

Détection par PCR de gènes de résistance à la vancomycine dans les eaux de la Seine

Céline Roose-Amsaleg^{1*}, Josette Garnier¹

¹UMR Sisyphe, Tour 46-56, Etage 4, Boite 105, 4, place Jussieu, 75005, Paris, FRANCE

*celine.amsaleg@ccr.jussieu.fr

Sommaire

1. Cadre général de l'étude.....	2
2. Matériel et Méthodes.....	2
2.1. Matériel	2
2.2. Méthodes	3
3. Résultats et discussion.....	4
4. Perspectives	5
5. Références	6

Résumé

Nous avons tenté de détecter les gènes de résistance à la vancomycine et à la teicoplanine directement par PCR sur différents échantillons d'effluents hospitaliers et de station d'épuration (une en amont et une en aval de Paris). Malgré une amplification réussie, elle s'avère multiple et les bandes amplifiées ne correspondent pas à des gènes de résistance à la vancomycine. Ce résultat montre la non-adaptabilité de ce protocole mis au point sur souches pures à des échantillons environnementaux. Nous allons devoir redéfinir des amorces plus spécifiques des gènes que nous ciblons.

1. Cadre général de l'étude

Antibiotiques naturels découverts dans les années 1950, les glycopeptides (principalement la vancomycine et la teicoplanine à usage hospitalier et l'avoparcine à usage vétérinaire) sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne¹. Les glycopeptides sont lentement bactéricides, essentiellement sur les bactéries Gram positives (notamment les staphylocoques, les streptocoques, y compris les entérocoques). La première résistance aux glycopeptides apparaît en France et au Royaume-Uni, il y a 20 ans, sur des bactéries commensales du genre *Enterococcus* puis est rapidement transférée aux pathogènes *Staphylococcus aureus*, notamment celles déjà résistantes à la méthicilline (antibiotique de la famille des betalactamines).

En France, la résistance aux glycopeptides prend un aspect alarmant du fait de la haute prévalence² en hôpital des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (jusqu'à 50 % selon Ficca *et al.*, 2006) et d'un important pourcentage de porteurs sains d'*Enterococcus sp.* résistants aux glycopeptides en milieu non hospitalier (11,8% d'après Gambarotto *et al.*, 2000). La résistance de ces *Enterococcus sp.* découle de l'utilisation de l'avoparcine comme additif alimentaire animal jusqu'en 1997, et est probablement transférée via la chaîne alimentaire. En tant que réservoir, ces bactéries représentent un risque de contamination des milieux aquatiques.

Plusieurs études européennes ont, en effet, prouvé non seulement la présence d'*Enterococcus sp.* résistants aux glycopeptides dans différents milieux mais également leur importance. Kuhn *et al.* (2005) ont montré pour des échantillons venant d'Espagne, de Suède et du Royaume-uni que 71% des entérocoques isolés des eaux brutes de station d'épuration étaient résistants à la vancomycine (20 µg/ml) et que 36% le restaient après traitement. En outre, même les sites peu soumis à pression de sélection par usage intensif de glycopeptides peuvent héberger des souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides. Ainsi, Caplin *et al.* (2007), ont détecté 52% d'entérocoques résistants à la vancomycine dans des eaux non traitées contre 22% après traitement dans une région au sud ouest de l'Angleterre où l'avoparcine n'a jamais été utilisée et peu de vancomycine administrée.

L'objectif de cette étude était, non pas d'isoler des souches de milieux naturels, mais de détecter directement les gènes de résistance quelles que soient les bactéries dont ils proviennent. La résistance aux glycopeptides chez les enterocoques est due à 6 clusters de gènes : *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* et *vanG* qui se manifeste par 6 phénotypes distincts classés en fonction de l'inductibilité et du niveau de résistance. Nous nous sommes donc attelés à déterminer la présence de ces 6 gènes de résistance dans des effluents hospitaliers et de station d'épuration, en les amplifiant par PCR.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

Nous avons travaillé sur des échantillons d'eaux de rejet d'un hôpital parisien (au niveau de 5 services différents) et des émissaires (entrée) et rejets (sortie) de deux stations d'épuration parisiennes (du SIAAP) Marne aval (Noisy-le-Grand) et Seine aval (Achères) dont l'ensemble est donné dans le tableau 1. (Ces prélèvements nous ont été fournis par J. Eurin et F. Tamtam qui y ont, par ailleurs, dosé les antibiotiques, cf. Rapport PIREN de l'exercice 2007).

¹Ils se fixent au niveau des extrémités peptidyl-D-Alanine-D-Alanine des précurseurs lipopeptidiques lorsqu'ils émergent de la membrane cytoplasmique, durant leur transport à travers celle-ci, et inhibent ainsi les étapes de transglycosylation et de transpeptidation (l'encombrement stérique empêchant l'assemblage des précurseurs) nécessaires à la bonne synthèse du peptidoglycane.

²La prévalence est une mesure de l'état de santé d'une population à un instant donné. Pour une affection donnée, elle est calculée en rapportant à la population totale, le nombre de cas de maladies présents à un moment donné dans une population (que le diagnostic ait été porté anciennement ou récemment).

Tableau 1. Sites et prélèvements

Site		Date de prélèvement	Volume filtré
Station d'épuration Marne aval ^a	Entrée	6 mars 2007	10 mL
	Sortie		20 mL
Station d'épuration Seine aval	Entrée (mélange des 5 émissaires)	26 juin 2007	10 mL
	Sortie ^a		30 mL
Effluents d'hôpital	n°1 ^b	13 novembre 2007	20 mL
	n°2 ^b		20 mL
	n°3 ^b		20 mL
	n°4 ^b		20 mL
	n°5 ^b		20 mL

^aRejet à 10 heures

^b1 à 5 correspondent à des sorties de différents services

2.2. Méthodes

Après filtration (Durapore R membranes filters, 0,22 µM, 47 mm PVDF, Millipore), l'ADN a été extrait en utilisant le kit « Genomic DNA purification from Tissue » (Macherey-Nagel) puis purifié sur colonne du kit « Nucleospin Extract II » (Macherey-Nagel).

Ensuite les six gènes *van* sont amplifiés séparément par PCR en utilisant les mêmes oligonucléotides que Depardieu *et al.* (2004) (voir tableau 2), qui ont mis au point cette méthode pour des souches pures.

Tableau 2. Liste des oligonucléotides utilisés pour amplifier les différents gènes *van* (Depardieu *et al.*, 2004)

Amorce ^a	Séquence (5'→3')	Gène	Position ^b	Taille du produit PCR (bp)
EA1(+)	GGGAAAACGACAATTGC	<i>vanA</i>	176-192	732
EA2(-)	GTACAATGCGGCCGTTA		907-891	
EB3(+)	ACGGAATGGGAAGCCGA	<i>vanB</i>	169-185	647
EB4(-)	TGCACCCGATTCGTTC		815-799	
EC5(+)	ATGGATTGGTAYTKGTAT ^c	<i>vanC1/vanC2</i>	133-150/142-159	815/827
EC8(-)	TAGCGGGAGTGMICYMGTAAC ^c		947-929/968-950	
ED1(+)	TGTGGGATGCGATATTCAA	<i>vanD</i>	357-375	500
ED2(-)	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA		856-837	
EE1(+)	TGTGGTATCGGAGCTGCAG	<i>vanE</i>	364-382	430
EE2(-)	ATAGTTTAGCTGGTAAC		793-777	
EG1(+)	CGGCATCCGCTGTTTTTGA	<i>vanG</i>	68-86	941
EG2(-)	GAACGATAGACCAATGCCTT		1008-989	

^a +, amorce sens ; -, amorce antisens.

^b La numérotation des nucléotides commence au codon d'initiation du gène.

^c K = G ou T; M = A ou C; Y = C ou T.

