

PROFIL DE RESISTANCE, PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE, DE HUIT ISOLATS DU GENRE PSEUDOMONAS ISOLES DU FILET DE TRUITE ARC EN CIEL

**Oberlé Kenny¹, Bouju-Albert Agnès², Bednarek Gaele¹, Helsens Nicolas ^{1,2}, Prévost Hervé²,
Magras Catherine², Calvez Ségolène¹**

¹INRAE, Oniris, BIOEPAR, 44300, Nantes, France

²INRAE, Oniris, SECALIM, 44300, Nantes, France

6^{es} Journées de
La Recherche
Filière Piscicole

Paris les 2 et 3 juillet 2019

ETUDE DU RESITOME DU FILET DE TRUITE ARC EN CIEL ETAPE 1 : FAISABILITE METHODOLOGIQUE ?

**Nicolas Helsens^{1,2}, Ségolène Calvez², Agnès Bouju-Albert¹, Albert Rossero¹,
Hervé Prévost¹, Catherine Magras¹**

¹SECALIM, INRA, Oniris, Université Bretagne Loire, 44307, Nantes, France

²BIOEPAR, INRA, Oniris, 44307, Nantes, France

Thèse de Nicolas Helsens
(2017-2020)

Caractérisation des profils de résistance aux antibiotiques des communautés bactériennes du filet de truite arc-en-ciel



Analyses chimiques

- Dosage des **résidus** d'antibiotiques
→ LC-MS/MS

Analyses phénotypiques de la résistance aux antibiotiques

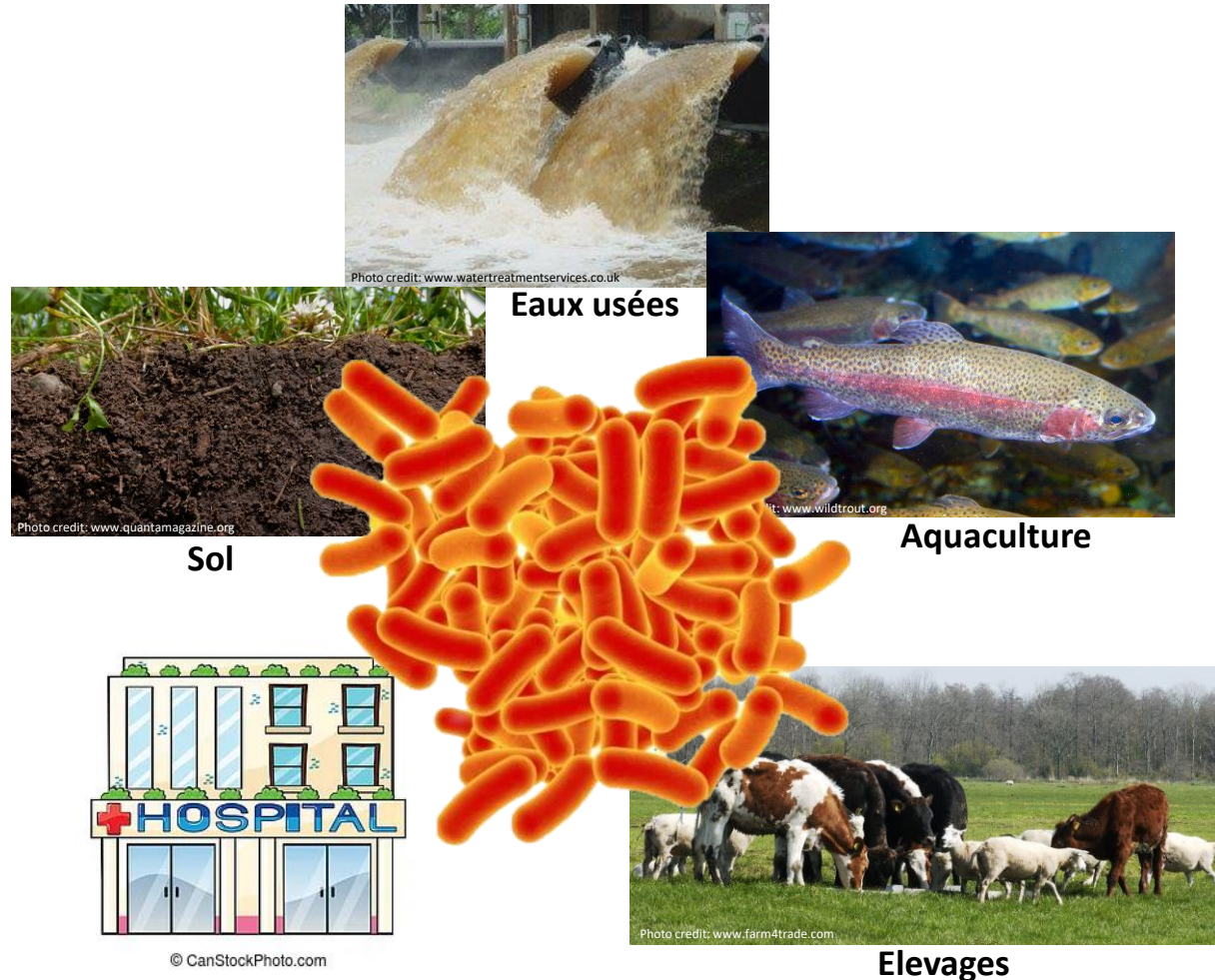
- **Trois genres d'intérêt**
- Collection des souches
→ Réalisation de CMI

