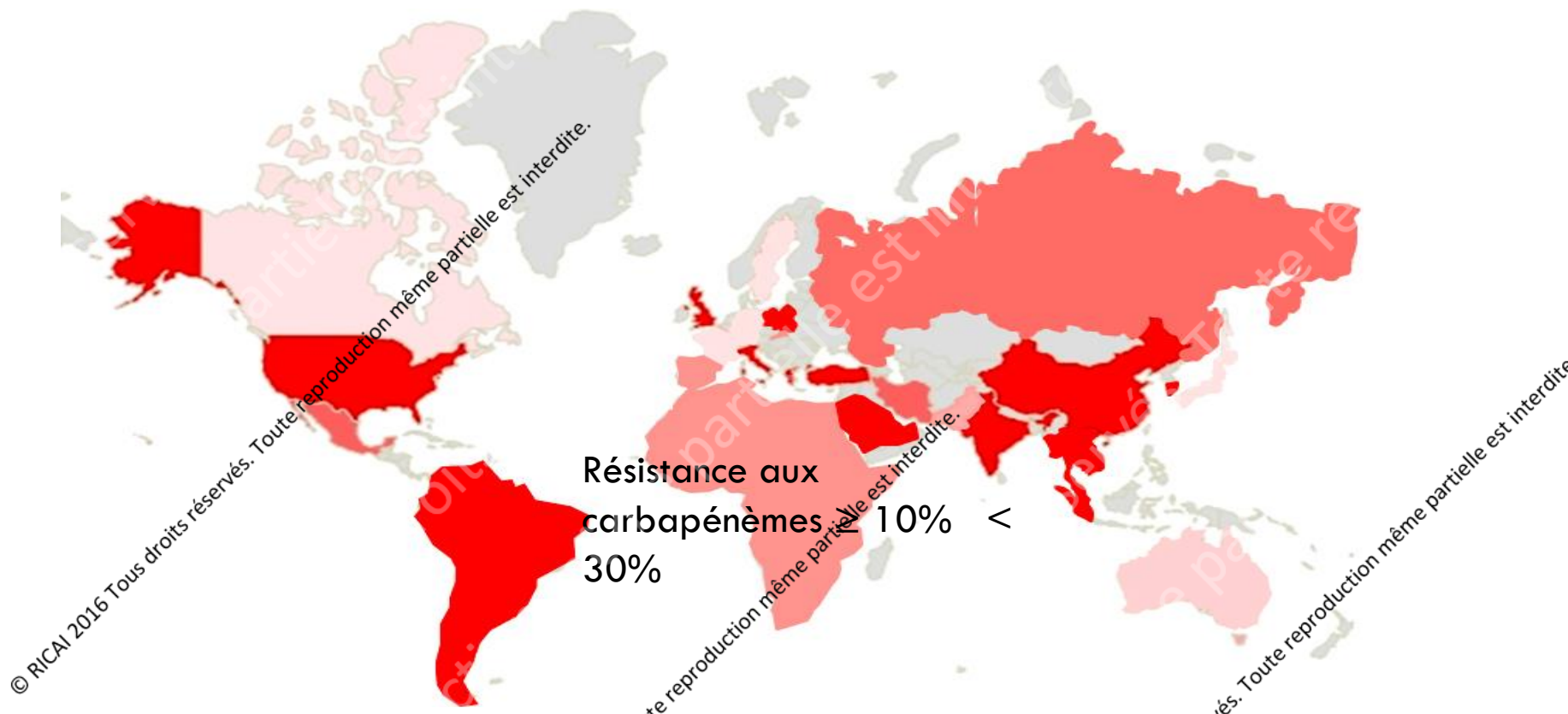
Résistance acquise

Enzymatique:

- Surexpression des gènes codant pour **AmpC** et **OXA-51**
- Acquisition de gènes codant pour des :
 - *Pénicillines : **TEM-1, SCO-1**
 - * β -lactamases à spectre étendu (BLSE) : **PER, VEB, SHV, CTX-M, GES**
 - Métallo- β -lactamases : **IMP, VIM, SIM, NDM**
 - *Oxacillinases : **OXA-23, OXA-40, OXA-58 et OXA-143**

Non enzymatique

- Surexpression des systèmes d'efflux
- Imperméabilité par modification de porine



Résistance aux carbapénèmes < 10% < 30%

Acquisition de gènes codant pour des :

β -lactamase à spectre étendu : **GES-14, GES-11**

Métallo- β -lactamases : **IMP, VIM, SIM, NDM**

Oxacillinases : **OXA-23, OXA-40, OXA-58 et OXA-143**

INTRODUCTION

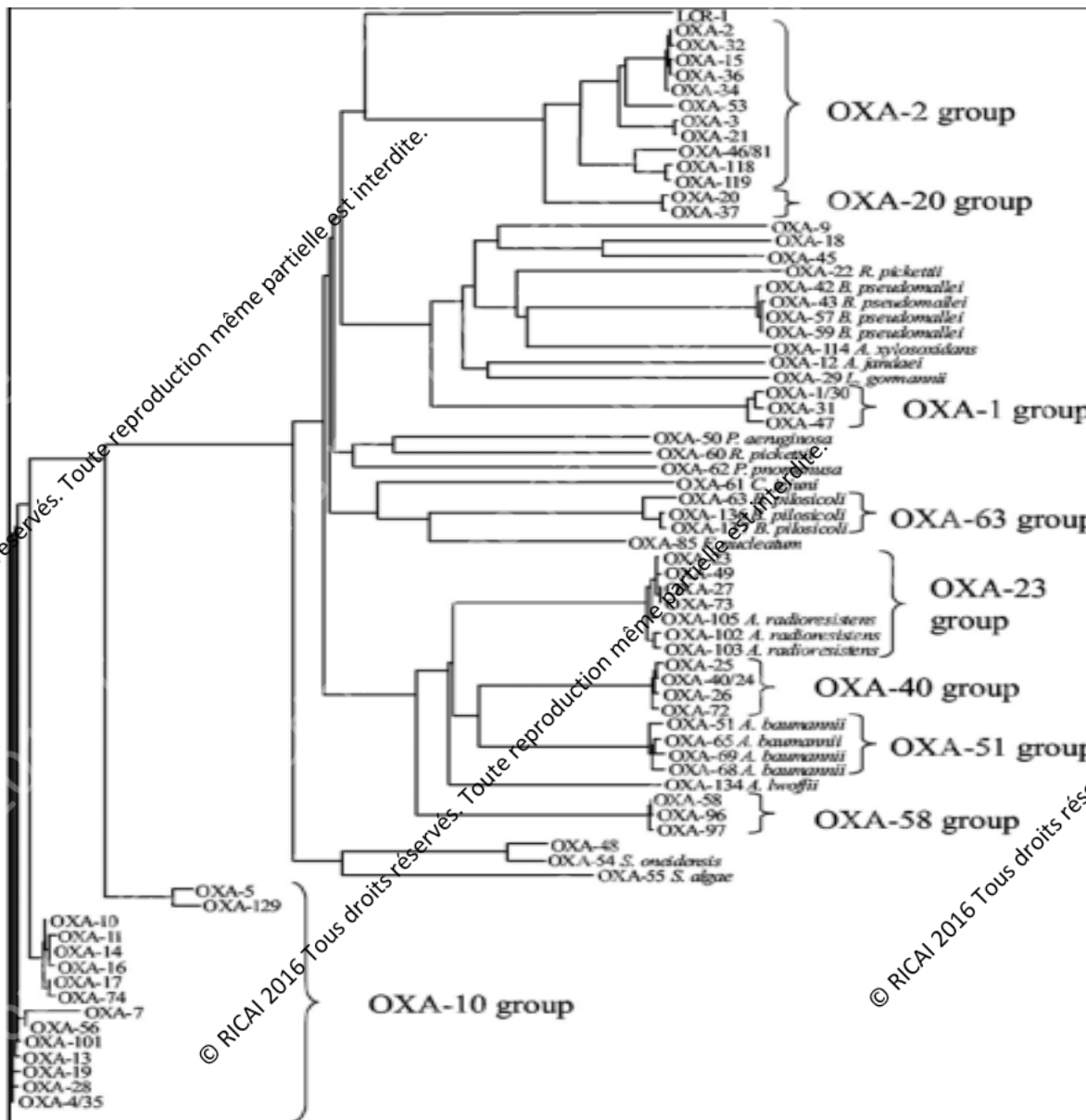
© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Le principal problème : les oxacillinases aux propriétés de carbapénémase

