

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département TCSN/FSNV/UAMB/17

## Rapport de séjour scientifique de haut niveau

**Dr Rabia LADJOUZI**

**Lieu de stage :**

Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM), équipe Stress & Virulence,  
université de Caen Basse-Normandie, France

**Durée de stage :** 15 jours (30-11-2017 au 13-12-2017)

**Objectifs :**

1- Suite de l'étude protéomique : Extraction des protéines chez *Enterococcus faecalis* sous conditions avant et après traitement à la vancomycine (université de Caen) pour une analyse par un MS de type LabelFree (à l'université de Rouen).

2- Maintenir le contact pour faciliter la mobilité des doctorants en microbiologie de la FSNV.



## Contexte

Bien que faisant partie de la flore intestinale de l'homme, les entérocoques peuvent être à l'origine de différentes infections, notamment chez une fraction sensible de la population comme les immunodéprimés, les nourrissons, les personnes âgées et les patients des centres de soins intensifs. Quelle que soit la zone géographique considérée, le genre *Enterococcus* reste l'une des causes majeures d'infections nosocomiales. En effet, il occupe la 3ème place aux Etats-Unis et en Finlande (Lyytikäinen *et al.*, 2008; Ogier & Serror, 2008), et la 4ème place en France mais également à l'échelle européenne (Coignard *et al.*, 2006; Ogier & Serror, 2008).

Majoritairement, deux espèces sont responsables des infections à entérocoques: *E. faecalis* pour 80 à 90% des cas et *E. faecium* pour environ 10% (Murray, 1990; Rice, 2001; Ruoff *et al.*, 1990). Elles sont à l'origine d'infections urinaires généralement acquises dans les unités de soins intensifs, d'abcès intra abdominaux, d'infections post opératoires, d'endocardites, de pneumonies, de péritonites et de septicémies (Jett *et al.*, 1994; Megran, 1992; Shepard & Gilmore, 2002). L'espèce *E. faecalis* est la plus représentée dans la flore gastro-intestinale humaine et elle est naturellement plus pathogène que les autres espèces d'entérocoques (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Cependant, d'autres espèces d'entérocoques sont également connues pour causer des infections chez l'homme, c'est le cas de : *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. raffinosus* et *E. mundtii* (Na *et al.*, 2012; Patel, 2003; Swampillai *et al.*, 2012; Vijayakrishnan & Rapose, 2012).

Aujourd'hui, les infections à entérocoques posent de sérieux problèmes de santé publique liés à la capacité intrinsèque de ces micro-organismes à tolérer différents antibiotiques. En effet, ces germes résistent à des faibles concentrations d'aminoglycosides (gentamycine et kanamycine), de  $\beta$ -lactames (pénicillines, céphalosporines ou ampicillines), de lincosamides (lincomycine et clindamycine) ou de quinolones (acide nalidixique, norfloxacin...) (Ogier & Serror, 2008). Des résistances peuvent également être acquises par le biais de transferts génétiques permettant de résister aux glycopeptides (vancomycine, téicoplanine), aux aminoglycosides, aux macrolides (érythromycine), aux lincosamides, au chloramphénicol ou encore à la tétracycline (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 1999; Ogier & Serror, 2008).

Le problème majeur concerne les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE : *Vancomycin Resistant Enterococci*) car cet antibiotique est utilisé en dernier recours pour le traitement des infections provoquées par des germes Gram-positifs multi-résistants aux antibiotiques (Huycke *et al.*, 1998). De plus, il a été démontré que les gènes permettant la résistance aux glycopeptides peuvent être transférés par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles, ce qui a contribué à la forte augmentation de l'incidence des septicémies aux VRE aux Etats-Unis . Le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques peut être intra- et/ou interspécifique. Dès 1992, des transferts conjugatifs *in vivo* et *in vitro* d'un plasmide portant de multiples déterminants génétiques codant diverses résistances aux antibiotiques ont été réalisés entre une souche d'*E. faecalis* et une souche de *S. aureus* (Noble *et al.*, 1992). Ce qui présente une menace pour la santé publique.

## Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif de ce stage est consacré à la poursuite des résultats obtenus sur la tolérance des entérocoques à la vancomycine. Durant les travaux de thèse de doctorat, nous avons démontré que la tolérance des entérocoques à la vancomycine et à la pénicilline dépend du taux d'activité de la MnSOD. Dans la continuité, notre étude vise à identifier la(les) réaction (s) responsable(s) de la génération d'un stress au superoxyde intracellulaire suite à l'action de l'antibiotique, et à définir la cascade d'événements conduisant jusqu'à la mort cellulaire chez des mutants  $\Delta sodA$  d'*Enterococcus*.

Ce présent travail consiste à extraire des protéines totales chez *Enterococcus faecalis* (souche sauvage wt JH2-2 et sont mutant *sodA*) sous des conditions "avant et après 24h de traitement à 20 $\mu$ g/ml de vancomycine" pour un total de 12 extractions (conditions).

Les protéines ont été extraites en utilisant un cassage mécanique avec FastPrep<sup>®</sup>24. Après dosage des protéines par la méthode de Bradford, des aliquots de 30 $\mu$ g sont gardés à - 20 °C pour une analyse par un nLC/MS/MS de type LabelFree (à l'université de Rouen).

L'analyse du protéome est réalisée à l'université de Rouen (collaboration) et les résultats de l'identification et de la quantification sont traités.

*NB : Une étude de survie est Réalisée en parallèle pour confirmer les conditions par les résultats physiologiques (Un dénombrement à T0 avant traitement et un autre T24h après traitement à la vancomycine).*

les résultats des protéomes comparatifs a mis en évidence plusieurs protéines dérégulées et le nombre de Fold entre la souche sauvage et son mutant *ΔsodA* a été calculé. L'analyse statistique a été effectuée par le Logiciel Anova selon les conditions suivantes :

- 1- Un nombre de Fold doit être  $\geq 2$  (la protéine est au minimum 2 fois sur-exprimée dans l'une des souche)
- 2- La différences doivent être significatives ( $p < 0.05$ ) entre les deux valeurs issues des 3 répliquâts biologiques de la souche sauvage et son mutant *ΔsodA*.
- 3- Le nombre de péptides retenu pour l'identification de chaque protéine doit être supérieur à 2 péptides.
- 4- Les séquences répétitives (qui peuvent appartenir à plusieurs protéines) sont écartée de l'analyse.

En conclusion, mon séjour scientifique subventionné par l'université de Bejaia m'a permis d'avancer efficacement dans mon projet de recherche et de soutenir le contact entre l'université de Béjaïa et l'université de Caen Basse-Normandie pour faciliter la mobilité des étudiant en doctorat de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie.