

TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE MEDICALE
Année académique 2012-2013

Le séquençage

Applications au laboratoire de Microbiologie clinique

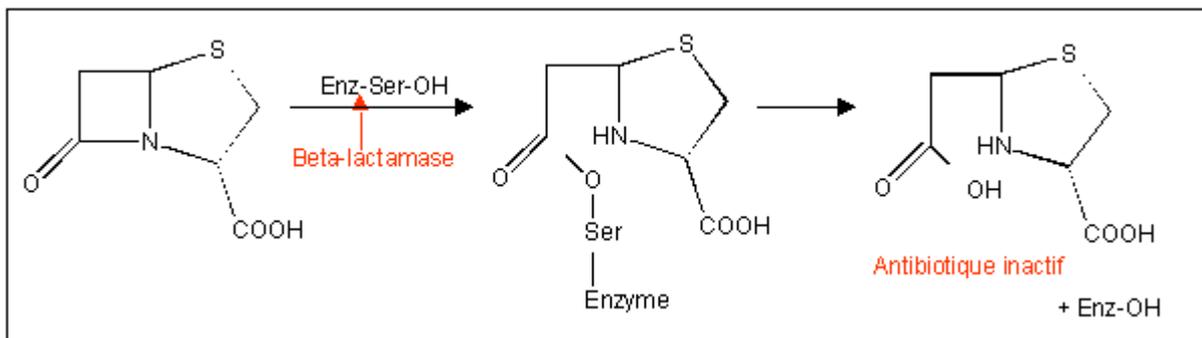
Cécile Meex
Sébastien Bontems

1. Caractérisation des bêta-lactamases à spectre étendu produites par les entérobactéries

Bêta-lactamines et bêta-lactamases

Les bêta-lactamines font partie des antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections causées par les entérobactéries. Leur action repose sur une inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.

La production d'enzymes inactivatrices, les bêta-lactamases, est le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines.



Les bêta-lactamases sont naturellement présentes chez certaines entérobactéries mais peuvent également être acquises suite à la transmission du gène codant pour l'enzyme à partir d'une autre bactérie par l'intermédiaire d'un plasmide, par exemple.

Il existe plusieurs types de bêta-lactamases avec un spectre d'action variable sur les différentes bêta-lactamines. Nous allons nous concentrer sur les bêta-lactamases à spectre étendu.

Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE sont des bêta-lactamases capables d'hydrolyser l'ensemble des pénicillines, des céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} génération et l'aztréonam. Elles sont inhibées par les inhibiteurs de bêta-lactamases tels que l'acide clavulanique et confèrent aux bactéries qui les produisent une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes.

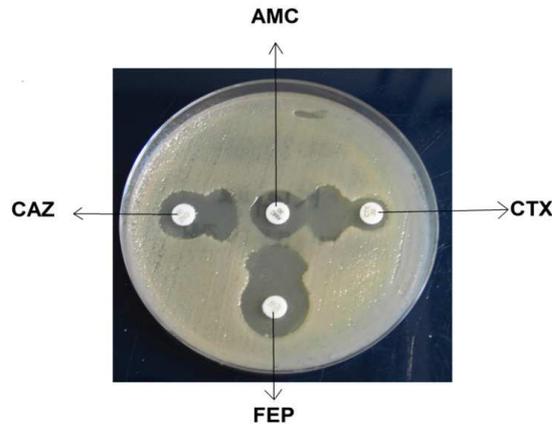
La production de BLSE n'est jamais naturelle chez les entérobactéries, il s'agit d'une résistance acquise. Les gènes codant pour les BLSE se trouvent généralement sur des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons. Ces éléments étant transférables d'une bactérie à l'autre, la diffusion des BLSE entre souches de la même espèce ou entre espèces est aisée.

Détection phénotypique de la production de BLSE

Dans les échantillons cliniques, la mise en évidence d'entérobactéries productrices de BLSE est importante, d'une part pour l'adaptation du traitement du patient mais également pour l'application de précautions supplémentaires pour éviter la transmission de la bactérie.

Le test utilisé en routine au laboratoire pour la détection des BLSE est le test phénotypique de synergie entre l'acide clavulanique et des céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération.

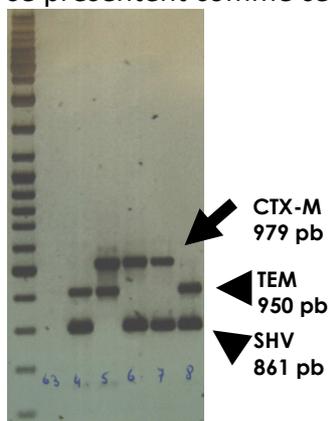
Les souches productrices de BLSE sont généralement résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération. Cependant, l'acide clavulanique inhibe les bêta-lactamases et va donc restaurer partiellement la sensibilité aux céphalosporines. Ceci se traduit par un élargissement de la zone d'inhibition des céphalosporines en regard du disque contenant l'acide clavulanique.



Détection génotypique et caractérisation des bêta-lactamases

Pour confirmer le résultat du test phénotypique et/ou dans un but épidémiologique, il est possible de réaliser des PCR couplées à du séquençage pour l'identification précise de la BLSE produite.

