

---

# Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones

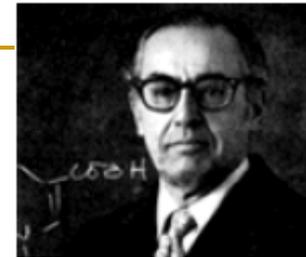
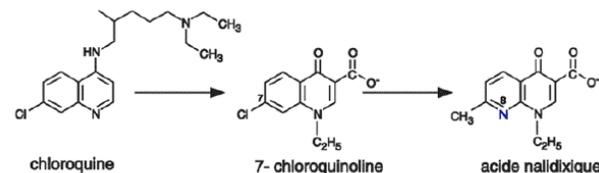
---

Pr. Boutiba – Ben Boubaker I.  
Laboratoire de Microbiologie EPS Charles Nicolle  
Laboratoire de Recherche “Résistance aux Antimicrobiens”  
Faculté de Médecine de Tunis

# Un peu d'histoire...

## ■ 1962 : Acide Nalidixique

- Par Georges Lesher
- Molécule organique artificielle (BGN)
- À partir d'une préparation de chloroquine



## ■ Années 80 : Fluoroquinolones

### Systemiques

1985 : Pefloxacin

1986 : Ofloxacin

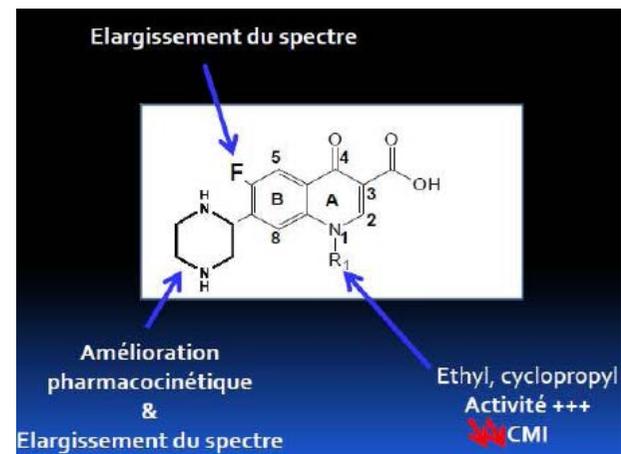
1987 : Ciprofloxacin

### Urinaires

1985 : Norfloxacin

1986 : Enoxacin

1987 : Lomefloxacin



- **Années 90 : FQ anti-pneumococciques / lévofloxacin** → Activité accrue sur pneumocoques (PSDP) mais sans amélioration des performances vis-à-vis des BGN

- Plus de 10 000 dérivés synthétisés: mais peu de rescapés

---

# Spectre antimicrobien: Large

- **Gram –**
- **Gram + :**
  - Staphylocoques
  - Streptocoques naturellement R sauf FQ anti-pneumococciques
- **Intracellulaires +++**



---

# Trou !!!

- Entérocoques
  - Anaérobies (sauf Moxifloxacine)
  - *Listeria*
-

# Activité antibactérienne des Fluoroquinolones

	Entérobactéries	<i>P. aeruginosa</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. aureus</i>	Streptocoques	Bactéries atypiques	Anaérobies
<b>1<sup>ère</sup> Génération</b>							
<b>A. nalidixique</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>2<sup>ème</sup> Génération</b>							
<b>Norfloxacine</b>	++	+	+	+++	+	+	-
<b>Péfloxacine</b>	++	+	+	++++	+	++	-
<b>Ofloxacine</b>	+++	++	++++	+++	++	+++	+
<b>Ciprofloxacine</b>	+++	++++	++++	+++	++	+++	+
<b>3<sup>ème</sup> Génération</b>							
<b>Lévofloxacine</b>	+++	+++	++++	+++	++++	+++	+
<b>Moxifloxacine</b>	+++	++	++++	+++	++++	++++	++

# Quelques CMI

FQ	PEF	OFL	CIP	LEV	MOX
<i>E. coli</i>	0.12	0.12	0.01	0.06	0.12
<i>P.aeruginosa</i>	8	4	0.25	2	4
<i>B. fragilis</i>	8	2	4	1	0.25
SASM	0.5	0.5	0.5	0.12	0.06
SARM	32	32	32	8	1
<i>E. faecalis</i>	8	4	4	2	0.5
<i>S. pneumoniae</i>	4	2	2	1	0.12

---

# Pharmacocinétique

- **Bonne biodisponibilité orale** (>85%, sauf cipro: 50-60)
  - **Diffusion très bonne :**
    - Partout (os, poumon, tissus mous...),
    - Accumulation dans phagocytes ↪ Bactéries intra-cellulaires
  - **Élimination: Hépatique et/ou rénale :**
    - Ofloxacin, Levofloxacin : rénale ++
    - Péfloxacin : hépatique
    - Autres FQ : hépatique et rénale
  - **Effet post antibiotique (EPA) prolongé**
-

---

# Fluoroquinolones: Bactéricides

- Bactéricidie rapide, C° dépendante
  - CMB = 1 à 2 x CMI
  - Vitesse de bactéricidie
    - FQ < Aminosides
    - FQ >  $\beta$ -lactamines et glycopeptides
    - Moins rapide pour Cocci à Gram + que BGN
  - Cipro & Oflo > pour BGN et Peflo > pour *S. aureus*
-

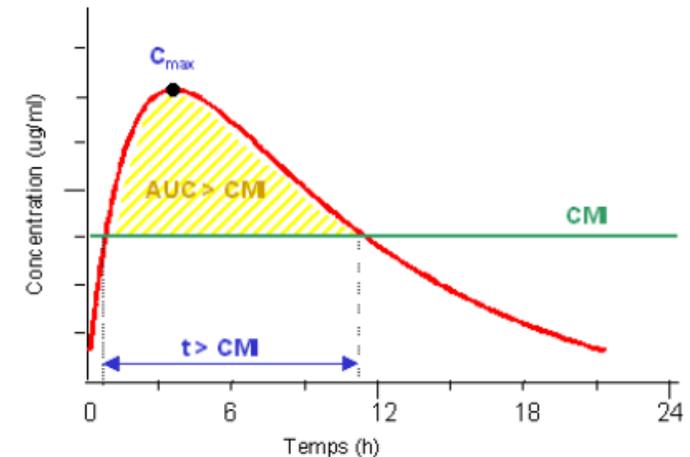
# Pharmacocinétique / Pharmacodynamie

- Efficacité thérapeutique et issue clinique favorable sont corrélées :  **$C_{max}$ / CMI (QI) et/ou AUC/CMI**

Plus ces paramètres sont élevés, plus l'éradication bactérienne est intense

- Effet thérapeutique maximal si  $QI \geq 8$  à  $12$   
**(Posologie doit permettre d'obtenir des pics de  $C^{\circ}$  plasmatique  $\geq 8-12 \times CMI$ )**

## Propriétés PK/PD

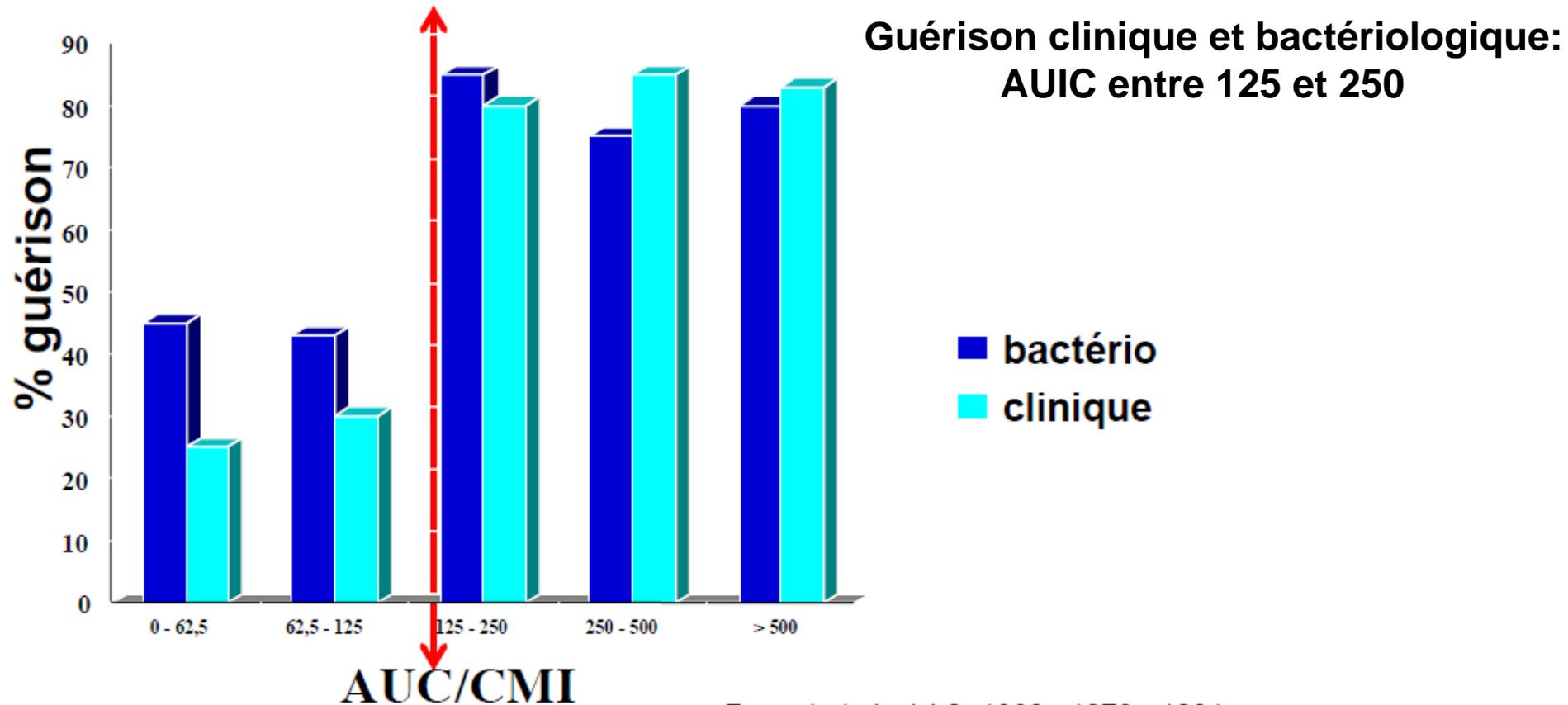


# Pharmacocinétique / Pharmacodynamie

**Rapport AUC24h/CMI** diffère selon la bactérie

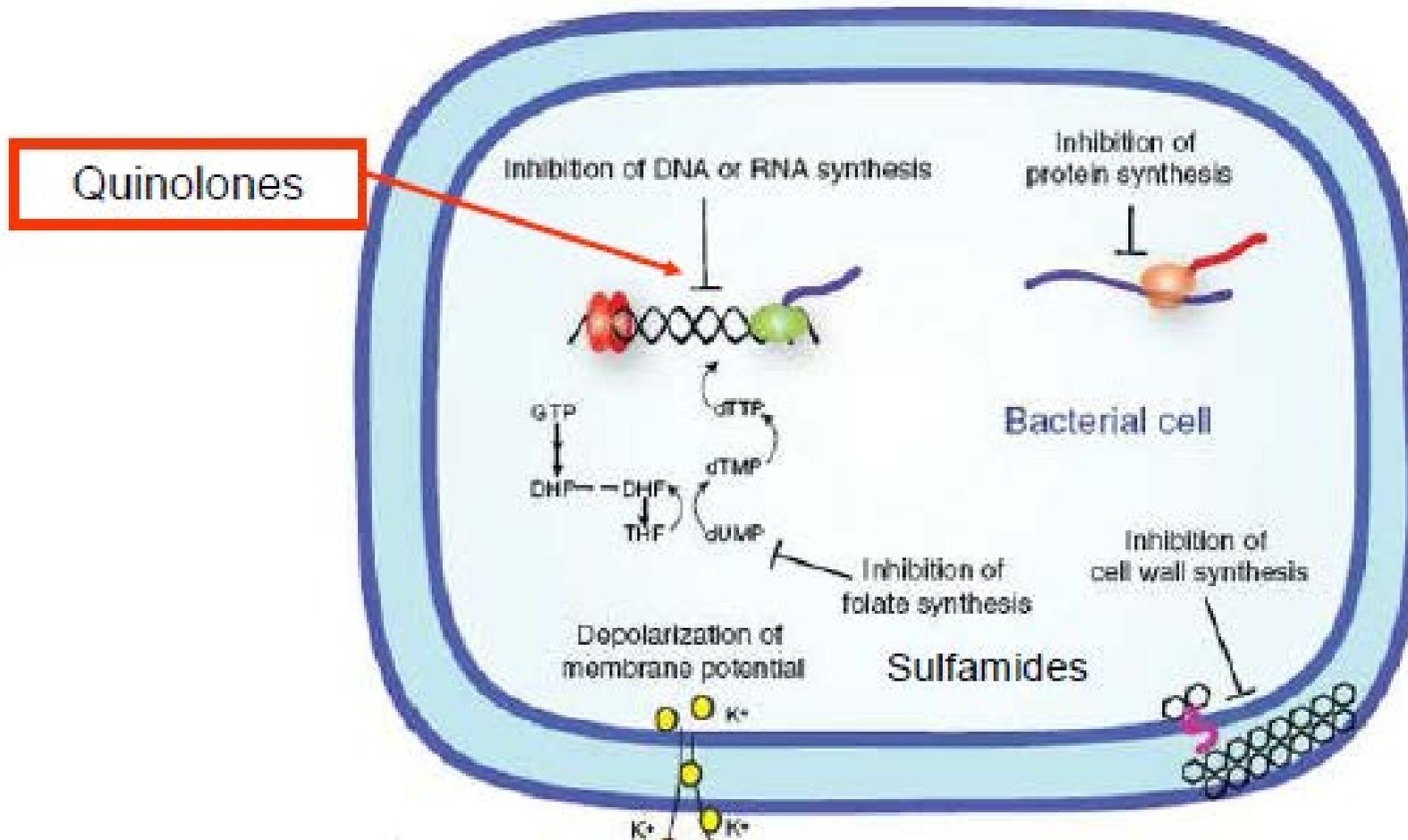
Espèce	AUC24h/CMI
<i>S. pneumoniae</i>	30-40
<i>S. aureus</i>	60
Entérobactéries	80-100
<i>P. aeruginosa</i>	100