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

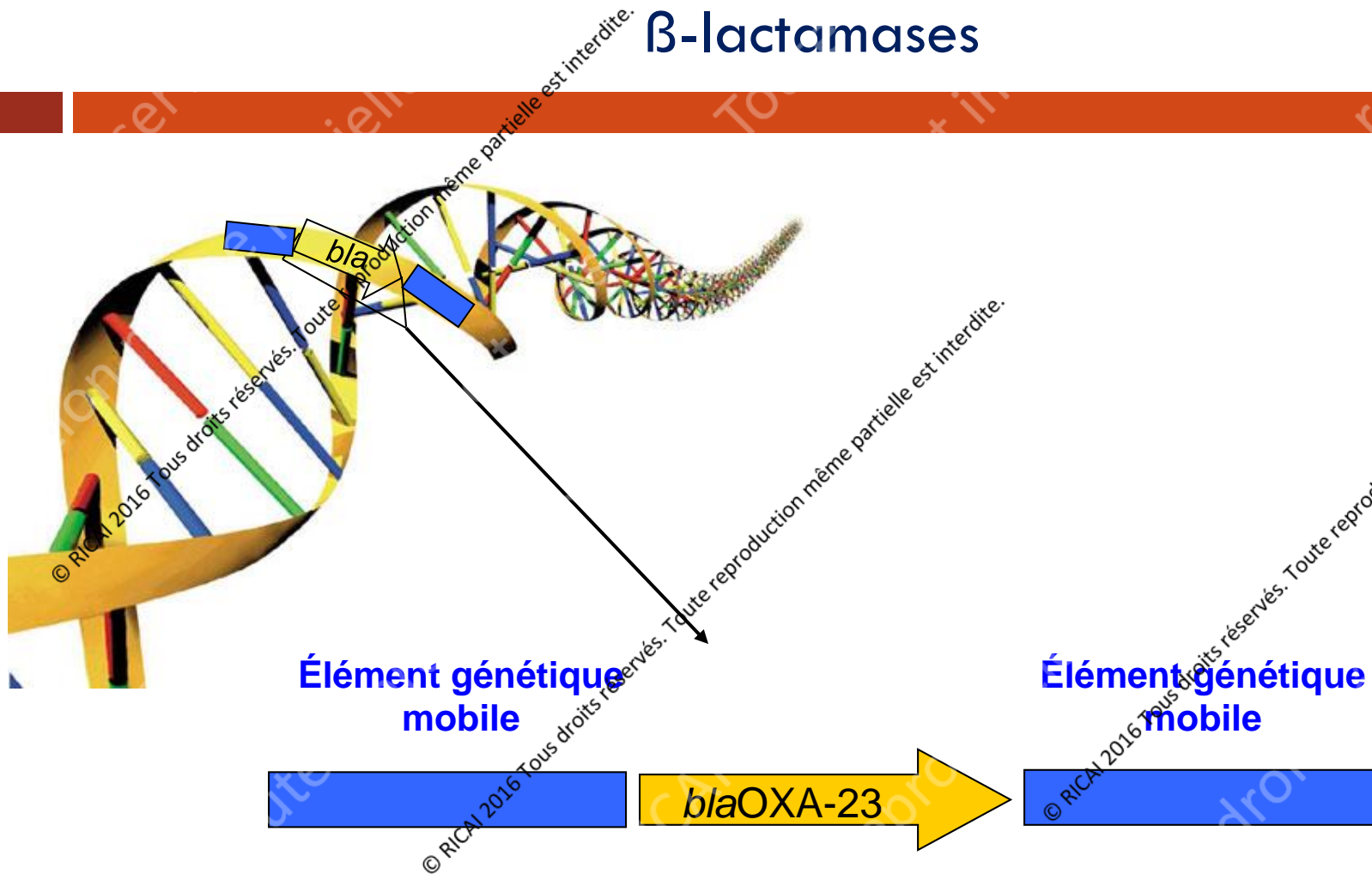
© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