Les BLSE les plus fréquentes sont celles dérivées des gènes TEM, SHV et CTX-M. Au laboratoire de Microbiologie médicale, nous disposons de primers pour l'amplification spécifique de chacun de ces 3 gènes. La PCR réalisée est une PCR classique dont les résultats se présentent comme ceci :



Une fois le gène présent identifié, l'ADN de l'amplicon va être purifié puis séquencé.

But du séquençage : Obtenir l'identification précise de la BLSE.

- Il existe ~ 140 BLSE de type TEM, ~ 70 BLSE de type SHV, ~ 50 BLSE de type CTX-M
- Les BLSE sont numérotées dans l'ordre de leur découverte. Elles se différencient les unes des autres par des mutations au niveau de leur séquence en acides aminés.
- Remarque: TEM-1, TEM-2 et SHV-1 ne sont pas des BLSE mais des pénicillinases. Leur spectre d'action est plus étroit : leur présence engendre une résistance uniquement aux pénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique.

L'identification précise de la bêta-lactamase va permettre

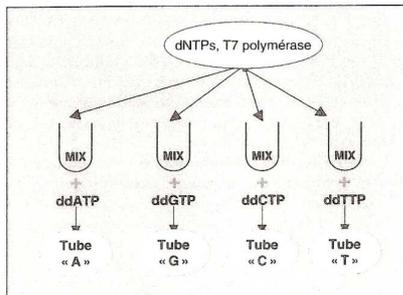
→ La confirmation de la production de BLSE

→ La réalisation d'études épidémiologiques

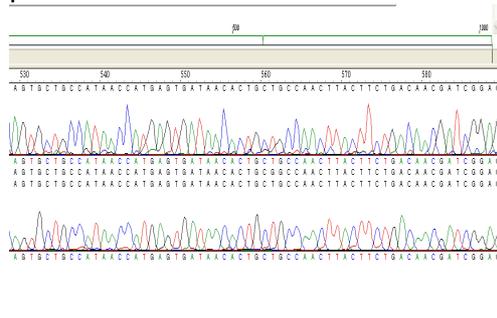
Séquençage : Méthode de Sanger

La réaction de séquençage s'effectue à partir des produits de PCR purifiés, elle est basée sur l'utilisation d'une ADN polymérase qui va synthétiser le brin complémentaire de l'ADN à séquençer. Une amorce de séquence complémentaire au début du gène à séquençer est également nécessaire, les primers de PCR pourront être utilisés à cet effet. Ceux-ci vont s'hybrider au niveau de leur séquence complémentaire et constitueront le point de départ de la synthèse par l'ADN polymérase.

Après hybridation, le mélange va être réparti dans quatre tubes auxquels vont être ajoutés : l'ADN polymérase, les quatre désoxynucléotides (dNTPs) et des nucléotides particuliers appelés didésoxynucléotides (ddNTPs). Les ddNTPs sont en fait des dNTPs dont le groupement OH au niveau du ribose en 3' a été supprimé. Ainsi, lorsqu'une ADN polymérase ajoute un ddNTP sur la chaîne d'ADN en synthèse, elle ne peut plus rajouter d'autres nucléotides à sa suite et l'élongation de l'ADN s'arrête. Les ddNTPs sont marqués avec un fluorophore spécifique pour chaque type de ddNTP. Ils émettront donc chacun à une longueur d'onde différente ce qui permettra de les différencier et de les détecter. Un ddNTP différent va être ajouté dans chaque tube. Le milieu contiendra donc une grande quantité des 4 dNTPs plus une faible quantité d'un des 4 ddNTP.



L'ADN polymérase va alors commencer à recopier l'ADN à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. La synthèse se déroule normalement jusqu'à ce qu'un ddNTP soit ajouté par l'ADN polymérase : l'élongation s'arrête alors. Ainsi, les fragments dans le tube A se termineront tous par ddA, dans le tube G par un ddG, dans le tube C par un ddC et dans le tube T par un ddT. Après réaction, on obtient des fragments de tailles différentes en fonction de l'endroit où le ddNTP a été incorporé. Il ne reste plus qu'à analyser ces fragments avec un séquenceur pour lire la séquence. Pour cela, on fait migrer les fragments d'ADN dans une colonne de chromatographie. Les fragments sont alors séparés selon leurs tailles : les plus petits sortiront les premiers, ce qui permet de déterminer la position de la base. Les fragments sont détectés par un détecteur présent à la sortie de la colonne qui va capter la fluorescence émise par les ddNTPs ce qui permet de déterminer la nature de la base. Ces signaux sont ensuite traités informatiquement et on obtient un électrophérogramme qui est un graphique contenant des pics de 4 couleurs différentes grâce auxquels la séquence pourra être lue et déterminée.



Démonstration pratique

- ❖ Utilisation du logiciel Vector NTI pour l'analyse des séquences
- ❖ Traduction de la séquence nucléotidique en séquence d'acides aminés sur le site Expasy du Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)
- ❖ Introduction de la séquence d'acides aminés sur le site Protein Blast du National Center for Biotechnology Information (NCBI) : recherche de la séquence en acides aminés la plus comparable dans la base de données et identification précise de la bêta-lactamase.