Listeria monocytogenes
Aeromonas spp.
Pseudomonas spp.

Analyses génotypiques

- Recherche de **gènes de résistance** aux antibiotiques
→ PCR haut-débit
- Caractérisation des **communautés bactériennes**
→ Séquençage de l'ADN 16S

Pseudomonas: un genre ubiquitaire



❑ Plus de 200 espèces distribuées dans 20 différents phylogroupes (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, etc.)

❑ Plusieurs espèces pathogènes *Pseudomonas* chez le poisson

- *P. aeruginosa* → septicémie
[Roberts, 2012 Fish pathology](#)
- *P. truttae* → identifiée chez rainbow trout
[Oh et al., 2019 Microorganisms](#)
- *P. anguilliseptica* → eel et Atlantic Salmo
[Wiklund and Bylund, 1990 Dis. Aquat. Organ.](#)
- *P. fluorescens* → peu isolée chez rainbow trout mais une dose infectieuse (40%) a été établie (10^8 CFU.mL⁻¹)
[Dinçtürk and Tanrikul, 2021 Aquaculture Research](#)

➡ *Pathogène et non-pathogène Pseudomonas mais peut porter des gènes de résistance*

La résistance aux antibiotiques : une menace mondiale

“Les antibiotiques deviennent de plus en plus inefficaces à mesure que la résistance aux médicaments se répand dans le monde, entraînant des infections plus difficiles à traiter et des décès” WHO, Octobre 2020

Résistance multiple aux antibiotiques décrites au sein des populations de *Pseudomonas*

316 isolats



Photo credit: www.watertreatmentse.com
Photo credit: www.farm4trade.com

Résistance:
Cefotaxime
Amoxicilline
Amoxicilline / acide Clavulanic
Fosfomycine

Camiade et al., 2020 [FEMS Microbiol.](#)

40 isolats



© CanStockPhoto.com

Résistance:
Meropenem
Imipenem
Ceftazidime

Zhang et al., 2020 [J. Antimicrob. Chemoth.](#)

479 isolats



Photo credit: www.booking.com

Résistance:
Tetracycline
Aztreonam
Meropenem
Ceftazidime

Maravic et al., 2012
[World J. Microbiol. Biotechnol.](#)