INTRODUCTION

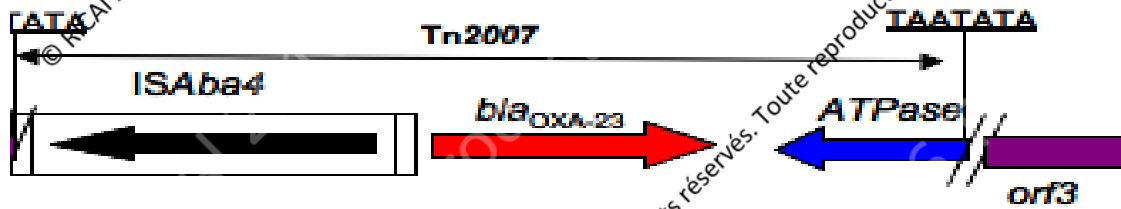
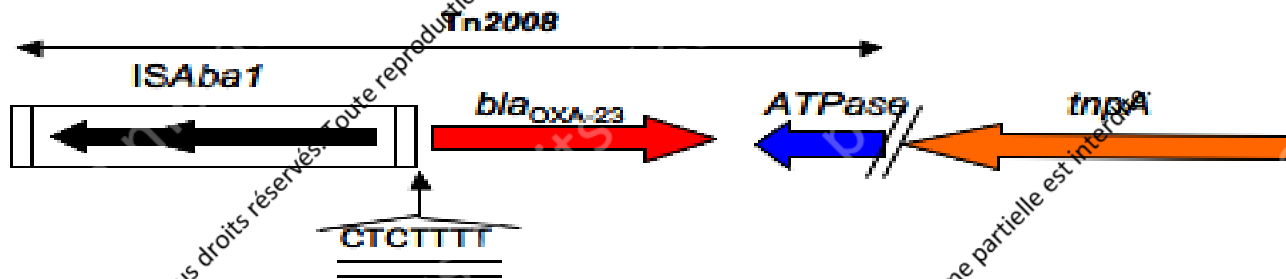
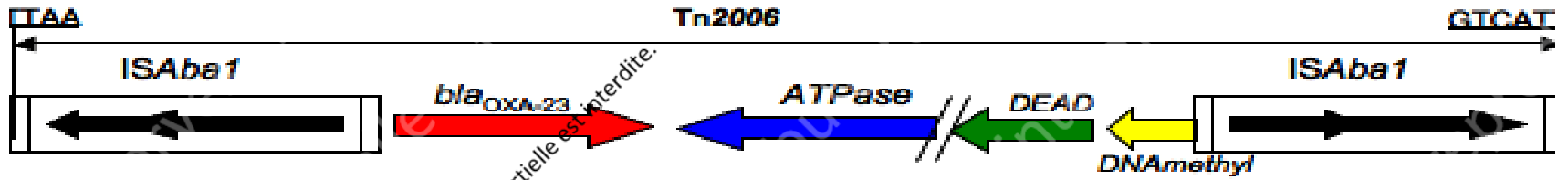


INTRODUCTION

Environnement génétique des gènes *bla* codant pour les β -lactamases



Exemple d'élément génétique mobile : les séquences d'insertion

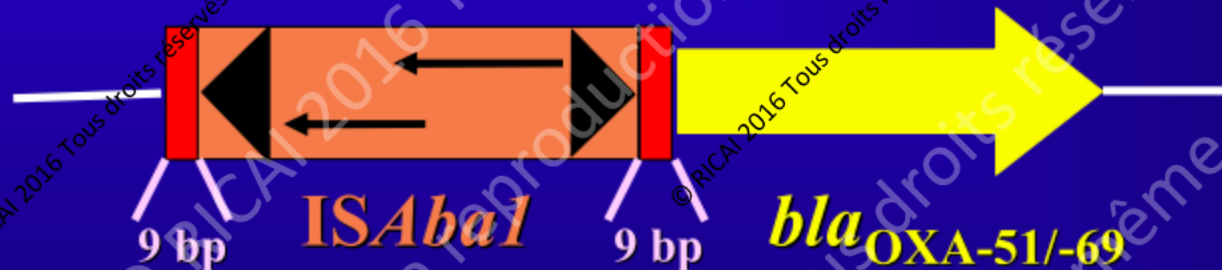


© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

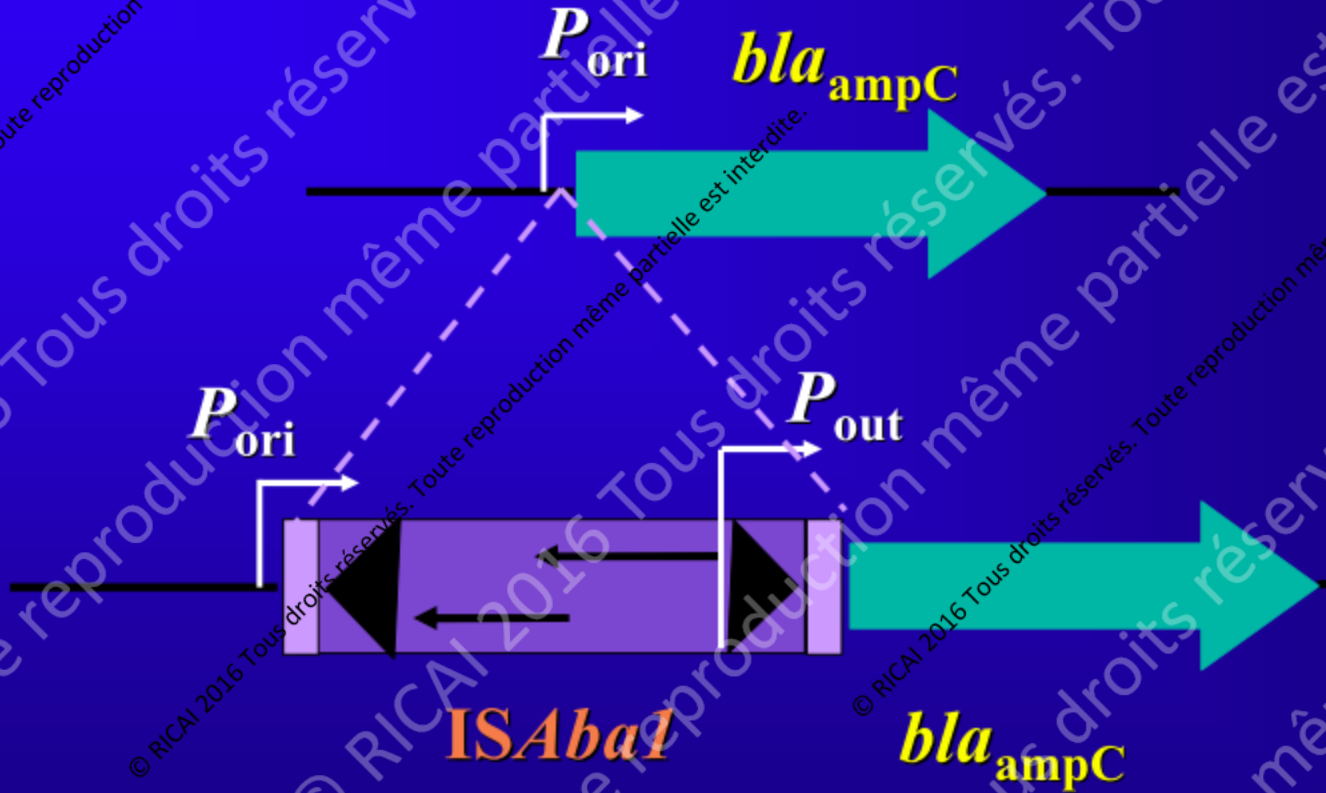
This oxacillinase might likely play a role in resistance to carbapenems