# DEMONSTRATION DU ROLE DU RAPPORT $AUC_{90}$ : FLUOROQUINOLONE EN CLINIQUE CHEZ L'HOMME (Pneumopathie nosocomiale)



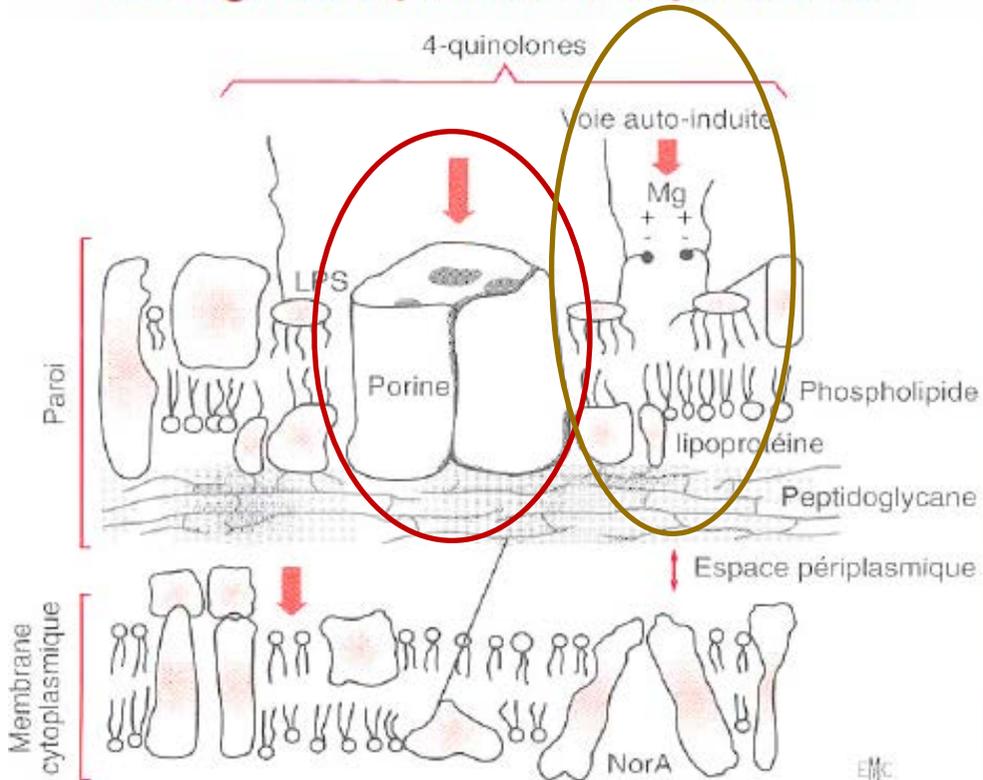
Forrest et al., AAC, 1993 : 1073 - 1081

# Mécanisme d'action



# Passage transpariétal

## Passage transpariétal des quinolones



LPS : lipopolysaccharide ; NorA : protéine d'efflux

## BGN

### 1- Voie des porines:

FQ hydrophiles de faible PM : Norflo et cipro

### 2-Voie auto-induite:

FQ hydrophobes : Oflo, Peflo et lévo

Chélation du  $Mg^{2+}$  ↪ Désorganisation structure

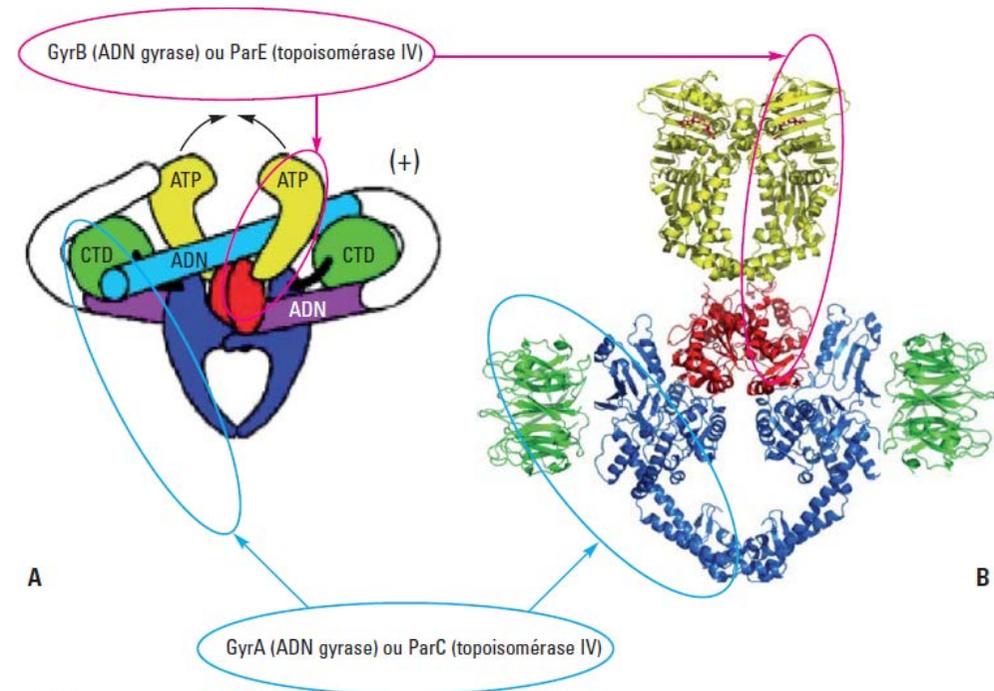
↪ Diffusion à travers la couche lipidique de la membrane externe

## Cocci Gram +

Diffusion passive à travers peptidoglycane

# Cible intracellulaire: Topoisomérases

- **Topoisomérase II**  
ou **ADN-gyrase**
- **Topoisomérase IV**
- **Fonction** : réguler la topologie de l'ADN pour en permettre la réplication



A : schéma

B : structure cristallographique

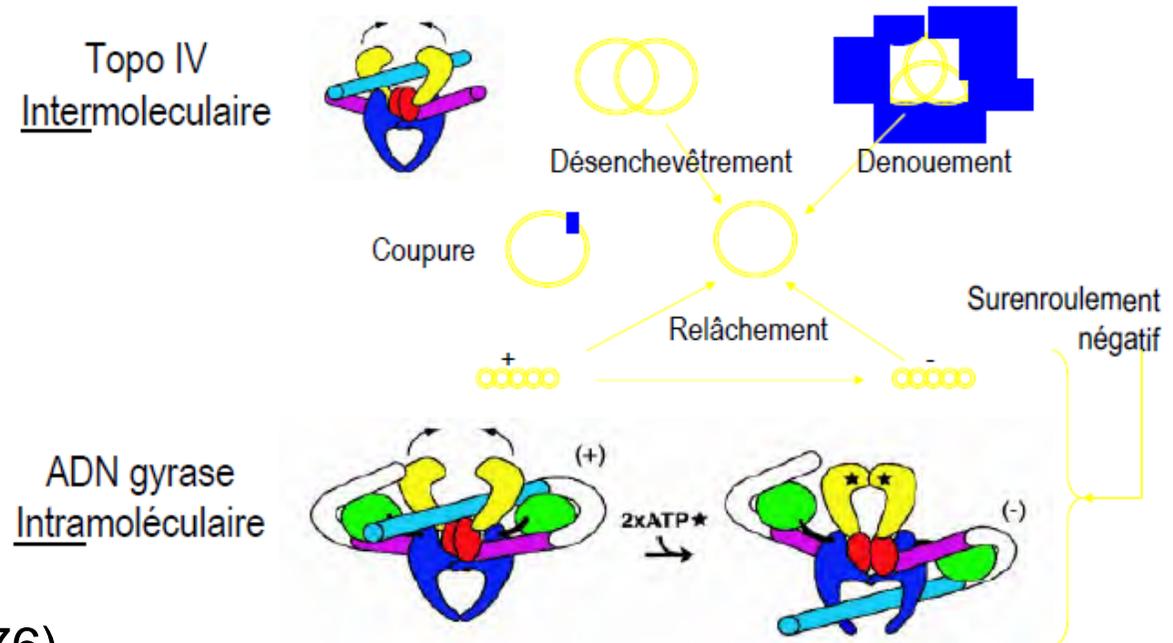
Fig. 4

Les cibles des quinolones ; les topoisomérases de type II bactériennes

# Enzymes cibles des fluoroquinolones

## Topoisomérase IV (1990)

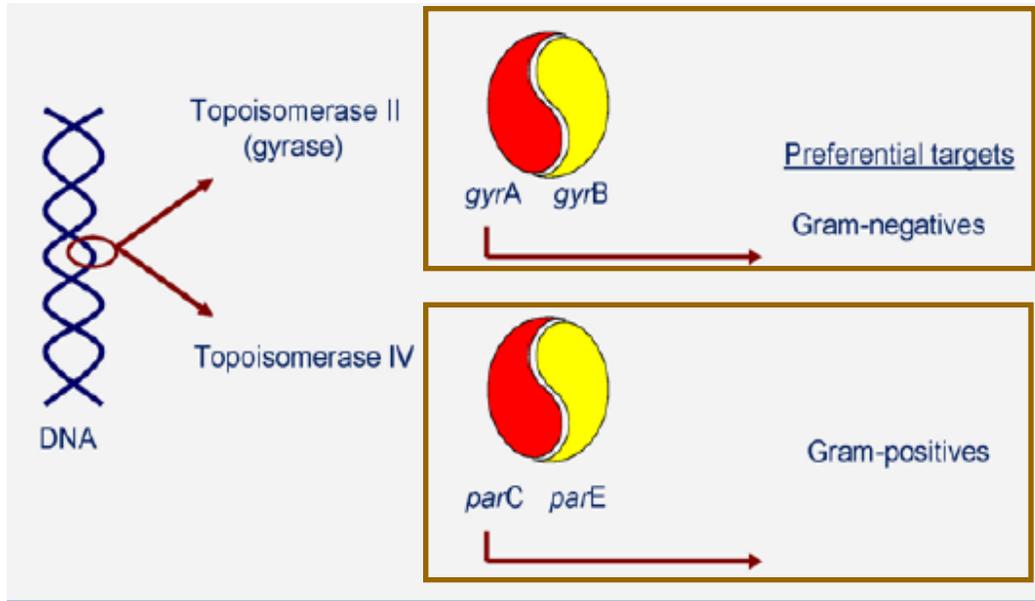
- 40% de similitude avec gyrase
- Empêcher le désenchevêtrement des ADN fils en fin de réplication
- 2 ParC et 2 ParE
- Codées: 2 gènes *parC* et *parE*



## Topoisomérase II ou ADN-gyrase (1976)

- Surenroulement de l'ADN
- 2 Gyr A et 2 Gyr B
- Codées : 2 gènes *gyrA* et *gyrB*

# Cible préférentielle



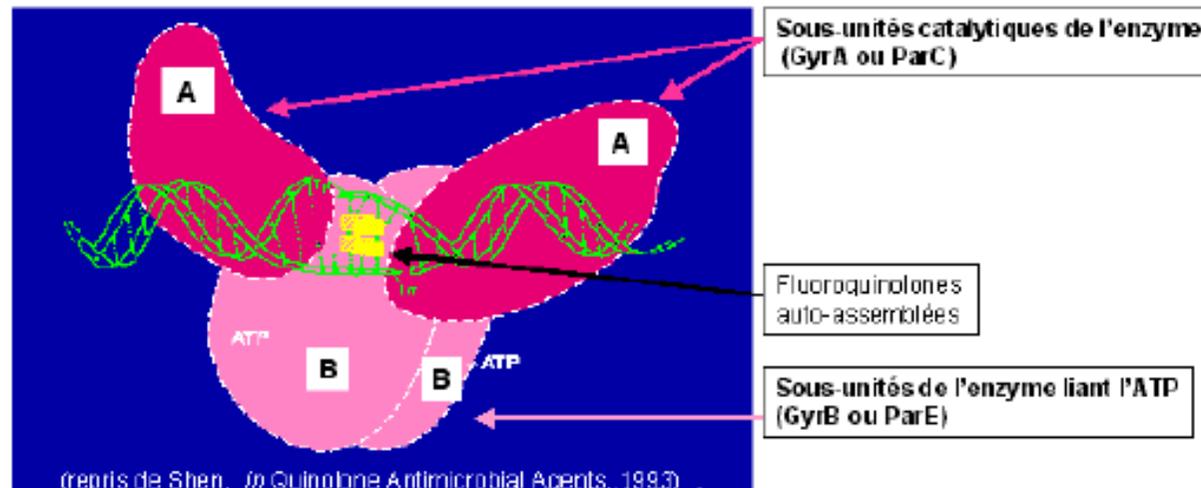
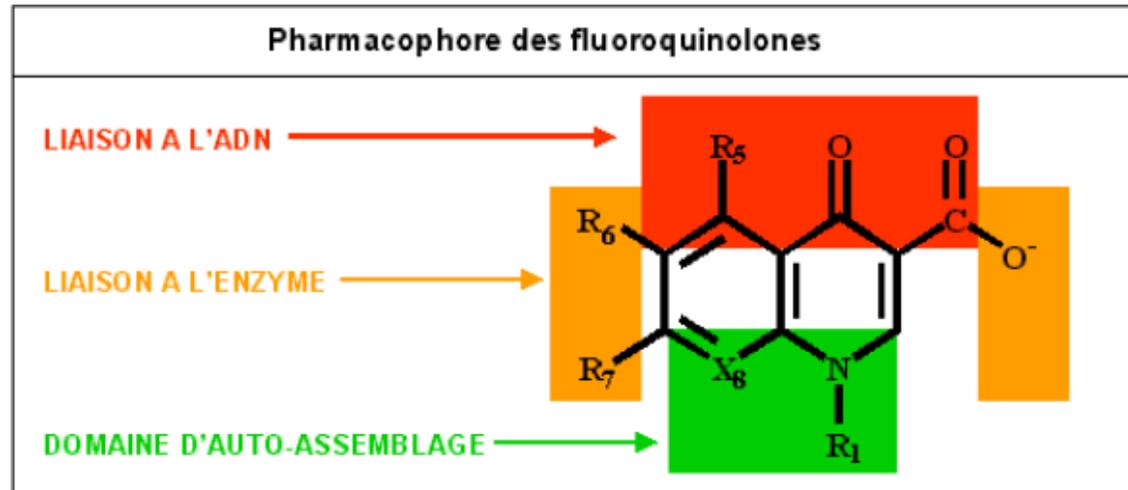
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. pneumoniae</i>	
	Gyr	Topo	Gyr	Topo	Gyr	Topo
<b>Cipro</b>	X			X		X
<b>Sparflo</b>	X		X	X		X
<b>Levoflo</b>	X			X		