81 isolats



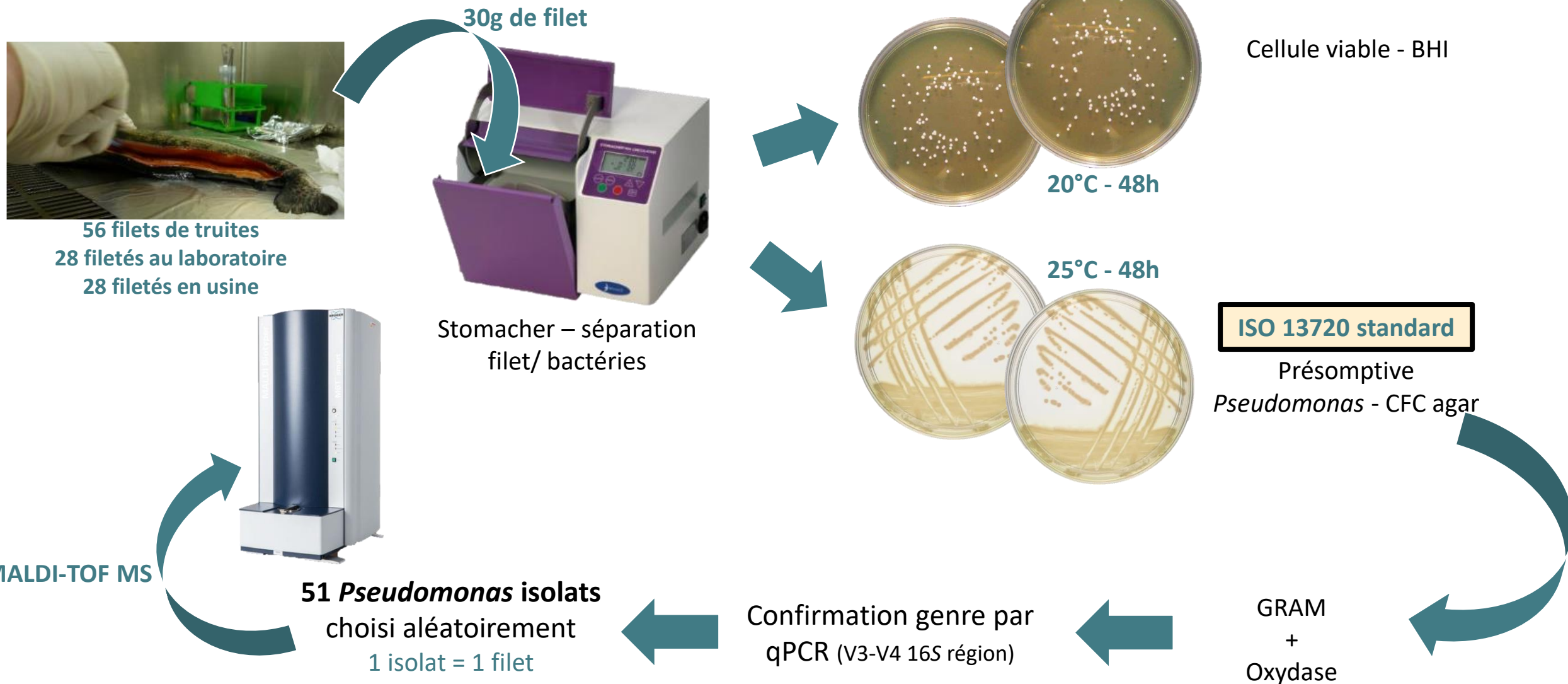
Photo credit: www.canadiangeographic.ca

Résistance:
Sulfisoxazole / Trimethoprim
Florfenicol
Amoxicilline

Dominguez et al., 2019
[Frontiers in Microbiol.](#)

➡ De nombreuses résistances en lien avec les antibiotiques testés mais aussi aux zones d'échantillonnage ?