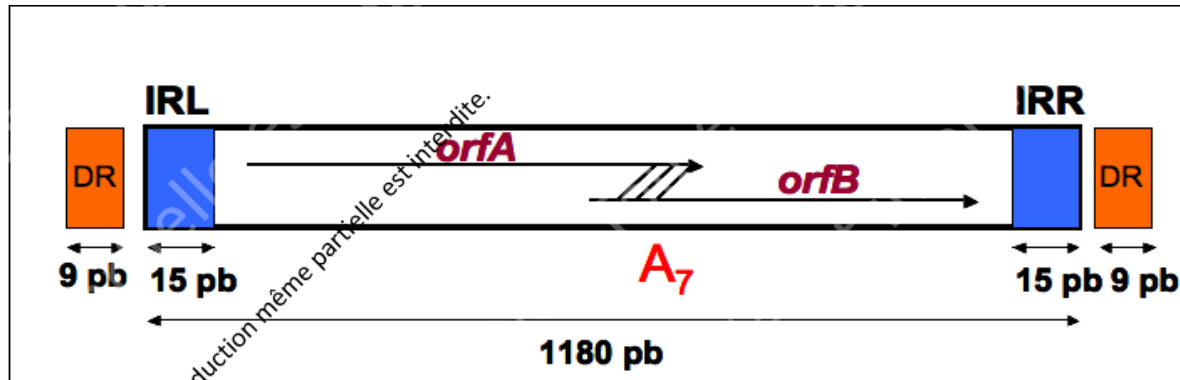
The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*

Jane F. Turton¹, M. Elaina Ward², Neil Woodford², Mary E. Kaufmann¹, Rachel Pike², David M. Livermore² & Tyrone L. Pitt¹



© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.





- Famille IS4
- Séquence de 1180 pb
- IR de 15 pb
- DR de 9 pb
- Les deux *orfs* pourraient coder pour une transposase

- En Tunisie, les infections causées par les BMR imposent un fardeau économique considérable à la société.

Acinetobacter, et aujourd'hui l'utilité clinique de cette classe est menacée par l'émergence de résistances favorisées par son utilisation de plus en plus importante. La multi-résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii* est d'incidence croissante et inclus le plus souvent la résistance aux β -Lactamines.

Dans le cadre de nos activités au sein du laboratoire de Biochimie et de Technobiologie à la faculté des sciences sur la résistance d'Acinetobacter aux antibiotiques et face à des situations épidémiologiques graves concernant ces BMR pathogènes émergentes, il est essentiellement impératif de mener une étude multicentrique afin de surveiller l'émergence de nouveaux genes de résistance et son évolution dans le temps .

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Objectifs scientifiques

C'est pourquoi nous avons entrepris une étude rétrospective de 2004 à 2010 durant laquelle une collection composée de 33 souches d'*A.baumannii* multirésistantes isolées au sein de 2 hôpitaux différents a été constituée.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Objectifs scientifiques

Étude phénotypique de la résistance

Résultats

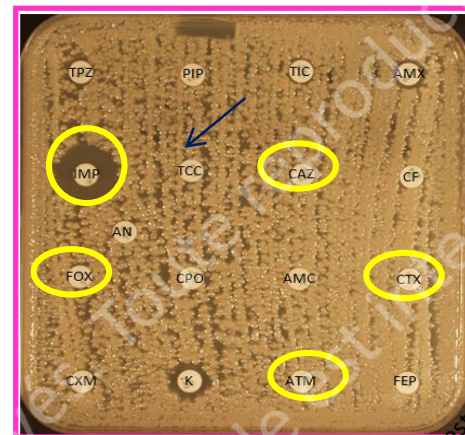
Étude phénotypique de la résistance

➤ Toutes les souches présentent le même profil de la résistance aux β -lactamines testées ainsi qu'à l'association β -lactamine-inhibiteur de β -lactamase (ticarcilline-acide clavulanique).

Elles présentent aussi une multi résistance aux céphalosporines de deuxième et de troisième génération .

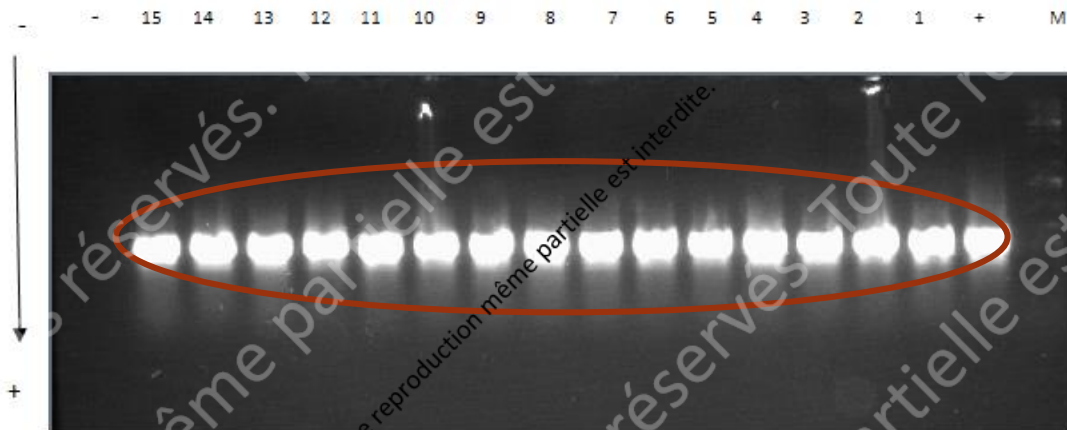
La plupart des souches sélectionnées montrent une résistance plus au moins élevée pour l'imipénème.

Toutes les souches isolées montrent une résistance élevée vis-à-vis l'acide nalidixique (NAL).



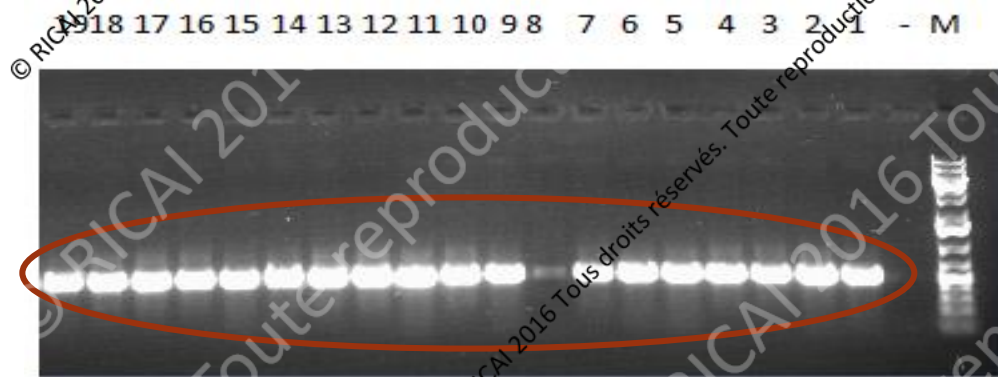
Caractérisation des gènes de résistance enzymatique aux β -lactamines

Résultats



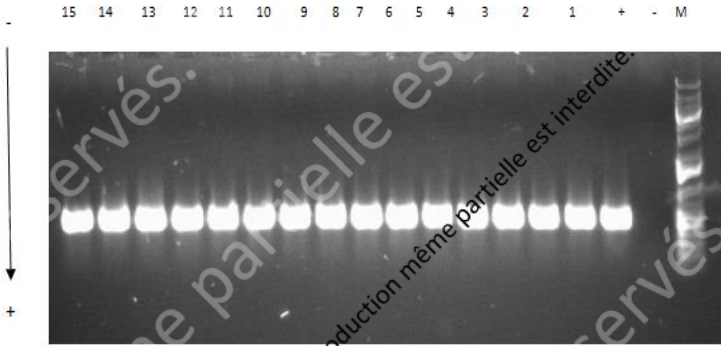
**Collection Institut Orthopédique
Mohamed Kassab.**

La céphalosporinase chromosomique AmpC a été identifié chez toute la collection de l'hôpital Militaire ainsi qu'au niveau de celle de l'Institut Orthopédique Mohamed Kassab.