**Dépend de l'espèce et de la FQ**

---

# Cas particuliers

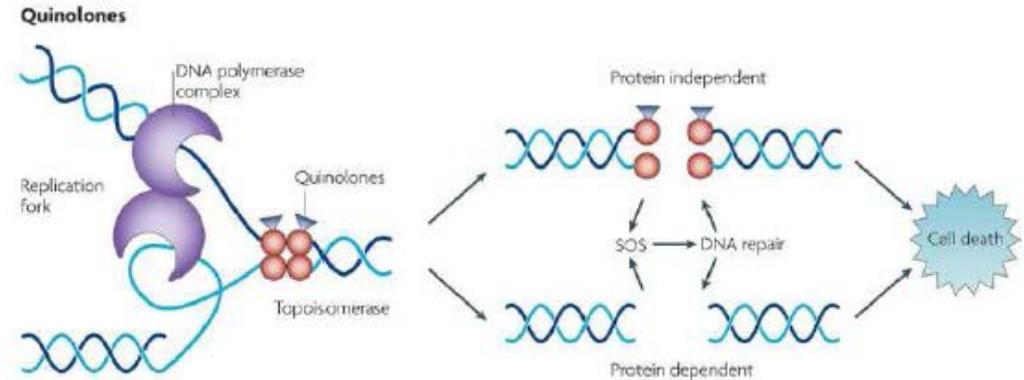
- Chez certaines bactéries/
    - *M. tuberculosis*
    - *M. leprae*
    - *T. pallidum*
    - *H. pylori*
  - Pas de topoisomerase IV
  - ADN gyrase = Seule cible des quinolones
-



Formation d'un **complexe ADN-topoisomérase-quinolones**

# Formation d'un complexe ADN-gyrase-quinolones

- **Absence de fermeture de l'ADN**
  - ↪ Blocage de la réplication
  - ↪ Coupures des 2 brins d'ADN
  - ↪ **Signal induisant le système SOS:**



☞ **Effet bactéricide intense**

Michael A. et al,  
*Nature Reviews Microbiology* 8, 423-435 (June 2010)

---

## Effet bactériostatique paradoxal à fortes doses

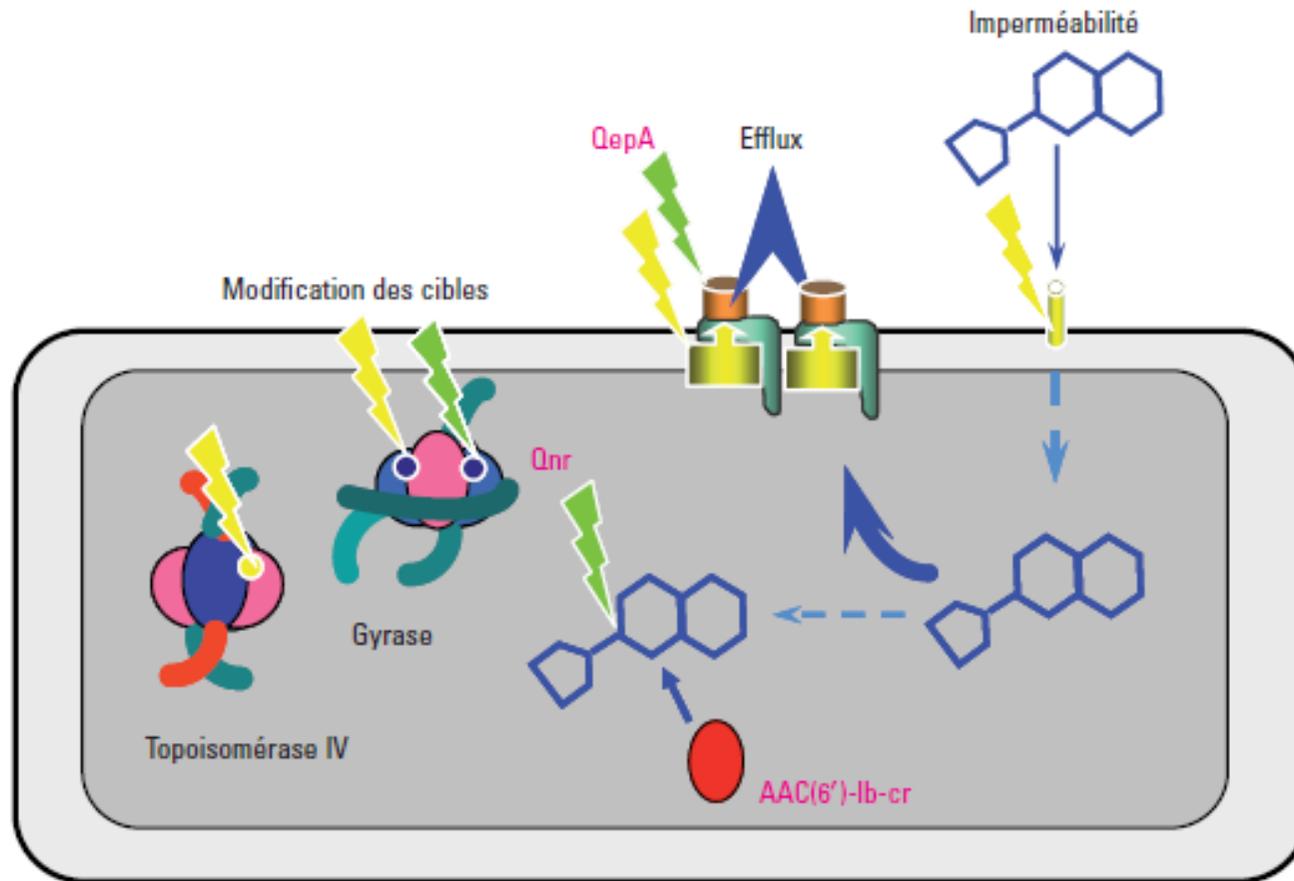
- A doses élevées FQ inhibent synthèse ARNm bactérien par inhibition de l'ARN-polymérase

 **Inhibition de la synthèse protéique**

---

Rançon de large utilisation des FQ  
=  
Emergence et diffusion de souches R  
[R aux FQ  
+  
R croisées: effets collatéraux]

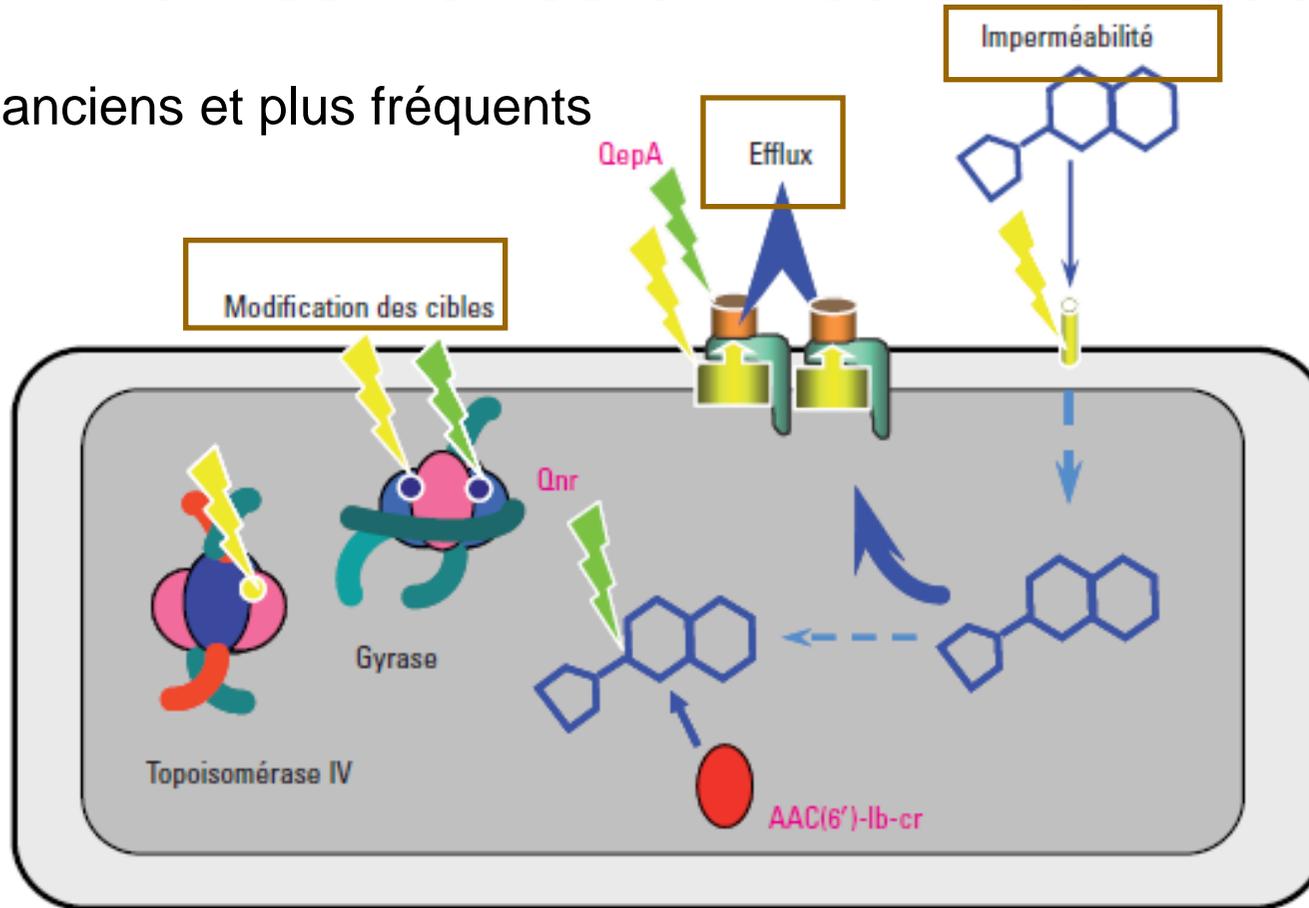
# Mécanismes de résistance acquise aux FQ



- Inactivation des cibles
- Les résistances chromosomiques sont les plus fréquentes
  - Les résistances plasmidiques sont les plus récentes

# Mécanismes de résistance chromosomique

Plus anciens et plus fréquents



Inactivation des cibles

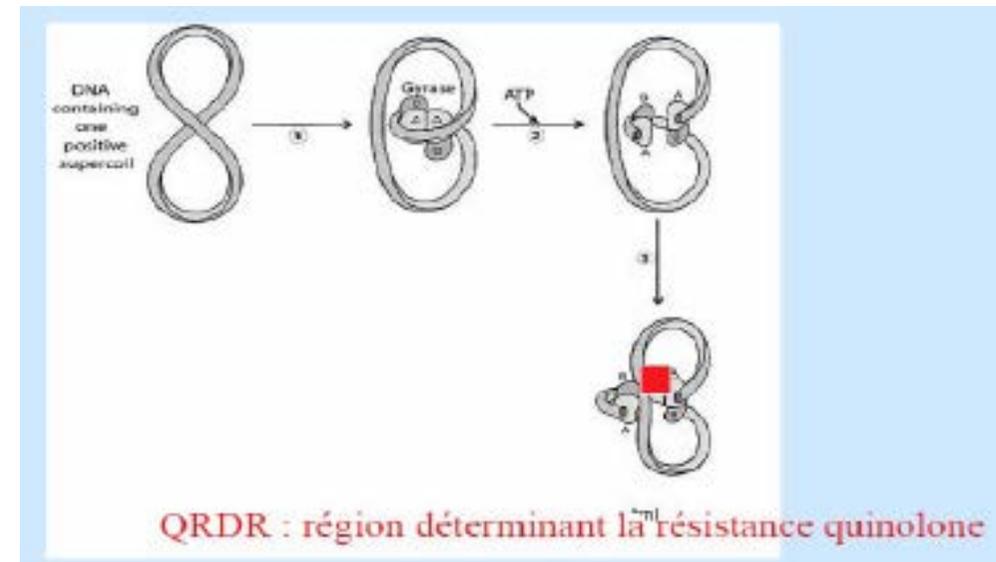
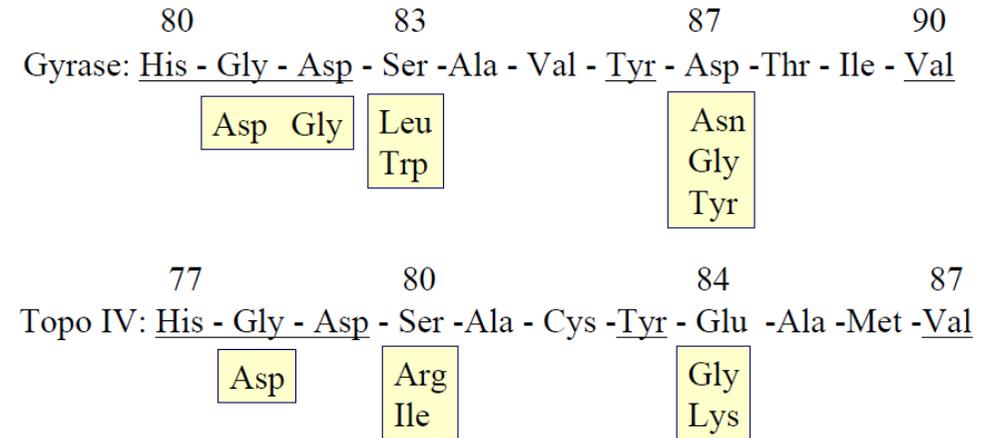
- Les résistances chromosomiques sont les plus fréquentes
- Les résistances plasmidiques sont les plus récentes