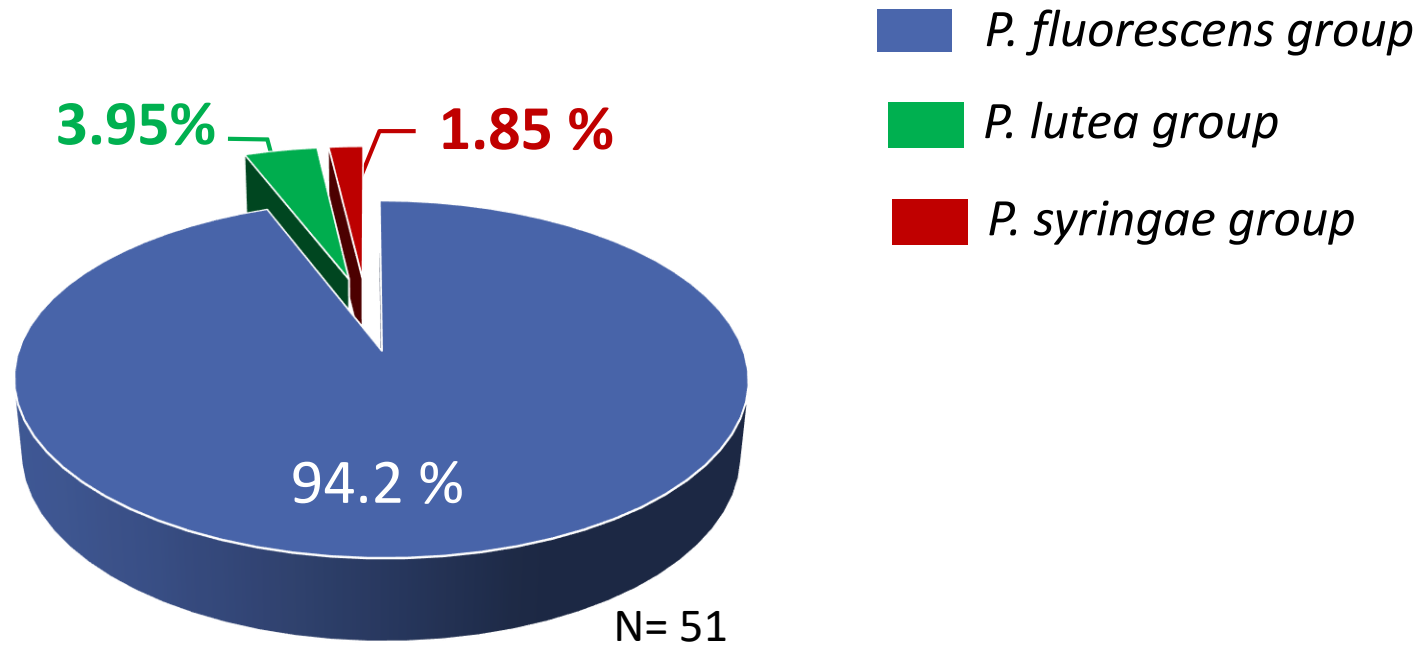
Isolation et identification bactérienne



Distribution *Pseudomonas* phylogroupes – MALDI-ToF

ID isolate	Identification by MALDI-ToF	Score	Phylogenetic group*	Phylogenetic sub-group*
A01RPs1-1a	<i>Pseudomonas graminis</i>	1,79	<i>P. lutea</i>	-
A03RPs3-8	<i>Pseudomonas gessardii</i>	1,99	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. gessardii</i>
A04RPs3-11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,12	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
A05RPs3-14	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	2,09	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
A06RPs3-16	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1,83	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mandelii</i>
A08RPs3-22	<i>Pseudomonas mandelii</i>	2,13	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mandelii</i>
A09RPs1-23	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	2,16	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. gessardii</i>
A10RPs2-26	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1,86	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
A11RPs2-28	<i>Pseudomonas mandelii</i>	2,29	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mandelii</i>
A12RPs2-30	<i>Pseudomonas gessardii</i>	1,94	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. gessardii</i>
A13RPs2-33	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	2,02	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
A14RPs3-37	<i>Pseudomonas gessardii</i>	1,98	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. gessardii</i>
A16FPs2-41	<i>Pseudomonas gessardii</i>	1,93	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. gessardii</i>
A17FPs3-45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,17	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
A18FPs2-47	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,15	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
A19FPs2-50	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1,96	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. koreensis</i>