Pour valider la réaction de PCR, les souches de référence suivantes (fournies par P. Courvalin et B. Perichon, Unité des agents antibactériens, Institut Pasteur) ont été utilisées :

- Enterococcus faecium* BM4147 (type VanA)
- E. faecalis* V583 (type VanB)
- E. gallinarum* BM4174 (type VanC-1)
- E. faecium* BM4339 (type VanD)
- E. faecalis* BM4405 (type VanE)
- E. faecalis* BM4518 (type VanG).

3. Résultats et discussion

Pour tous ces échantillons d'eaux, l'amplification par PCR a résulté pour chaque gène en de multiples bandes dont une de la taille attendue (soulignée par la ligne en pointillée) mais n'étant pas majoritaire (voir Figure 1 pour le gène *vanA*).

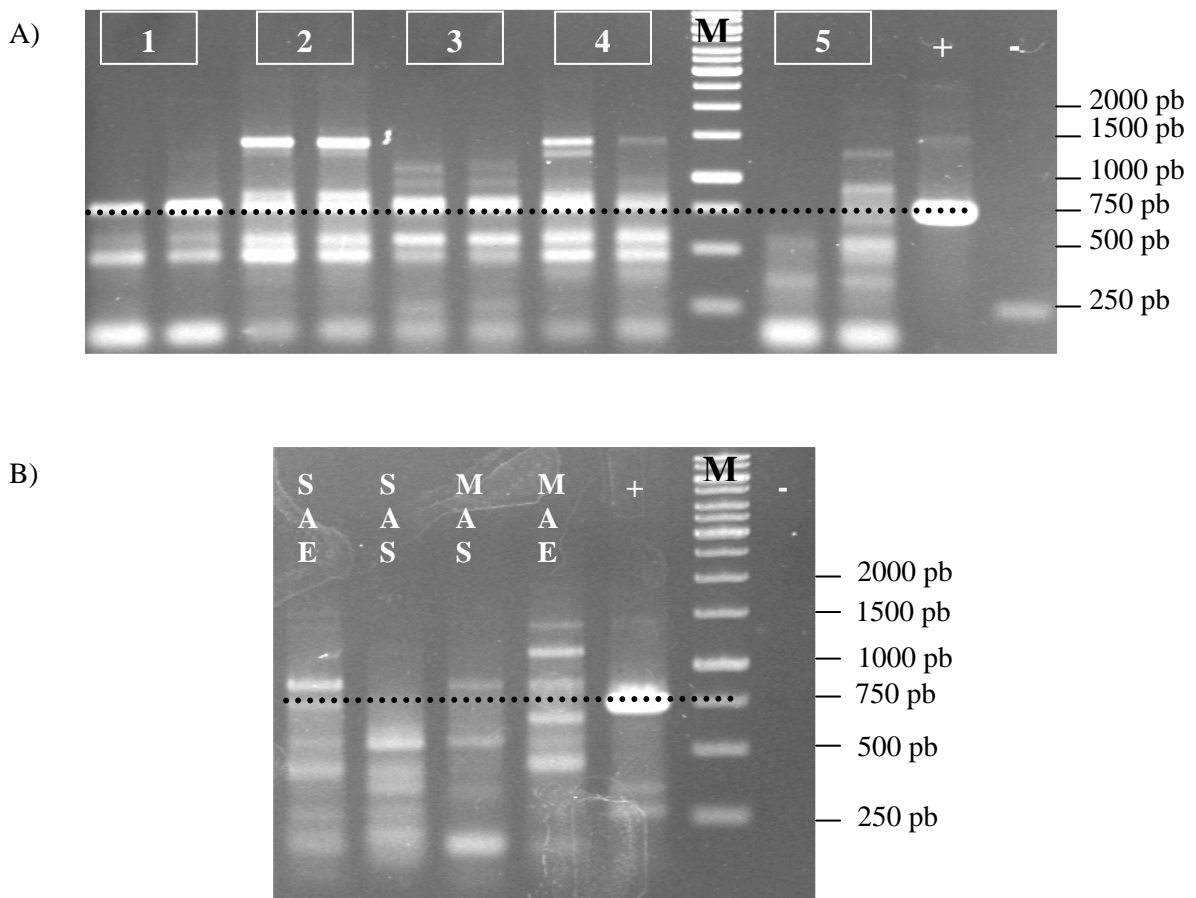


Figure 1. Amplification des gènes *vanA* à partir de l'ADN bactérien issu A) des eaux d'effluents hospitaliers : 1 à 5 correspondent aux sorties des différents services et B) des stations d'épuration : SAE, Seine aval entrée, SAS, Seine aval sortie, MAS, Marne aval sortie, MAE, Marne aval entrée ; + au témoin positif *Enterococcus faecium* BM4147, qui possède le gène *vanA* ; M, le Marqueur de poids moléculaire (Generuler™ 1Kb DNA ladder, Fermentas, US). Les tailles en paire de bases sont indiquées à droite des photographies.

Après purification et séquençage de trois amplifiats parmi ceux des gènes *vanA* et *vanB*, les séquences sont confrontées à la base de séquences protéiques du NCBI³ par BLASTx (Altschul *et al.*, 1997). Il apparaît qu'il ne s'agit pas de séquences codant pour des gènes de résistance à la vancomycine (voir le tableau 3) alors que les séquences issues des amplifiats des souches témoin (BM4147 et V583) correspondent bien à celles de gènes *vanA* et *vanB*, respectivement. Ces amplifiats aspécifiques

Tableau 3. Résultats de confrontation des séquences nucléotidiques à la banque de protéines de NCBI par BLASTx (Altschul *et al.*, 1997).

Echantillon/gène ciblé	Nom de l'amplifiat	Taille de la séquence soumise	Protéine qui s'aligne le mieux par BLAST avec la notre (taille en acides aminés)	Expect value E ^a
Effluents d'hôpital n°2/ <i>vanA</i>	SL1	698 <i>nuc</i>	ABC-type spermidine/putrescine transport systems, ATPase components [<i>Escherichia coli</i> 53638] (337 aa)	9e-83
	SL4	677 <i>nuc</i>	HSDR Protein probable type I Restriction enzyme restrictionchain [<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740] (939 aa)	2e-15
Effluents d'hôpital n°4/ <i>vanB</i>	SL6	599 <i>nuc</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase [<i>Enterobacter sp.</i> 638] (753 aa)	2e-103

^aParamètres décrivant le nombre de hits qu'on s'attend à avoir par chance quand on cherche dans une base de données d'une taille particulière.

Les résultats montrent que cette méthode d'amplification des gènes *van* n'est pas adaptée (du fait de son manque de spécificité) pour être appliquée à des échantillons environnementaux tels que ceux que nous étudions.

4. Perspectives

La finalité de cette étude étant de quantifier les gènes *van* dans l'environnement en réalisant une PCR quantitative, il est indispensable de résoudre les problèmes de non spécificité de la PCR. Pour progresser dans cette recherche, il est nécessaire de collecter toutes les séquences existantes de *vanA* et *vanB* et de dessiner de nouvelles amorces répondant notamment aux critères suivants :

- Haute spécificité,
- Amplicon de 200 paires de bases maximum,
- Equilibre en bases G et C.

Par ailleurs, il semble plus approprié de se focaliser sur les deux gènes *vanA* et *vanB* car ils rendent compte de la quasi-totalité des résistances aux glycopeptides chez les entérocoques et les staphylocoques.

³ National Center for Biotechnology Information

5. Références

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1:3389-3402
- Caplin JL, Hanlon GW, Taylor HD (2007) Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environmental Microbiology* 0?-?
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P (2004) Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42:5857-5860
- Ficca G, Chauvel M, de Moüy D (2006) Étude de la prévalence de la résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* communautaire - Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Médecine et Maladies infectieuses* 36:207-212
- Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D, Denis F (2000) Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *Journal of Clinical Microbiology* 38:620-624
- Kuhn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, Vilanova X, Manero A, Taylor H, Caplin J, Dominguez L, Herrero IA, Moreno MA, Mollby R (2005) Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Applied Environmental Microbiology* 71:5383-5390