Plusieurs mutations doivent s'additionner

↪ R de haut niveau ↪ Effet clinique

# 1- Résistance par modification de la cible

- **Principal mécanisme**
- Mutations sélectionnées en présence de quinolones avec une **fréquence  $10^{-8}$**
- Mutations ↪ plus souvent sur ***gyrA* ou *parC***, plus rarement sur *gyrB* ou *parE*
- Région spécifique **QRDR: site actif de l'enzyme**



# Chez bactéries GN:

*gyrA* = Site privilégié des mutants de 1<sup>ier</sup> niveau

Mutation ponctuelle  
dans le gène d'une cible ]

Serine-83 in *gyrA*

(Thr) A	(Stop) A	(Ser) <del>A</del>
(Ala) G	<b>T C G</b>	(Ser) <del>C</del>
(Pro) C	(Trp) G	(Leu) T

**Chez *Salmonella*:**  
mutations isolées au niveau de ParC  
(Ling et al. AAC 2003)

**Chez *E. coli*:**

- Mutations les plus fréquentes: 83 (Ser83Leu) et 87 (Asp87His) de GyrA  
↳ HNR à NA et BNR aux FQ
- Mutations au niveau du codon 81 (exceptionnelle)  
↳ Phénotype atypique : S à NA et R aux FQ (Cattoir V, JAC 2006)
- Dans mutations en dehors de QRDR: rapportées

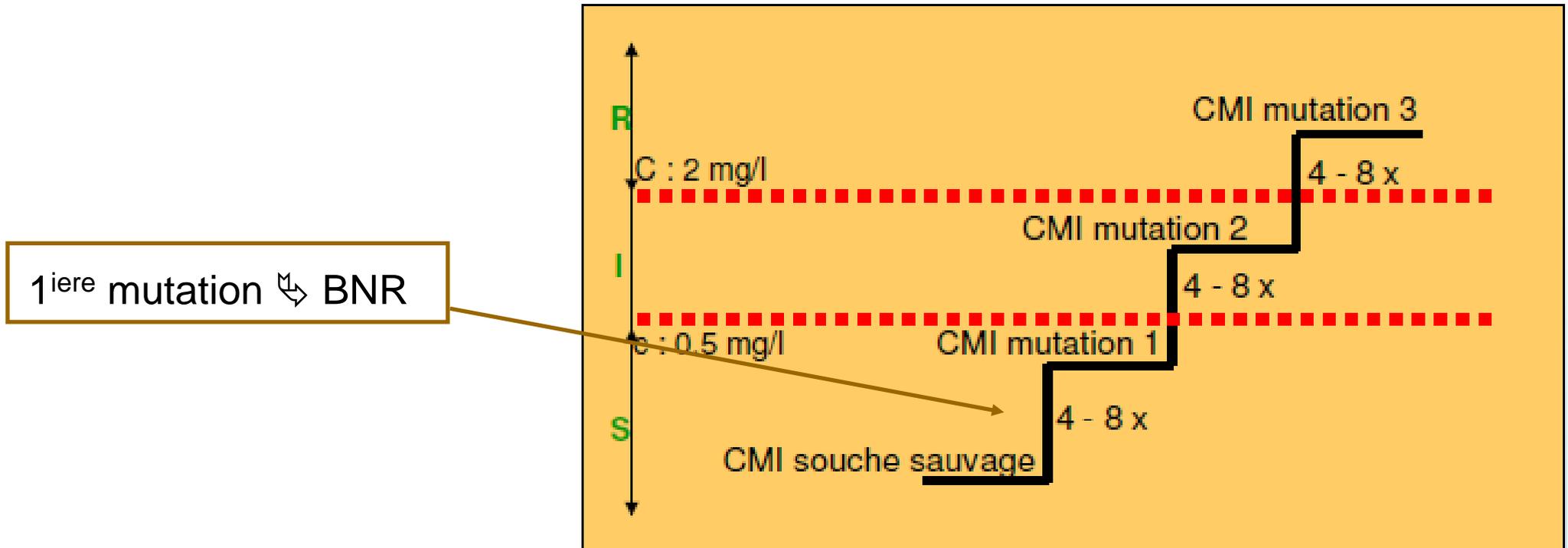
# Chez les bactéries Gram positif:

Tableau II – Cibles préférentielles des fluoroquinolones chez *S. aureus*, *S. pneumoniae*.

Quinolones	Cible préférentielle : site privilégié des mutations observées chez les mutants de 1 <sup>er</sup> niveau	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Acide nalidixique	GyrA	Non déterminé
Péfloxacin	ParC	ParC
Norfloxacin	ParC	ParC
Ciprofloxacine	ParC	ParC
Lévofloxacine	ParC	ParC
Sparfloxacine	ParC	GyrA
Moxifloxacine	ParC	GyrA
Gatifloxacine	ParC	GyrA
Garénoxacin	GyrA	GyrA

Le **site privilégié** des mutations observées chez les **mutants de 1<sup>er</sup> niveau** est **variable** en fonction de la cible préférentielle de FQ

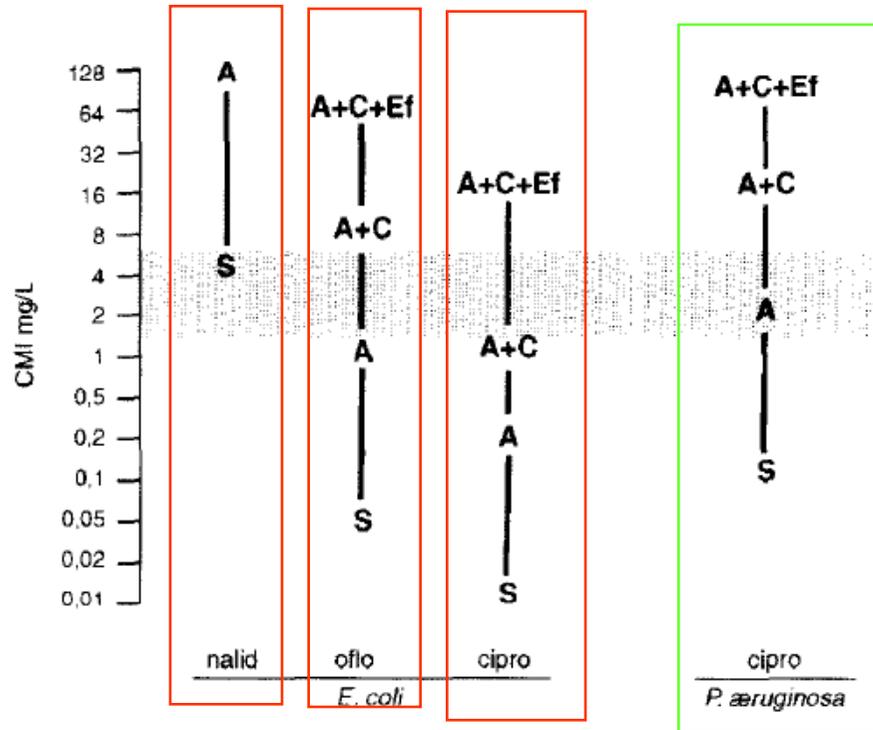
# Notion de « palier » ou « marche d'escalier »



Évolution progressive des résistances se fait par **mutations successives**

Chaque marche représente une mutation spontanée qui multiplie par 4 à 8 x CMI

- Chez BGN, une seule mutation dans la QRDR de *gyrA* suffit pour entraîner une résistance de haut niveau à l'acide nalidixique

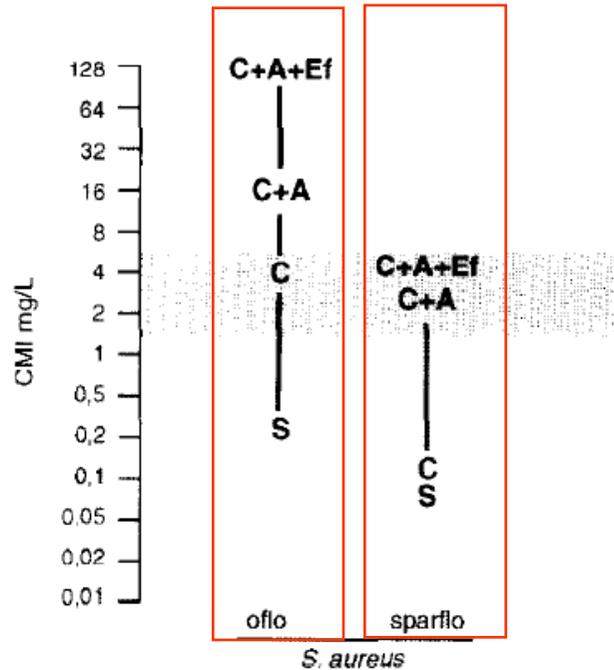


**Figure 1.** Effet des mutations sur la sensibilité aux quinolones des bactéries à Gram négatif.

En grisé, zone intermédiaire pour les fluoroquinolones ; nalid = acide nalidixique ; oflo = ofloxacin ; cipro = ciprofloxacine ; S = souche sauvage ; A = mutation *gyrA* (sous-unité de l'ADN gyrase) ; C = mutation *parC* (sous-unité de la topo-isomérase IV) ; Ef = mutation d'efflux.

- En revanche, la R à l'ofloxacin peut nécessiter 2 mutations
- alors qu'il en faudra 3 pour la ciprofloxacine

# Chez les CGP



**Figure 2.** Effet des mutations sur la sensibilité aux quinolones des bactéries à Gram positif.

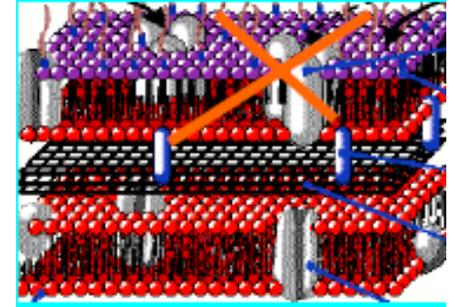
En grisé, zone intermédiaire ; oflo = ofloxacin ; sparflo = sparfloxacin ; lévoflo = lévofloxacin ; moxiflo = moxifloxacin ; S = souche sauvage ; A = mutation *gyrA* (sous-unité de l'ADN gyrase) ; C = mutation *parC* (sous-unité de la topo-isomérase IV) ; Ef = mutation d'efflux.

**Streptocoques** une seule mutation entraîne souvent une résistance clinique

## 2- Résistance par défaut d'accumulation

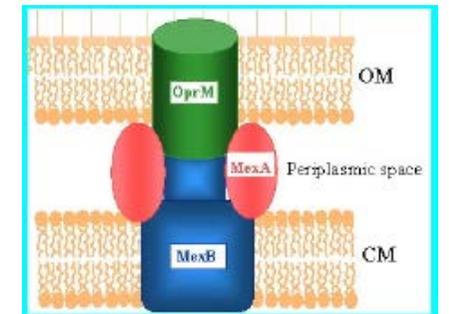
### 1- Diminution de perméabilité:

Mutation ↪ Porines / OmpF (modification quantitative et/ou qualitative)

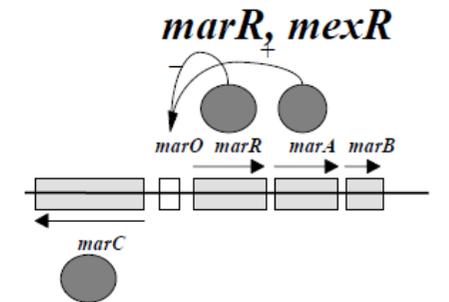


### 2- Efflux actif

- Mutations dans la région régulatrice  
↪ Hyperactivité de ces systèmes



↪ Bas niveau de R  
↪ R croisées à plusieurs molécules

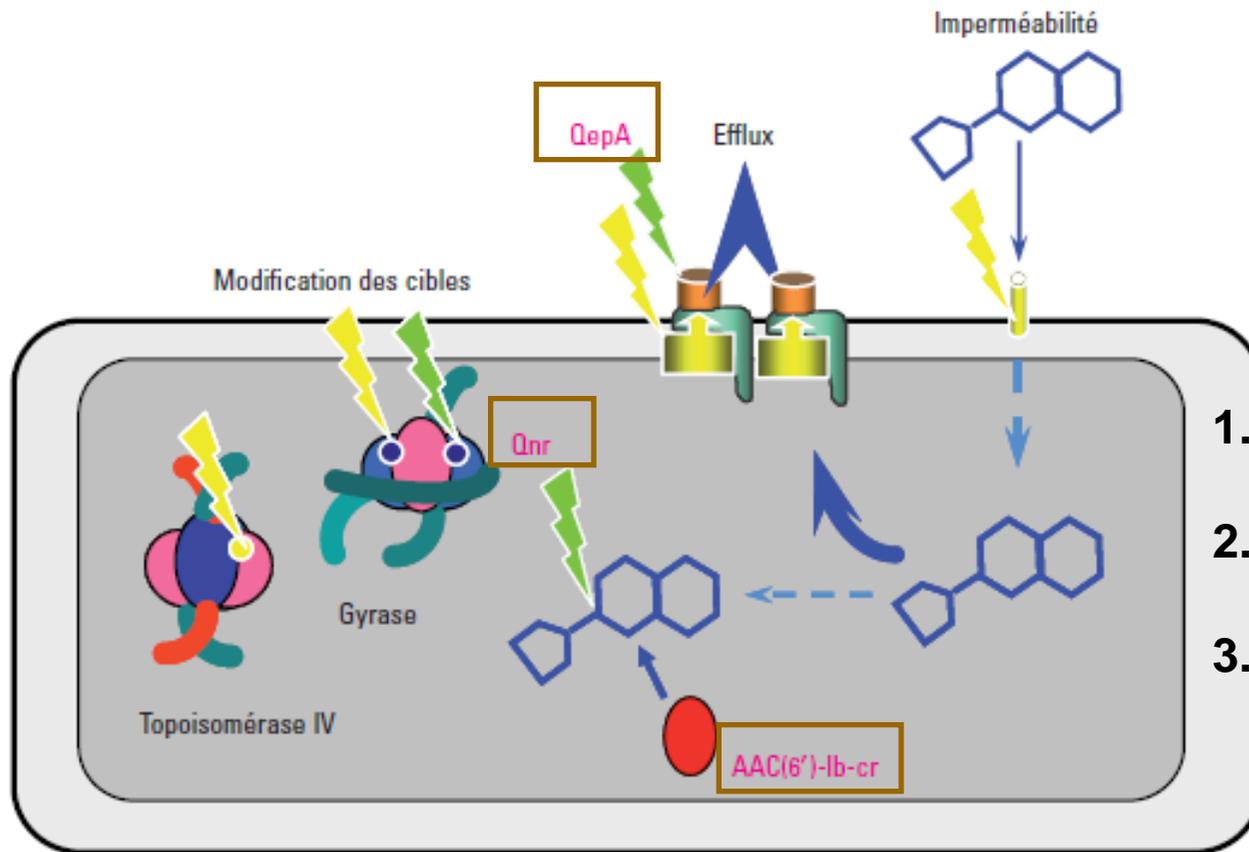


---

# Mécanismes de résistance plasmidiques

- Plus récents
  - Chez bacilles à Gram négatif
  - Bas niveau de R ↪ Facilite la sélection des mutants R par FQ et augmente l'effet des mutations
  - Transférable horizontalement entre bactéries
-

# Mécanismes de résistance plasmidiques



1. Protection de la cible
2. Modification enzymatique des FQ
3. Pompes à efflux

Les résistances chromosomiques sont les plus fréquentes

Les résistances plasmidiques sont les plus récentes

---

# 1- Protection de la cible (1998)

- ***qnrA1*** (quinolone resistance) : *K. pneumoniae* isolée en 1998 aux USA
  - Depuis, nombreux autres gènes *qnr* décrits :
    - ***qnrA, qnrB, qnrS, qnrC et qnrD*** (chacun plusieurs allèles dont la description est consignée sur le site [www.lahey.org](http://www.lahey.org))
  - **Protéines Qnr**
    - Appartiennent à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés (PRP), protéines constituées de séries de répétition en tandem de 5 AA
      - ↳ Protègent les topoisomérases de l'action des Q
-

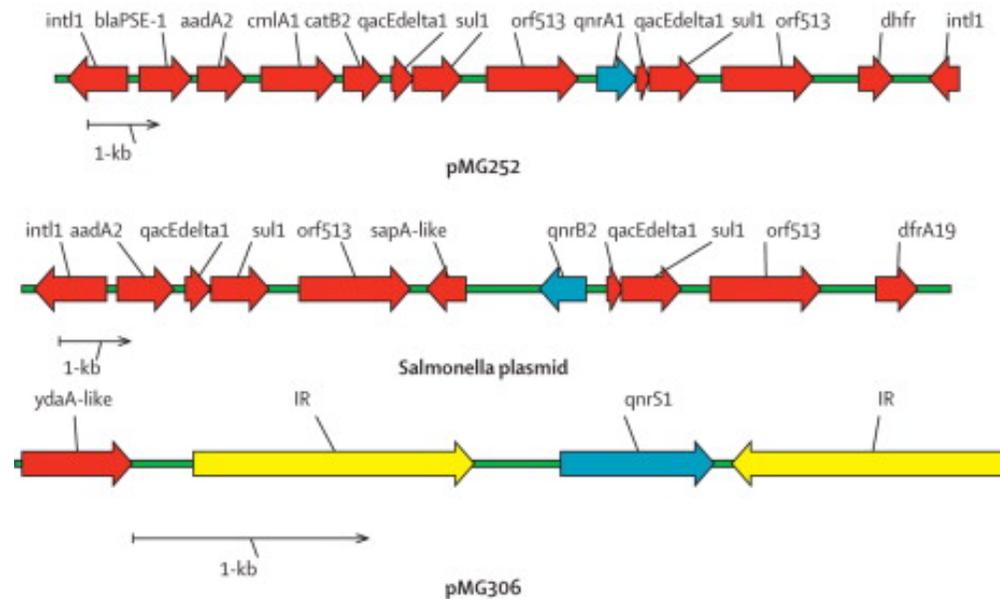
# CMI<sub>50</sub> de souches cliniques hébergeant *qnrA* / leur transconjugants

Antibiotic	MIC <sub>50</sub> (mg/L)		
	clinical isolates	transconjugants in <i>E. coli</i> J53	<i>E. coli</i> J53
Ciprofloxacin	16	0.25	0.01
Levofloxacin	32	0.5	0.01
Moxifloxacin	32	0.5	0.03
Nalidixic acid	≥256	16	4
Sparfloxacin	32	1	0.01

## Qnr ↪ HNR à NA et BNR aux FQ

↪ Transconjugants restent S aux FQ d'après les critères officiels des comités experts malgré des CMI multipliées parfois par 30

# Support génétique: Plasmides transférables



*qnr* + d'autres marqueurs de R / BLSE : intégrons de type *sul1(orf513 / orf1*:  
codant **recombinases** ↪ **Mobilisation +++**

# Origine des *qnr*

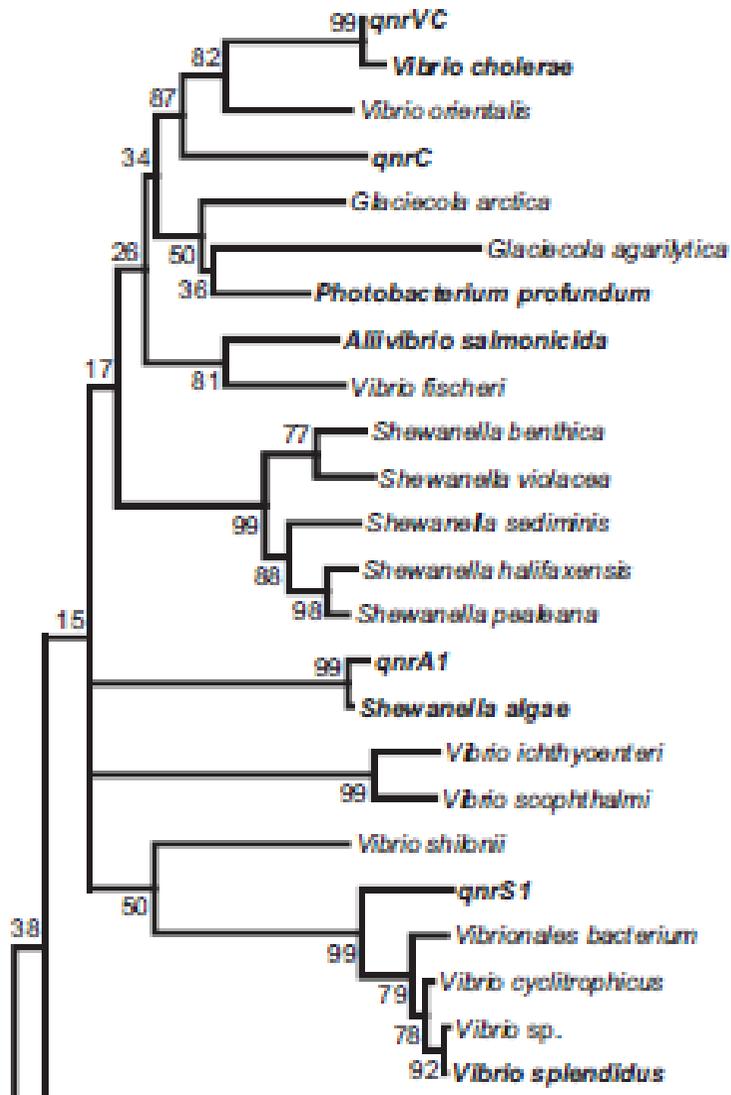
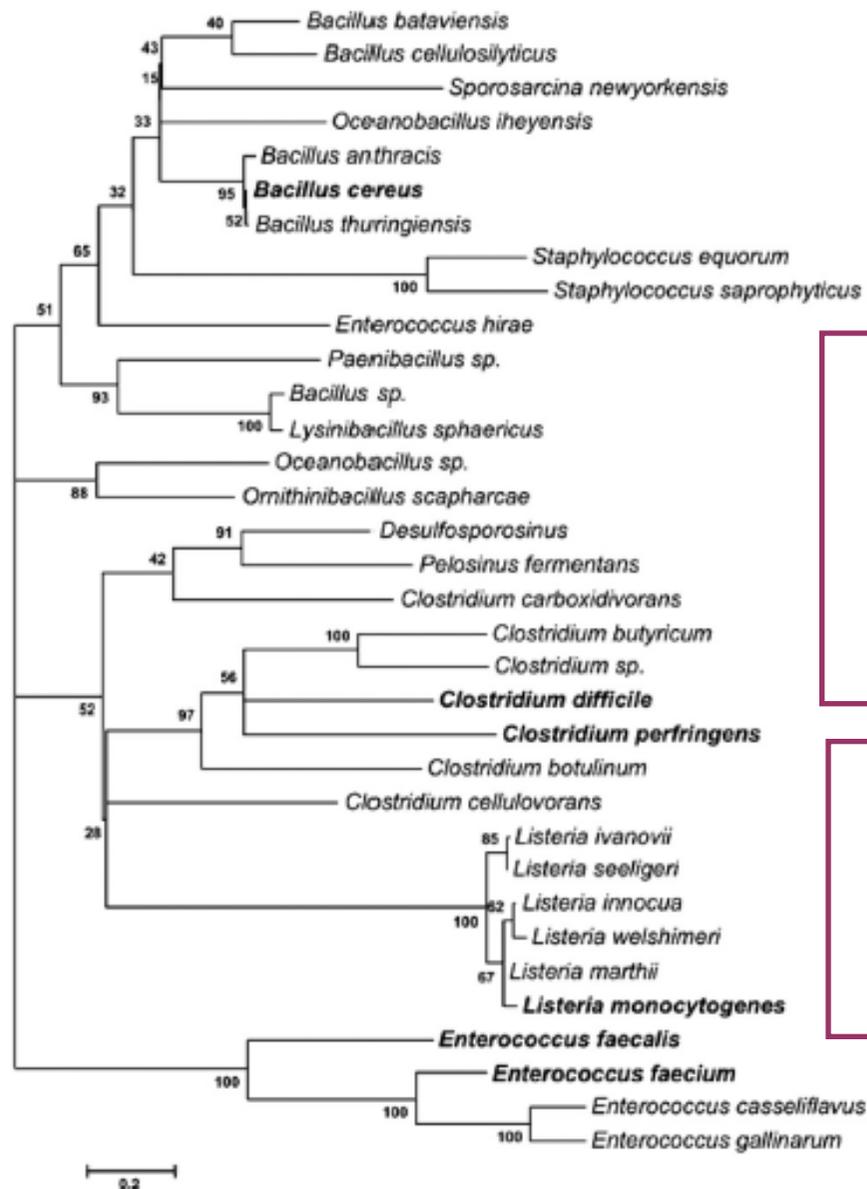


FIG 1 Phylogenetic tree of Qnr from gammaproteobacteria.

*qnr* auraient été mobilisés à partir de gènes ***qnr* chromosomiques** présents chez des bactéries de l'environnement hydrique/  
***Vibrionaceae* et *Shewanella algae***

**Gènes *qnr* chromosomiques**  
En 2008, chez *S. maltophilia* : *smqnr*  
En 2010, chez *S. marcescens*: *smaqnr*



Plusieurs gènes ***qnr-like*** chromosomiques: McbG et MfpA (20% identité) ont été décrits chez certaines bactéries à Gram positif ***E. faecalis*** ou chez les mycobactéries (***M. smegmatis***, ***M. tuberculosis***)

↪  
Pourraient être impliqués dans la résistance intrinsèque de bas niveau aux FQ chez ces espèces

FIG 2 Phylogenetic tree of Qnr from Gram-positive bacteria, derived as described for Fig. 1. Qnr from the organisms shown in bold was used to initiate the search.

---

# Epidémiologie

- QNR ↪ Décrit chez > 300 espèces
    - Entérobactéries +++
    - *A. baumannii*, *Pseudomonas sp*
    - Jamais chez *P. aeruginosa* !
  - Diffusion mondiale +++
  - Prévalence de 0,2 à 94% (Cattoir, Curr Med Chem,2009)
  - **Association fréquente aux  $\beta$ -lactamases (BLSE, Amp C, KPC, VIM ...)**
  - **En Tunisie**
-

## Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* from Tunisia

S. Dahmen<sup>1,2</sup>, L. Poirel<sup>1</sup>, W. Mansour<sup>2</sup>, O. Bouallègue<sup>2</sup> and P. Nordmann<sup>1</sup>

1) Service De Bactériologie-Virologie, INSERM U914 'Emerging Resistance to Antibiotics', Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine et Université Paris-Sud, France and 2) Unité des Infections à Bactéries Multirésistantes aux Antibiotiques, UR/29/04, Laboratoire de Microbiologie, CHU Sahloul, Sousse, Tunisia

- 281 entérobactéries R à NA (Septembre 2005 et Décembre 2010)
  - ↳ 45 (16%) hébergeaient *qnr*
    - 12 *qnrA6*
    - 11 *qnrB1*
    - 7 *qnr S1*

*Full Length Research Paper*

**First characterisation in Tunisia of plasmid mediated AmpC bêta-lactamase DHA-1 coexpressed TEM-24 and QnrA6 in a multidrug resistant *Proteus mirabilis* clinical strain**

Sihem Mahrouki<sup>1\*</sup>, Hela Chihi<sup>1</sup>, Amel Bourouis<sup>1</sup>, Mohamed Ben-Moussa<sup>2</sup>, Farouk Barguellil<sup>2</sup>  
and Omrane Belhadj<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biochimie et de Technobiologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis El-Manar, 2092 El-Manar II, Tunis, Tunisia.

<sup>2</sup>Service de Bactériologie, Hôpital Militaire de Tunis, 1089 Monfleury, Tunisie.

---

---

# Hôpital Charles Nicolle de Tunis

- **Entre 2006-2009: 300 *E. coli* uropathogènes**
    - 5 *qnr* (1.61%): 1 *qnrS1*, 1 *qnrA6* et 3 *qnr B1*
  - **2010:**
    - 40 *E. coli* BLSE ↪ 3 *qnr B1*
    - 40 *E. cloacae* BLSE ↪ 19 *qnr* (1 *qnr S1*, 16 ***qnrB1***, 1 *qnrB4* et 1 *qnrB13*)
    - 40 *K. pneumoniae* BLSE ↪ 8 *qnr* (1 *qnrS1*, 7 ***qnrB1***)
-

## 2- Modification enzymatique de la cible (2006)

- *aac(6')-Ib-cr* = variant du classique gène *aac(6')-Ib* :  
2 mutations (Trp102 Arg et Asp179Tyr)

### AAC(6')-Ib avec 2 substitutions : AAC(6')-Ib-cr :

```
AAV59012.1 -----MINSNDVTLRLMTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 41
BAD73861.1 -----MINSNDVTLRLMTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 41
AAF27724.1 -----MTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 29
AAC46343.1 MLESSESRKTKLGI TKYSIVTNSNDVTLRLMTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 60
AAC23553.1 -----MLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 22
AAC(6')-Ib-cr ---MENA KTKLGI TKYSIVTNSNDVTLRLMTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 56
AAN77713.1 -----MTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 29
AAL93141.1 --MSIQHPQTKLGI TKYSIVTNSNDVTLRLMTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 58
A28388 --MSIQHPQTKLGI TKYSIVTNSNDVTLRLMTEHDLAHLVEKLNRS HIVEWGCEEARP 58
*****

AAV59012.1 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 101
BAD73861.1 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 101
AAF27724.1 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 89
AAC46343.1 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 120
AAC23553.1 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 82
AAC(6')-Ib-cr TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 116
AAN77713.1 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 89
AAL93141.1 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 118
A28388 TLADVQBQYLPVLAQESVTPYIAMLNCEPIGYAQS TVALGSCDGNWEEETDQVRCIDQ 118
*****

AAV59012.1 SLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 161
BAD73861.1 SLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 161
AAF27724.1 SLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 149
AAC46343.1 LLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 180
AAC23553.1 SLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 142
AAC(6')-Ib-cr LLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 176
AAN77713.1 LLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 149
AAL93141.1 LLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 178
A28388 LLANASQLGKGLGTELVRALVELLFNDPEVTKIQTDPSDSNLPRAIRCYEKACFERQGTVT 178
*****

AAV59012.1 TFDGDAVIMVQTRQAFERTESDA 184
BAD73861.1 TFDGDAVIMVQTRQAFERTESDA 184
AAF27724.1 TFDGDAVIMVQTRQAFERTESDA 172
AAC46343.1 TFDGDAVIMVQTRQAFERTESDA 203
AAC23553.1 TFDGDAVIMVQTRQAFERTESDA 165
AAC(6')-Ib-cr TFDGDAVIMVQTRQAFERTESDA 199
AAN77713.1 TFDGDAVIMVQTRQAFERTESDA 172
AAL93141.1 TFDGDAVIMVQTRQAFERTESVA 201
A28388 TFDGDAVIMVQTRQAFERTERFA 201
*****
```

Robicsek et al., Nat Med 2006

---

## 2- Modification enzymatique de la cible (2006)

- **Enzyme AAC(6')-Ib-cr :**

- ↳ Inactiver les aminosides et les FQ par acétylation

- FQ les plus touchées = les plus hydrophiles: **ciprofloxacin** et **norfloxacin**, alors que la lévofloxacin n'est pas touchée

- Aminosides touchés: **tobramycine** , **amikacine**, **kanamycine**

- Bas niveau de résistance: CMI x 2-4

- Prévalence de 0,4 à 34% : 14% des entérobactéries CAZ R

---

# En Tunisie

- Detection of **Unrelated *Escherichia Coli* Strains Harboring Genes of CTX-M-15, OXA-1, and AAC(6')-Ib-Cr** Enzymes in a Tunisian Hospital and Characterization of Their Integrons and Virulence Factors.  
Jouini, A et al. [Journal of Chemotherapy](#). 2010;(5):318-23

18 *E. coli*: Hôpital militaire de Tunis, en 2007

# Hôpital Charles Nicolle de Tunis

## ■ Entre 2006-2009: 300 *E. coli* uropathogènes

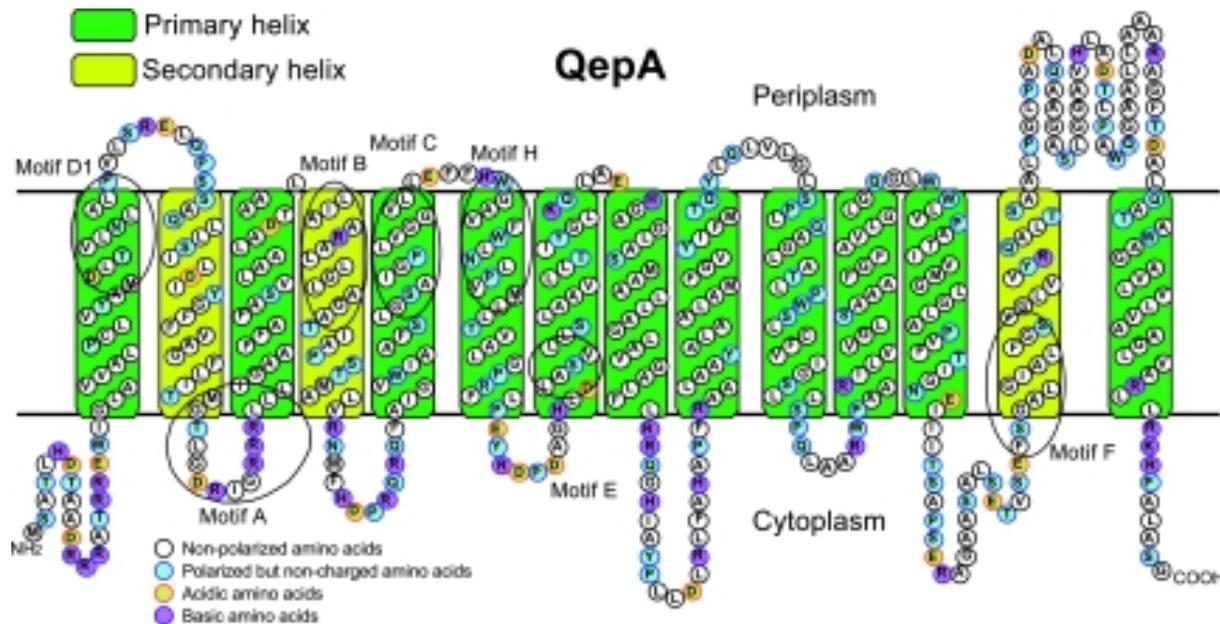
- 5 *qnr* (1.61%): 1 *qnrS1*, 1 *qnrA6* et 3 *qnr B1*
- 68 *aac(6')-lb-cr* (60 *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, 4 *bla*<sub>CMY-38</sub> et 2 *bla*<sub>TEM-1</sub>)

## ■ 2010:

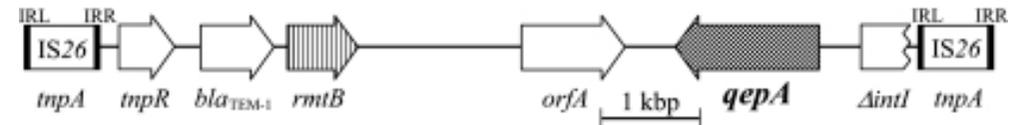
- 40 *E. coli* BLSE ↘ 3 *qnr B1* et 17 *aac(6')-lb-cr*
- 40 *E. cloacae* BLSE ↘ 19 *qnr* (1 *qnr S1*, 16 *qnrB1*, 1 *qnrB4* et 1 *qnrB13*) et 1 *aac(6')-lb-cr*
- 40 *K. pneumoniae* BLSE ↘ 8 *qnr* (1 *qnrS1*, 7 *qnrB1*) et 3 *aac(6')-lb-cr*

# 3- Pompes à efflux plasmidiques (2007)

- *qepA* codant QepA appartenant à la famille MFS (Major Facilitator Superfamily)

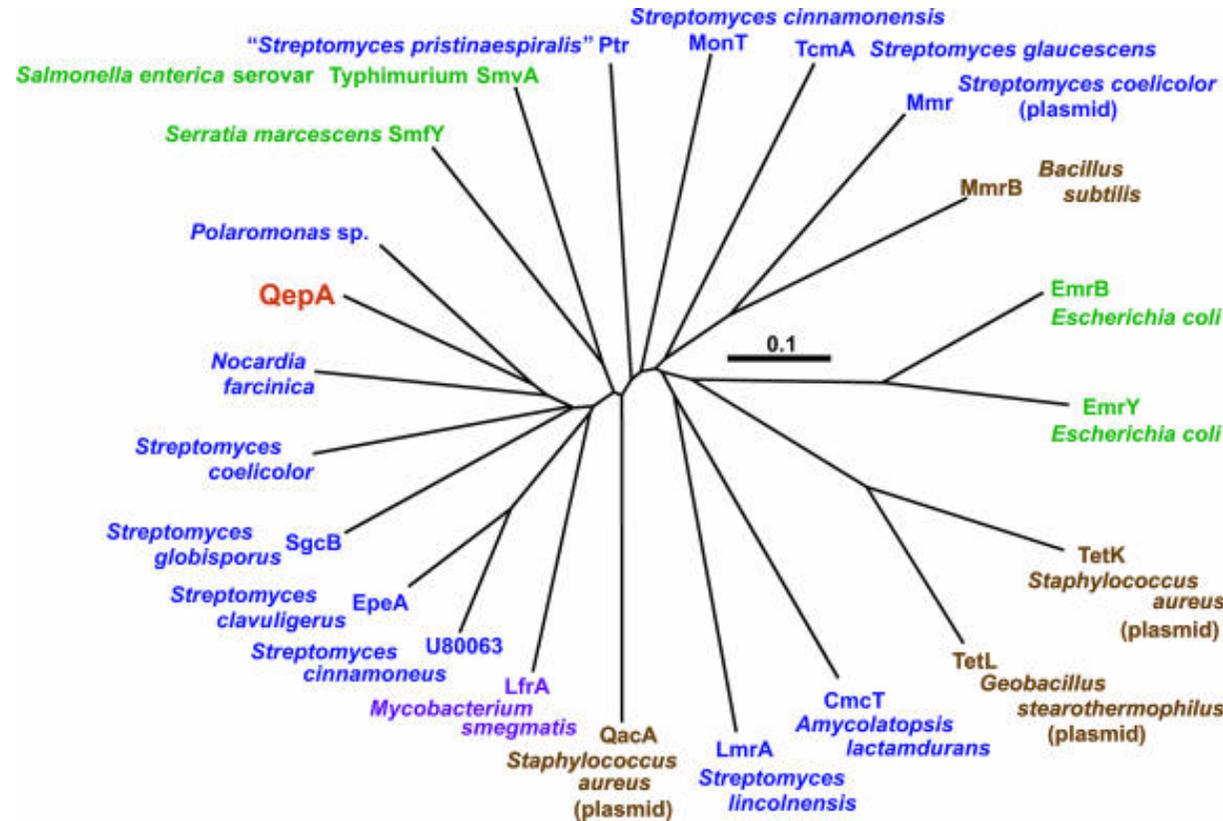


- Association à méthylase RmtB



# 3- Pompes à efflux plasmidiques (2007)

- Origine : Actinomycètes



- ↪ R aux FQ hydrophiles : norfloxacin et ciprofloxacine
- ↪ Augmentation des CMI 10 - 23 x
- Prévalence faible <1 %, non rapportée en Tunisie

---

### 3- Pompes à efflux plasmidiques (2007)

- **OqxAB** de la famille des RND (Resistance Nodulation Cell Division)
  - Codée par *oqxA* & *oqxB*
  - ↙ R aux quinoxalines croisée à de nombreux agents incluant cotrimoxazole, chloramphénicol et FQ
  - Initialement, souches *E. coli* d'origine porcine (Danemark et Suède)
-

### 3- Pompes à efflux plasmidiques (2007)

- En 2009, Corée du Sud, 1<sup>ière</sup> souches humaines:
  - *E. coli* (n=1), *E. cloacae* (n=3) et *K. pneumoniae* (n=100)
  - Plasmide conjugatif (pOLA52) chez *E. coli* et *E. cloacae*
  - Support chromosomique chez *K pneumoniae*
  - ↳ ***K. pneumoniae* réservoir !!!**
- **2012, Chine** (5,2% d'*E. coli* humaines)
- **En Tunisie (2010):** sur 40 *K. pneumoniae* BLSE: 26 ↳ *oqxAB*

# ∇ le mécanisme de R plasmidique ↪ BNR Mais facilite la sélection de HNR aux FQ

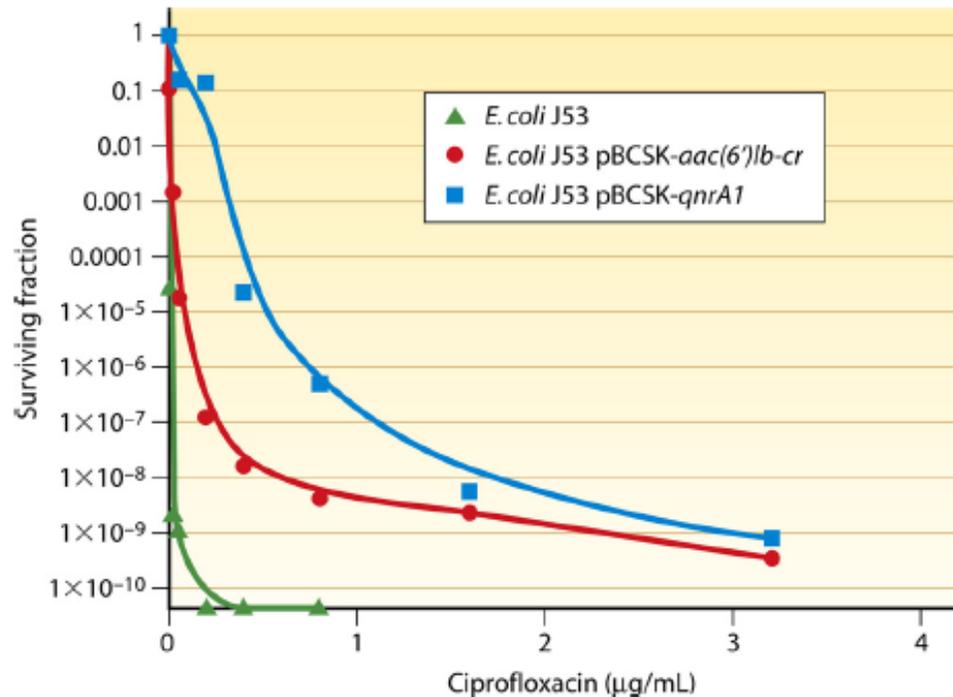


FIG. 2. MPC assay. About  $10^{10}$  organisms and appropriate dilutions were applied onto Mueller-Hinton agar plates containing the indicated concentrations of ciprofloxacin. Surviving colonies were counted after incubation for 72 h at 37°C. The lowest concentration of ciprofloxacin at which no mutant colonies were seen was 0.2 µg/ml for J53 and 3.2 µg/ml for J53 pBC SK-*aac*(6')*Ib-cr* or J53 pBC SK-*qnrA1*. (Reprinted from reference 163 with permission from Elsevier.)

La plus faible [Cip]<sup>o</sup> pour laquelle: pas de sélection de mutants R est:

0,2 µg/ml pour *E. coli* J53

3,2 µg/ml pour *E. coli* + *qnrA1*

3,2 µg/ml pour *E. coli* + AAC-(6')-1b-cr

Le plus souvent, association de **plusieurs mécanismes de R**  
(chacun étant acquis indépendamment)

↳ **R clinique**

1. **Sélection de mutants résistants +++**
2. **Transmission de souches résistantes**
3. **Transmission de gène de résistance chez certaines bactéries**
  - Par transformation et recombinaison homologue (streptocoques)
  - Par transfert de gènes plasmidiques (entérobactéries)

# 1- Sélection de mutants résistants

Toute prise antérieure de FQ



Risque individuel plus élevé d'être infecté  
par des bactéries résistantes aux FQ

# Exposition aux FQ et sélection de mutants résistants

*E. coli*: sensibilité et exposition aux ATB  
Présence ou non d'une antibiothérapie dans les 6 mois

	$\beta$ -lactamine		Quinolone	
	oui	non	oui	non
Amoxicilline	41	64	54	60
Co-Amoxiclav	41	67	59	62
Ac nalidixique	84	87	63	91
Ciprofloxacine	94	94	78	97

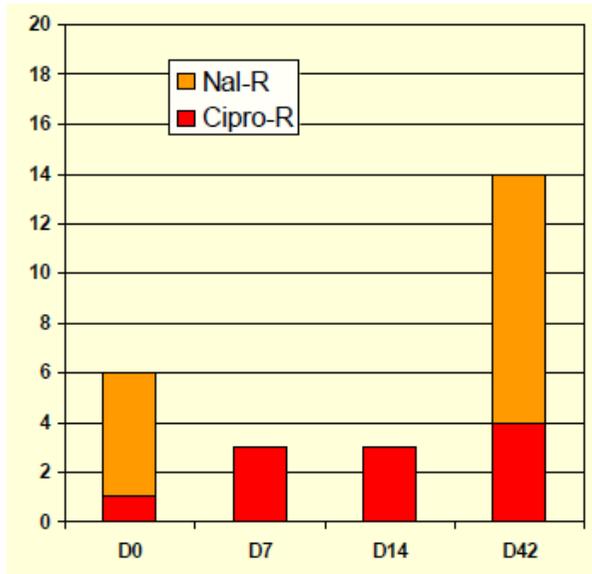
ONERBA - JNI - Nice juin 2005

---

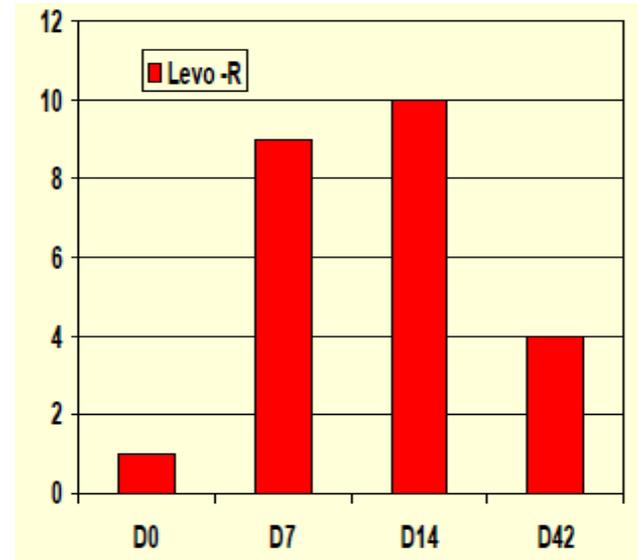
# Impact de la prescription de FQ

- **Emergence de R aux FQ**
    - Au sein du foyer infectieux
    - Sur les flores commensales +++
-

## Impact de la prescription des FQ sur les flores commensales +++



Dans la Flore Féciale: *E. coli* R



Dans la Flore Pharyngée : SNG R

Phénomène survient au hasard ↪ Ne peut être prévenue par l'optimisation du mode d'administration des FQ

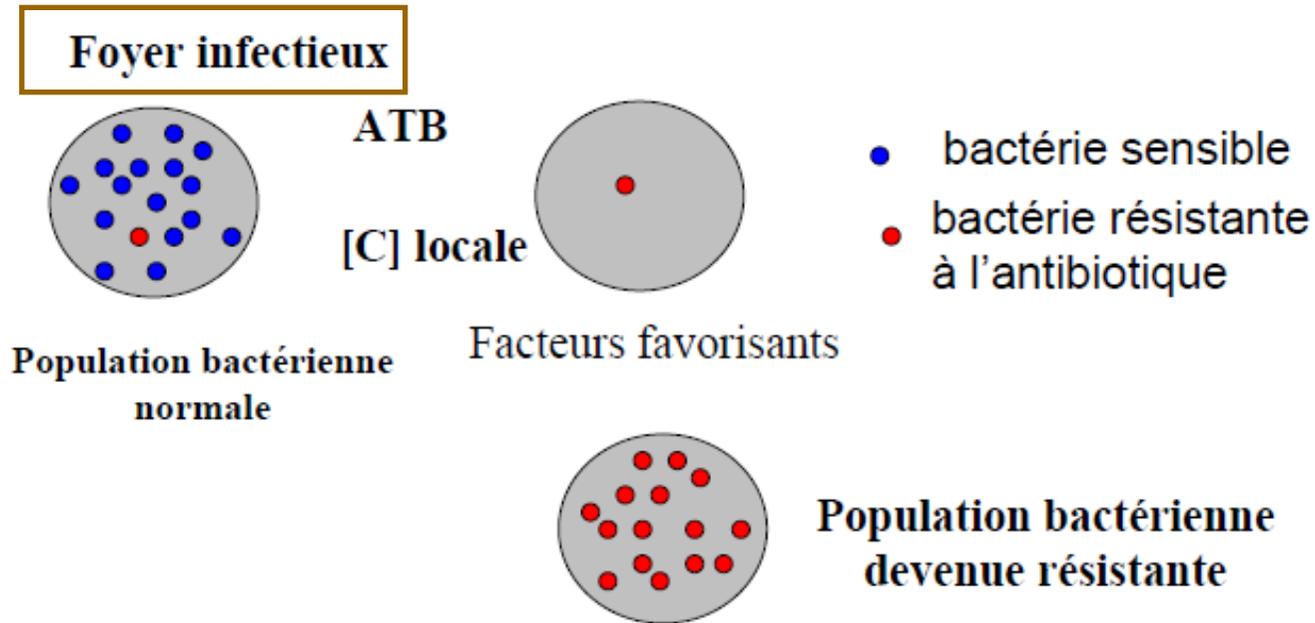
### **Les souches commensales peuvent soit:**

Devenir pathogènes par translocation

Transférer leurs mécanismes de résistance à des souches pathogènes

Participer à la dissémination interindividuelle de la résistance

# Schéma de sélection de mutants résistants



Évènement possible mais rare

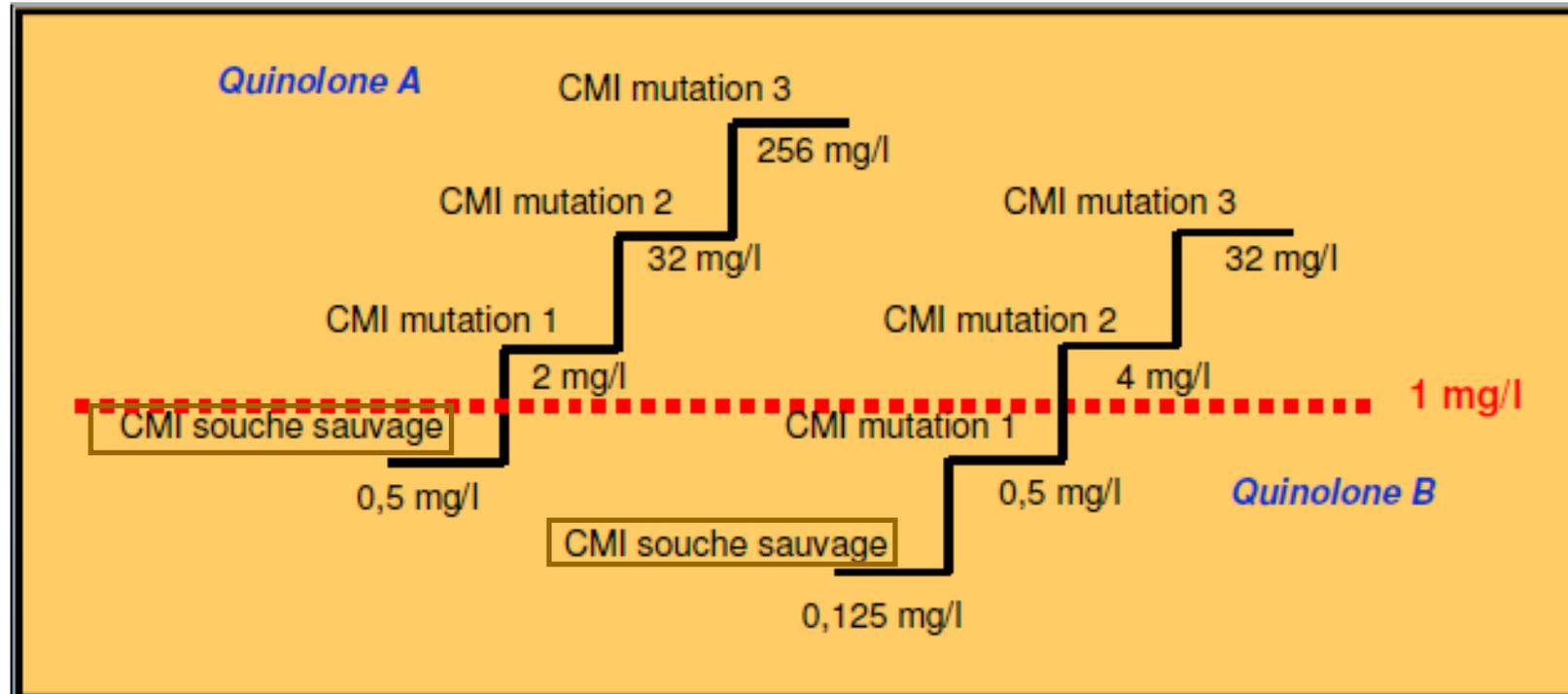
Fonction du nombre de bactéries présentes (taux de mutation)

---

# Sélection de mutants résistants sous traitement par FQ

- Rôle de souche bactérienne: **son niveau de résistance naturelle**
  - Rôle de la **posologie**
-