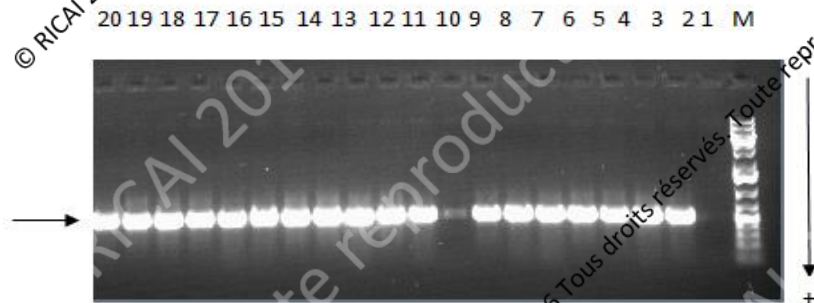
Collection Hôpital Militaire.

La bande de taille 549 pb présente dans toute la collection correspond au gène *bla*_{AmpC} après séqueçage du gène.

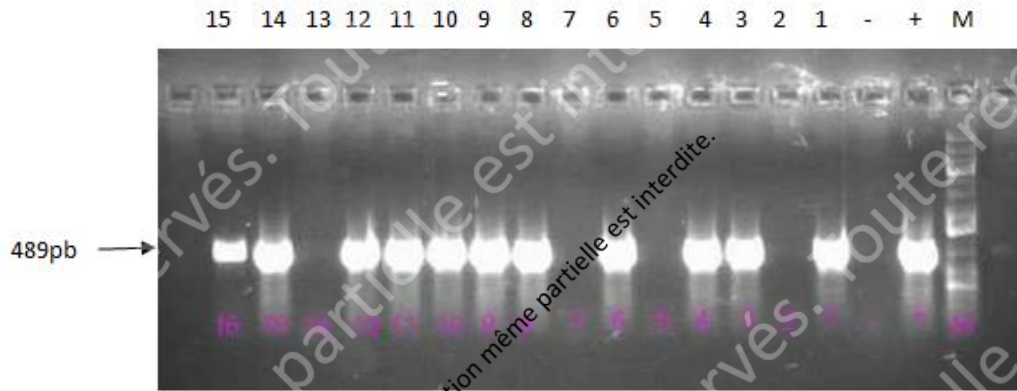


**Collection Institut Orthopédique
Mohamed Kassab.**

Des produits d'amplifications de tailles 742pb qui correspondent aux gènes *bla*_{OXA-51} ont été obtenues pour toutes les souches testées après séquençage .

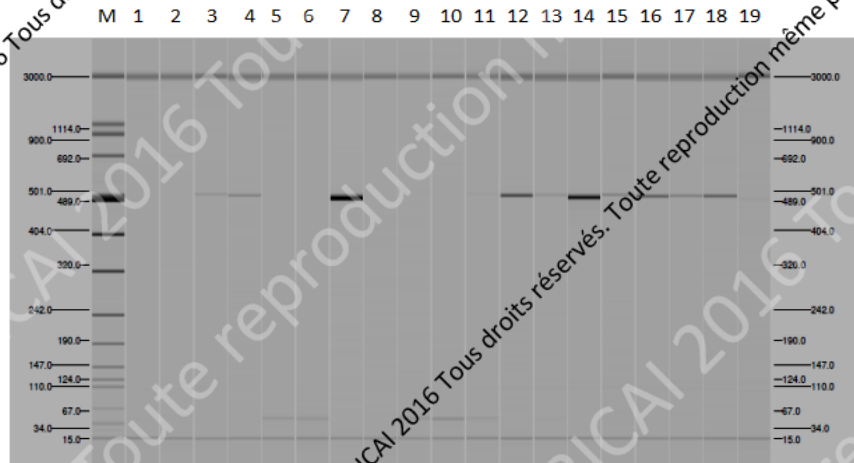


Collection Hôpital Militaire.



Les souches qui montrent bien la présence de l'OXA -23 sont également résistantes à l'imipénème dont les valeurs des CMI s'échelonnent entre 8 et 32 µg/ml.

Collection Institut Orthopédique Mohamed Kassab.

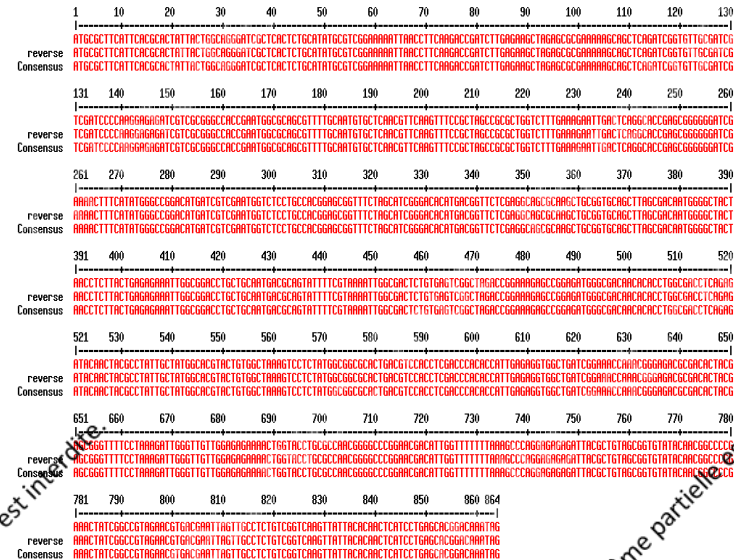


Toutes les souches qui sont positives pour l'OXA-23 ont été isolées au sein de service de réanimation excepté la souche *A.baumannii* AB 290 qui a été isolée à partir de service de maternité.

Collection Hôpital Militaire.

Résultats

Identification du gène *bla*_{OXA-23} au sein des souches d'*Acinetobacter baumannii*



Deux souches *A.baumannii* AB 4037 et *A.baumannii* AB 27355 isolées séparément. La première a été isolée en 2006 au niveau de service de réanimation de l'Hôpital Militaire de Tunis. Tandis que la deuxième souche a été isolée en 2010 au sein de service de réanimation dans l'Institut Orthopédique Mohamed Kassab de Tunis.

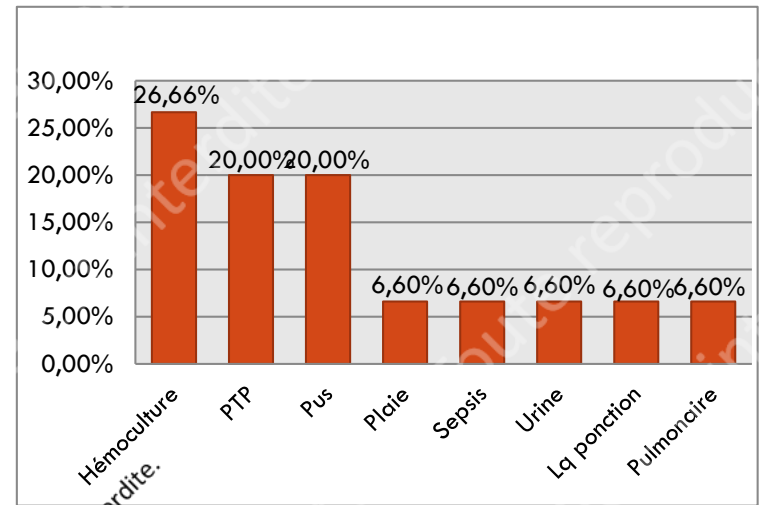
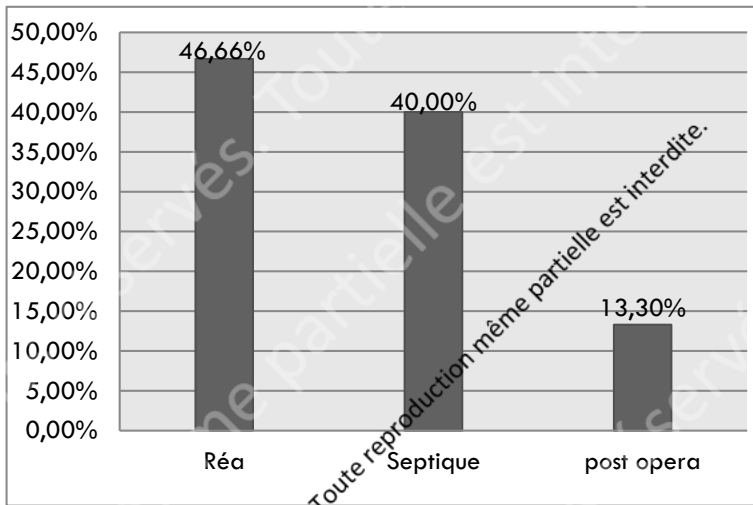
Ces deux isolats montrent bien la coexistence des deux carbapénémases : *bla*_{OXA-23} et *bla*_{GES-11}.

Étude de la clonalité des souches d' *A. Baumannii*

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



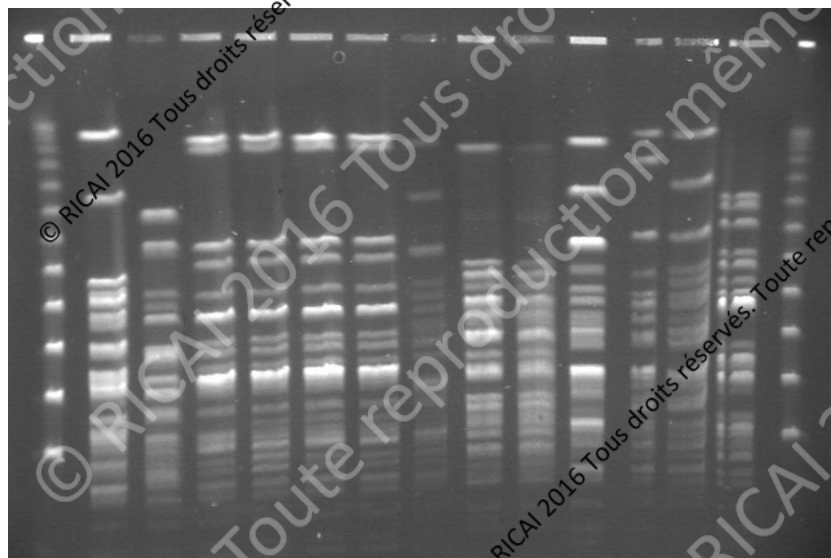
15 souches d'*A.baumannii* de phénotype BMR isolées des différents patients de différents services (service réanimation 46,66 %; Service septique 40 % et le post opératoire de 13,30%) à l'Institut Orthopédique Mohamed Kassab de Tunis .

18 souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été sélectionnées au sein de l'hôpital Militaire. La majorité de ces 18 souches a été isolée de service réanimation (94 ,44%) ainsi qu'au sein de service de maternité (5,55%).

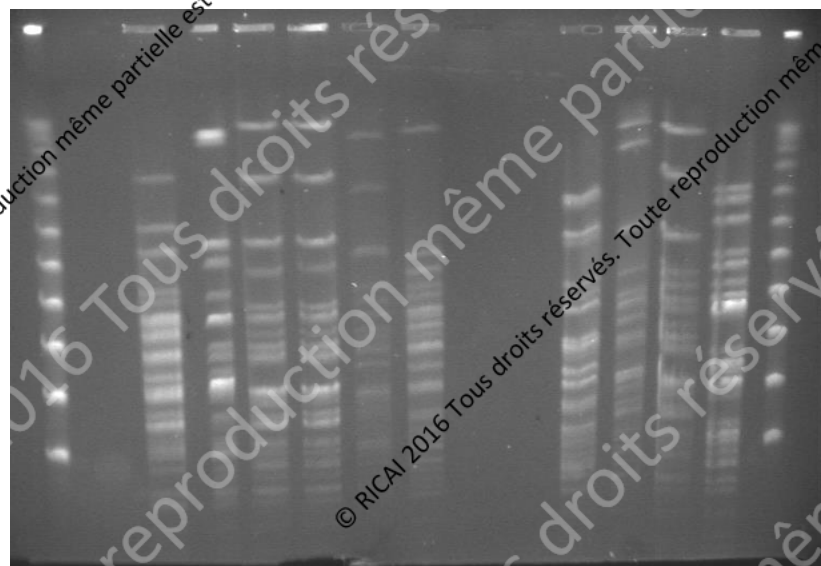
Analyse de l'ADN génomique des souches d'*A.baumannii* après digestion par *ApoI*