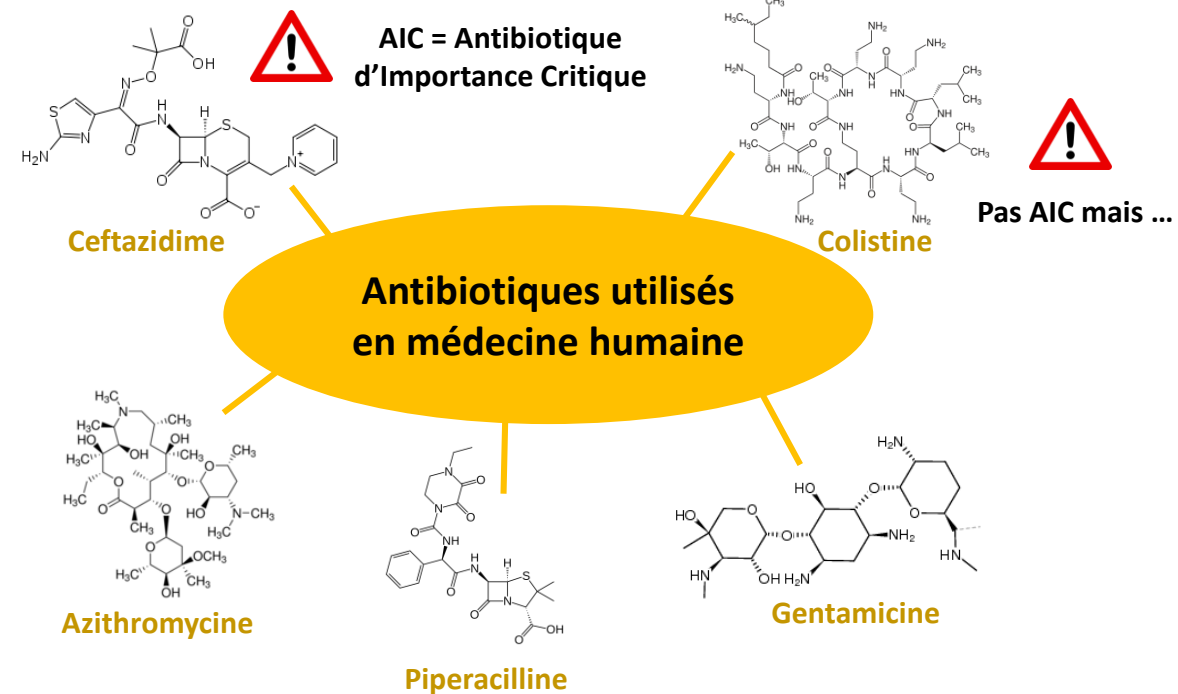
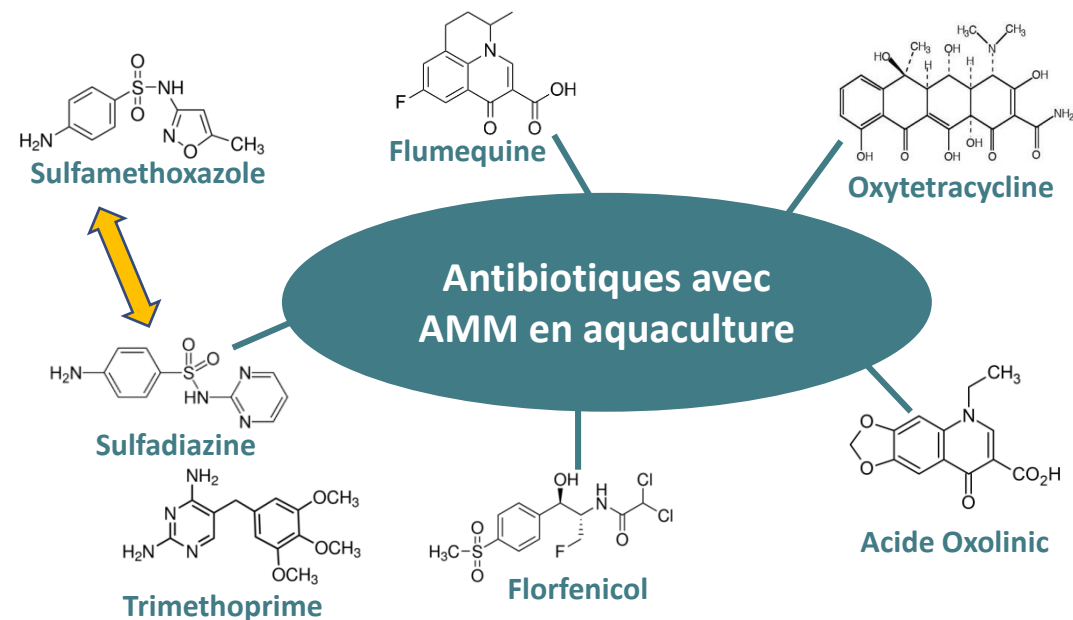
Distribution *Pseudomonas* phylogroupes