# Activité initiale des FQ sur la souche bactérienne +++



↪ Intérêt de détecter le bas niveau de résistance :  
risque de sélection de mutant résistant

# Rôle de la posologie dans sélection mutants R aux FQ

*Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2007) 60, 795–801  
doi:10.1093/jac/dkm265  
Advance Access publication 16 July 2007

JAC

## Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*

Sara K. Olofsson<sup>1\*</sup>, Linda L. Marcusson<sup>2</sup>, Ann Strömbäck<sup>1</sup>, Diarmaid Hughes<sup>2</sup> and Otto Cars<sup>1</sup>

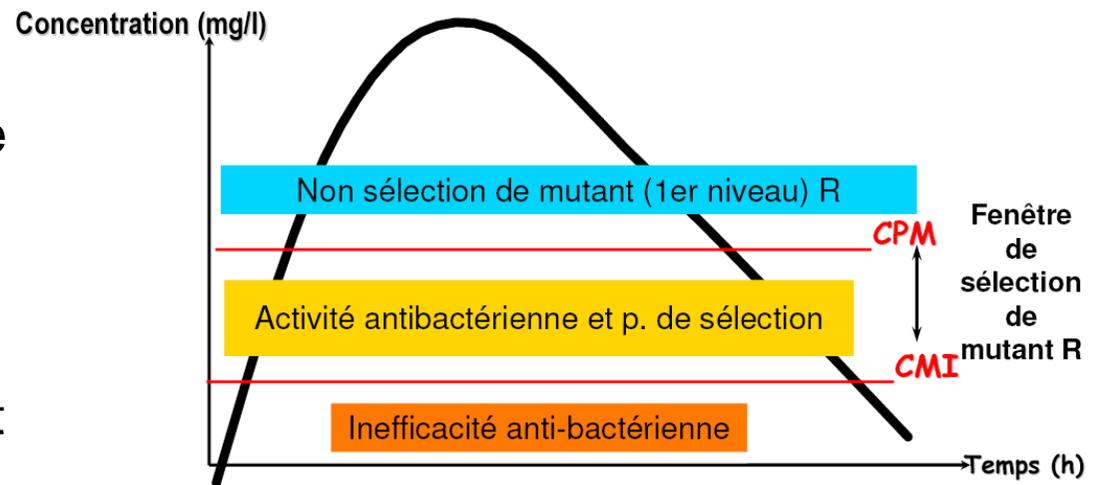
Dose (mg)	Cmax (mg/l)	Croissance bactérienne à 24 H		
		Sauvage (CMI <sub>CIP</sub> =0.012, S)	Simple mutant (CMI <sub>CIP</sub> =0.19, S)	Double mutant (CMI <sub>CIP</sub> =0.75, I)
CIP 100X2	0.39	-	+	+
CIP 250X2	0.98	-	-	+
CIP 500X2	1.54	-	-	+
CIP 750X2	2.94	-	-	-

# Prévention de mutants résistants aux FQ

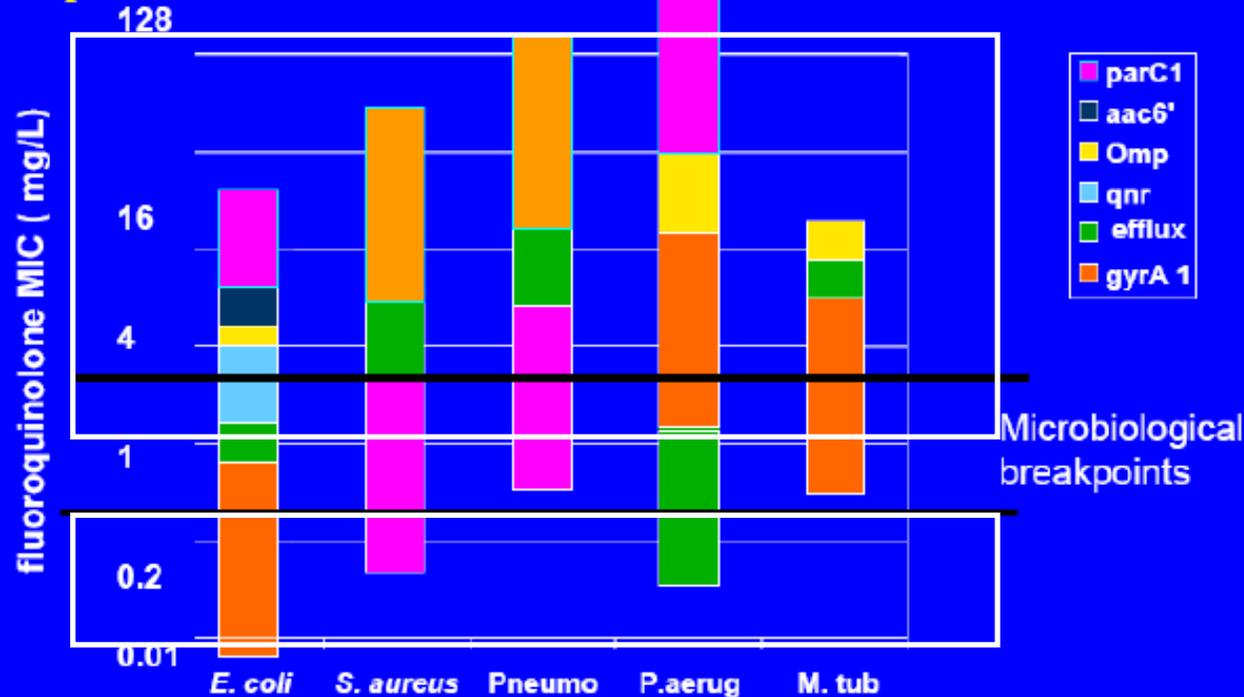
## ■ Principe de la CPM (C° de prévention des mutants)

= Seuil à partir duquel la probabilité de sélectionner un mutant résistant est extrêmement faible

= [FQ]<sup>o</sup> avec laquelle aucun mutant ne peut être obtenu, même lorsqu'un inoculum bactérien de 10<sup>10</sup> UFC/ml est utilisé



## Combined mechanisms are necessary to achieve a high level of quinolone resistance



Pr E. Cambau

- R acquise aux FQ = par étapes successives
  - ↪ **Très important** de pouvoir **détecter les BNR** (acquisition 1<sup>ier</sup> mécanisme de R)
  - ↪ **Exposant à l'acquisition d'un HNR** (résistance clinique)

---

# Rôle du Biologiste:

Devant la progression constante des résistances aux FQ

↳ Biologiste:

↳ Dépistage rapide des mutants de 1<sup>er</sup> niveau soit par:

- Mesure des **CMI**
- Détection d'une résistance à l'acide nalidixique pour les entérobactéries, *H. influenzae* et *N. gonorrhoeae*: ou d'une résistance à la norfloxacin pour les pneumocoques, afin d'avertir le clinicien du risque de bactéricidie diminuée

↳ Conseil en antibiothérapie: doit essayer d'épargner au maximum cette classe thérapeutique dès que d'autres alternatives sont possibles

---

# Recommandations des Comités de l'antibiogramme (CA-SFM)

Tableau V – Synthèse des concentrations critiques basses et hautes.

Quinolones	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
Ciprofloxacine	0,5 / 1	0,5 / 1	1 / 1
Lévofloxacine	1 / 2	1 / 2	1 / 2
Moxifloxacine	0,5 / 1	-	0,5 / 1
Norfloxacine	0,5 / 1	-	-
Ofloxacine	0,5 / 1	-	1 / 1
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>
Ciprofloxacine	0,12 / 2	0,5 / 0,5	0,03 / 0,08
Lévofloxacine	2 / 2	1 / 1	-
Moxifloxacine	0,5 / 0,5	0,5 / 0,5	-
Norfloxacine	-	-	-
Ofloxacine	0,12 / 4	0,5 / 0,5	0,12 / 0,25

Recommandées par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing et le CA-SFM en 2010 pour la catégorisation clinique des bactéries vis-à-vis des fluoroquinolones. Concentrations critiques (S ≤ / > R) en mg/L.

Interprétation selon valeurs critiques **progressivement harmonisées** avec celles recommandées par le Comité européen EUCAST et le CLSI

# Bas niveau de résistance : Détection +++

Tableau I – Phénotypes de résistance aux quinolones chez *E. coli* [8-10, 12, 13].

CMI Nal <sup>a,c</sup> (mg/L)	CMI Cip <sup>b,c</sup> (mg/L)	Mécanisme(s) de résistance probable(s)
2-4 [S]	0,01 [S]	Sauvage
2-4 [S]	0,04-0,08 [S]	AAC(6')-Ib-cr
2-4 [S]	0,12-0,25 [S]	QepA
8-32 [I/R]	0,12-0,25 [S]	Qnr
128-256 [R]	0,25 [S]	1 mutation GyrA ± efflux
512-> 2 000 [R]	1-4 [I/R]	1 mutation GyrA + 1-2 mutation(s) ParC 1 mutation GyrA + 1 mutation GyrB + 1 mutation ParC
> 2 000 [R]	8-64 [R]	2 mutations GyrA + 1 mutation ParC
> 2 000 [R]	64-128 [R]	2 mutations GyrA + 2 mutations ParC

<sup>a</sup> Nal, acide nalidixique.

<sup>b</sup> Cip, ciprofloxacine.

<sup>c</sup> [ ], rendu au clinicien : S, sensible ; I, intermédiaire ; R, résistant.

Corrélation entre **diamètres d'inhibition** autour des disques de ciprofloxacine (5µg), d'ofloxacine (5µg) et d'acide nalidixique (30µg) et **CMI: faible**



Résistance de bas niveau aux fluoroquinolones par surexpression  
de l'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* : conséquences thérapeutiques  
et détection au laboratoire

Low-level resistance to fluoroquinolones conferred  
by efflux overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*:  
clinical significance and routine detection

D. Hocquet <sup>a,\*</sup>, I. Patry <sup>a</sup>, P. Dupont <sup>a</sup>, M. Bize <sup>a</sup>, K. Jeannot <sup>a</sup>, P. Chavanet <sup>b</sup>, P. Plésiat <sup>a</sup>

CMI ciprofloxacin  $\geq 0,25$  mg/L

Utilisation de milieu MH contenant 0,2mg/l de ciprofloxacin: sensible  
Les souches qui poussent sur cette gélose ont BNR ↪ Alerter le clinicien

« Attention, souche présentant BNR aux FQ.  
L'utilisation des FQ en monothérapie, même à forte dose  
↪ Expose à des échecs thérapeutiques ».

# Epidémiologie mondiale

*(A. Dalhoff. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2012)*

- Partout dans le monde: ↑↑° Fréquences de R aux FQ
- **Entérobactéries:**
  - Communautaires & nosocomiales
  - Taux > 50%, particulièrement en Asie
  - Entérobactéries R aux C3G ↪ Plus fréquemment R aux FQ
- ***S. aureus* (SASM < 5% / >90% SARM)**
- **Pneumocoque:** Taux R aux FQ actives sur le pneumocoque encore bas dans le monde (entre 1 et 7 %), à l'exception de Hong Kong (> 17 %)
- **Gonocoque:** <10% en Europe et Amérique du Nord → 100% en Asie

# Epidémiologie de la résistance en Tunisie: Données LART

## % de R à la ciprofloxacin

	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella*</i>
1999	7,90%	4%	32%	9%	-
2000	7,90%	7,90%	28%	9%	-
2001	8,80%	20,20%	32%	6%	15,30%
2002	8,90%	22,30%	31%	8%	5,50%
2003	14,60%	29,50%	34%	7%	5,40%
2004	14%	31,20%	26%	6,60%	4,40%
2005	14,20%	33,40%	18%	8,90%	10,30%
2006	16,90%	38,60%	19,50%	14,20%	10,30%
2007	16,50%	41,90%	16,50%	9,30%	6%
2008	15,30%	32,50%	23,80%	4,50%	11%
2009	16,50%	42,40%	22,20%	5,90%	13%
2010	17,40%	34,70%	22,10%	3%	29,20%

\* % de R à l'acide nalidixique

# Epidémiologie de la résistance en Tunisie: Données LART % de R à la ciprofloxacine

	<i>K. pneumoniae</i> R C3G	<i>P. aeruginosa</i> IMP R	SARM
1999	11,7%	74%	35%
2000	20,6%	84%	35%
2001	41,9%	73%	58%
2002	47,1 %	70%	37%
2003	63,3%	71%	43%
2004	45,6%	60,7%	33,9%
2005	57,3%	66,9%	42,6%
2006	46,7%	70,5%	39,9%
2007	74,6%	59,5%	36,3%
2008	57,4%	82,4%	30,6%
2009	69%	64,9%	33,4%
2010	65,6%	58,7%	36,6%

---

# CONCLUSION

- **R acquises aux FQ : ≠ mécanismes**
    - **R chromosomique**
      - BNR
      - Effet multiplicatif des mutations ↪ HNR
      - Concentrations prévenant les mutations +++
    - **R plasmidique :**
      - **BGN (entérobactéries +++)**
      - BNR ↪ Facilite sélection des mutants R
      - Important à évaluer en termes d'épidémiologie
-

---

# Règles pour le traitement par FQ

## ↳ Eviter l'apparition des résistances acquises

1. Dépister les bas niveaux de résistance
  2. Choisir la FQ la plus active / bactérie présumée ou isolée
  3. Choisir la FQ qui a la pharmacocinétique la plus adéquate / localisation du foyer infectieux (urines, LCR, poumon)
  4. Utiliser une posologie élevée pour que la  $[FQ]^{\circ}$  locale soit  $> CPM$
  5. Diminuer l'inoculum bactérien pour diminuer la probabilité de la présence de mutants (Taux de mutation)
    - ❑ Drainage
    - ❑ Association d'un 2<sup>ème</sup> antibiotique d'une autre famille pendant les 1<sup>ères</sup> 24-48 h
  6. Raccourcir la durée totale du traitement
-

---

MERCI

---