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



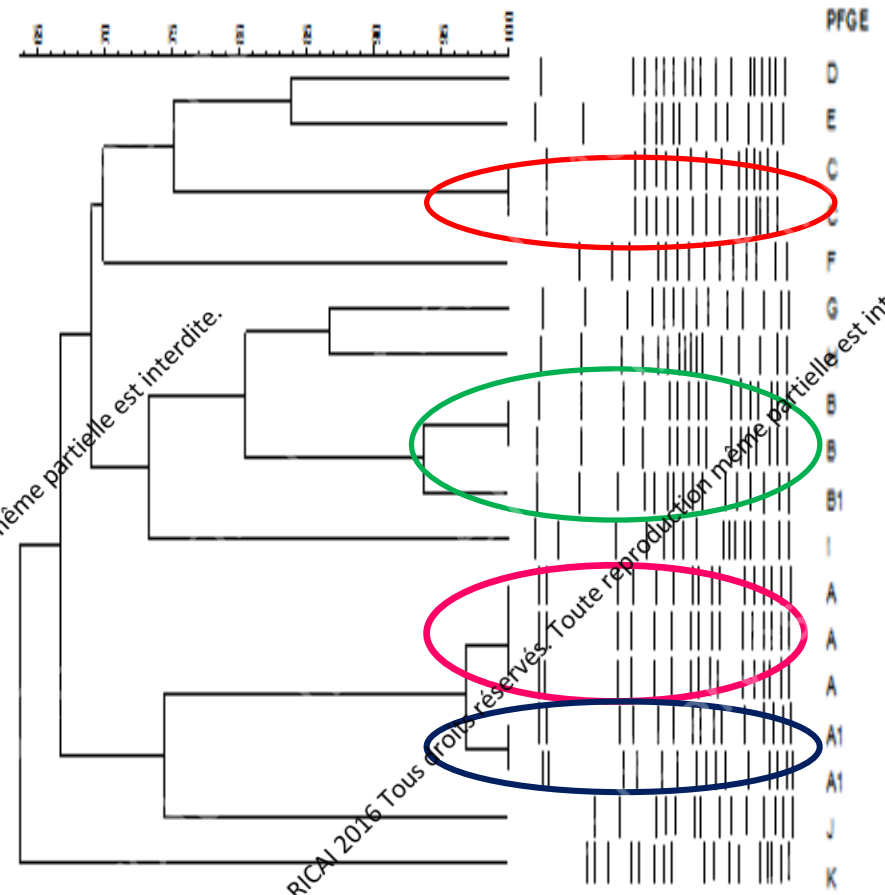
Résultats

Etude de la clonalité par PFGE de l' Hopital Militaire.



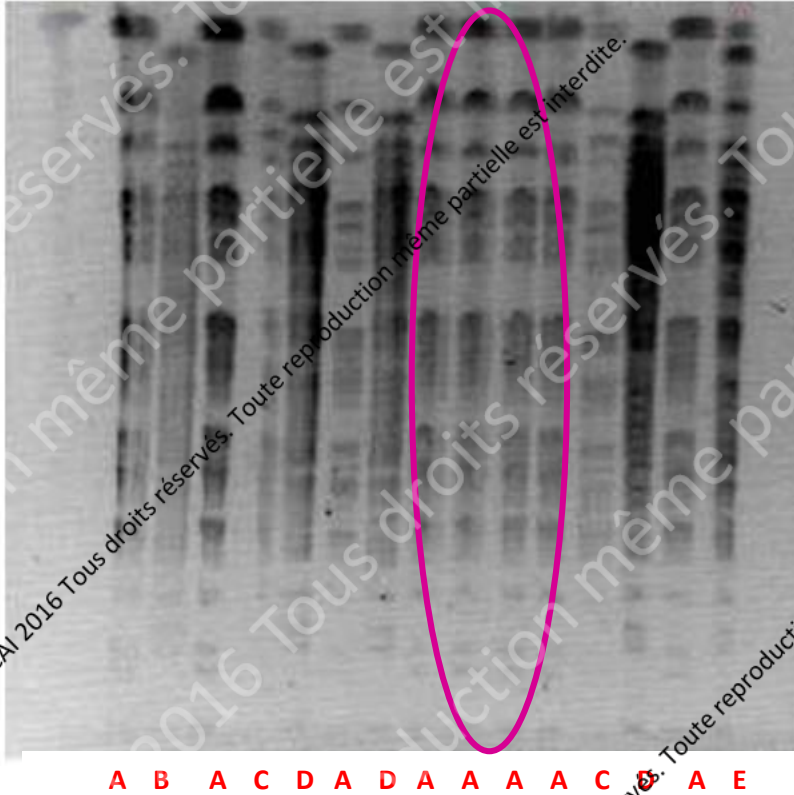
13 profils de restriction différents de A à K

- ➡ Le couple de souches qui présente le même profil A a été isolée dans deux services différents.
- ➡ Le couple de souches qui présente le même profil A1 a été isolée du service réanimation et a le même profil phénotypique et génotypique.
- ➡ Le profil C a été isolée du service réanimation et dans la même période de l'année.



Le profil B1a été isolée 2 ans après l'isolement du profil B.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



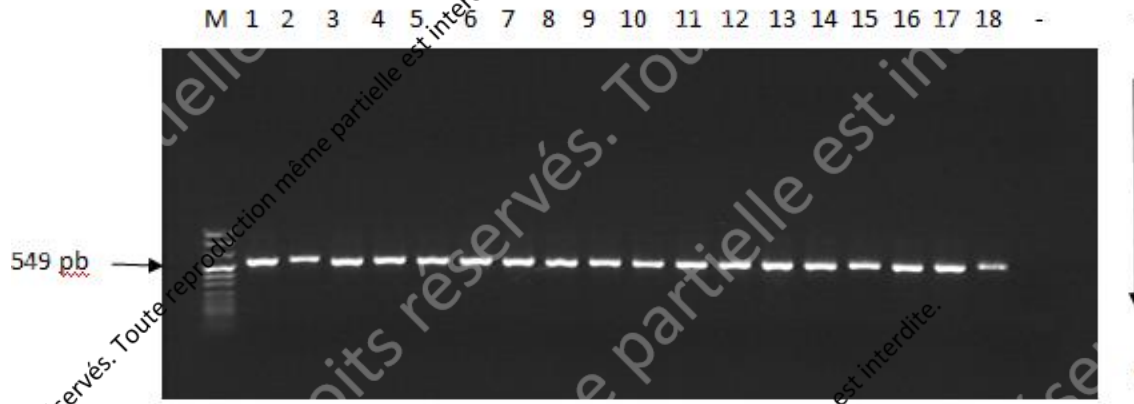
Après restriction par l'enzyme *Apal*, l'analyse a montré 5 profils de restriction différents de A à E

Le profil A est majoritaire et on le trouve principalement au sein du service de réanimation ainsi au sein de service post-opératoire durant une période qui s'étale entre Juin 2009 et Décembre 2010.

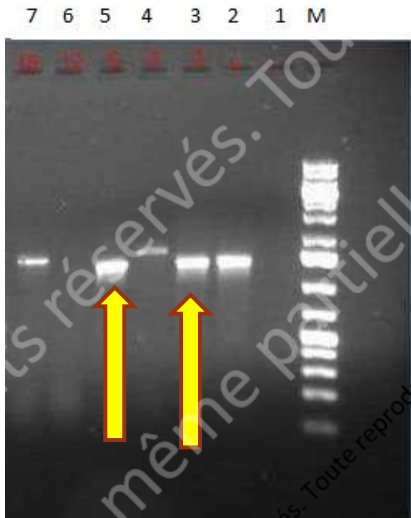
La réanimation est le meilleur modèle intra hospitalier de la résistance bactérienne aux antibiotiques, les raisons sont nombreuses parmi elles ; une forte prévalence de la résistance bactérienne, une surconsommation des antibiotiques.

Ce microorganisme se propage facilement dans l'environnement et peut persister dans ce milieu pendant plusieurs jours, un facteur qui peut expliquer sa capacité à entraîner des épidémies.

Étude de l'environnement génétique des gènes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{GES-11}



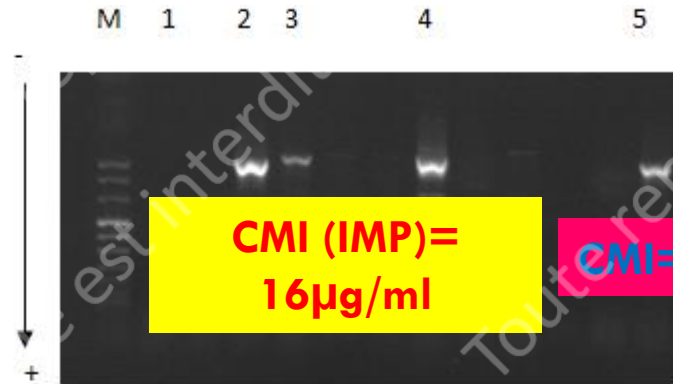
ISAbal a été identifié dans des isolats d'*A. baumannii* sensibles ou bien résistants aux carbapénèmes de divers hôpitaux.



CMI (IMP) = 8 μ
9/9

Analyse des produits
d'amplification du
gène *bla*

ISAb_a1F/OXA-51-likeR (Collection Kassab).



CMI (IMP) =
16 μ g/ml

CMI = 6 μ g/ml

Analyse des produits
d'amplification du gène *bla*

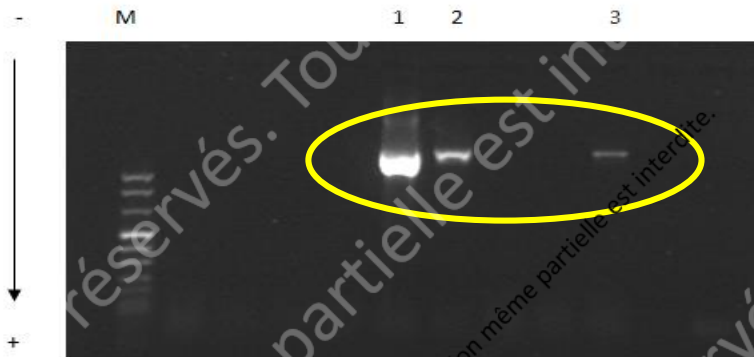
ISAb_a1F/OXA-51-likeR (Collection Militaire).

Les enzymes OXA-51/OXA-69 contribuent faiblement à la résistance naturelle aux antibiotiques observée chez *A. baumannii*. Cependant, il a été évoqué que l'insertion en amont de ces gènes d'éléments génétiques mobiles, comme la séquence d'insertion ISAb_a1, pourrait apporter des séquences promotrices en amont des gènes de type *bla*OXA-51. L'oxacillinase, ainsi surexprimée, pourrait être à l'origine d'une diminution (acquise) de la sensibilité aux carbapénèmes observée dans certains isolats d'*A. baumannii*.

Résultats

Étude de l'environnement génétique des gènes

*bla*_{OXA-51}



Analyse des produits
d'amplification du gène *bla*

ISAbal/AmpC (Collection Militaire).

Ainsi pour la collection de l'Hôpital Militaire, la présence de la séquence d'insertion ISAbal en amont du gène AmpC a été identifiée chez seulement AB 3556, AB 3966 et AB 1065 dont la CMI pour la céftazidime était >512 µg/ml pour les 3 souches, alors que la CMI de la céfotaxime est variable entre 512 et 256 µg/ml

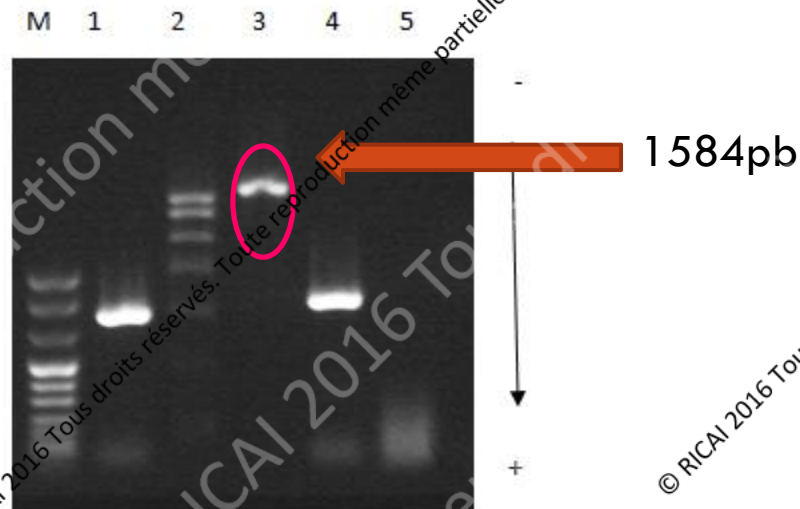
L'expression de ces gènes aux niveaux élevés est basée sur la présence d'un promoteur fort au sein d'une séquence d'insertion en amont dit ISAbal. C'est le principal mécanisme responsable de la résistance à la ceftazidime et d'autres céphalosporines à large spectre dans *A. baumannii*.

Résultats

Étude de l'environnement génétique des gènes

*bla*_{AmpC}

le gène *bla*_{GES-11} faisait partie d'un intégron de classe 1, représentant le second gène cassette après le gène *aacA4* codant pour l'acétyltransferase AAC(6')-Ib, conférant une résistance aux aminosides, notamment tobramycine et l'amikacine.



Résultats

Étude de l'environnement génétique des gènes
*bla*_{GES-11}

Nos travaux conduisent à évoquer de nouvelles perspectives de recherche :

- **les relations entre l'utilisation des antibiotiques, notamment des carbapénèmes, et l'émergence des oxacillinases aux propriétés de carbapénémases.**
- **De nombreux gènes de résistance aux antibiotiques sont associés aux séquences d'insertion ce qui nous mène à évaluer l'impact des séquences d'insertion dans la plasticité génomique de *A. baumannii*.**
- ***ISAbal* est impliquée de manière significative dans la mobilisation et l'acquisition de déterminants de la résistance aux antibiotiques chez *A. baumannii*.**

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