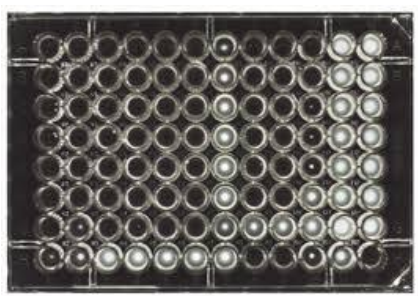
⇒ *P. fluorescens* phylogroupe majoritaire

Détermination des profils de résistance aux antibiotiques

Choix des antibiotiques



Concentration Minimal Inhibitrice (CMI)



- Dilution en microplaques

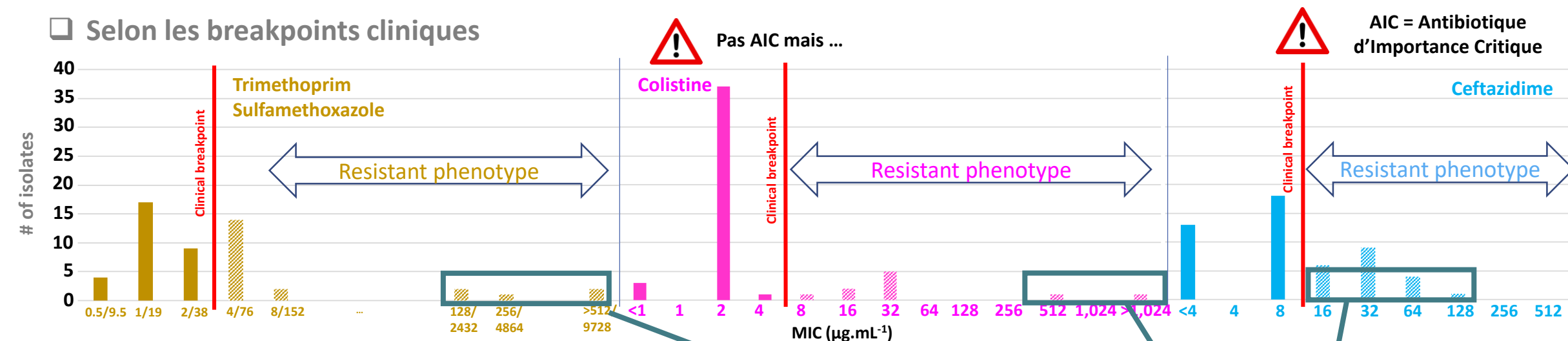


*M07-A10 (2015) /
M100S-26th (2016) /
VET03-VET04-S2*

- Gamme : 0.0625 – 1,024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
- Détermination des :
 - profils sensible/résistant selon les breakpoints cliniques
 - profils wild-type / non wild-type selon les valeurs ECOFF

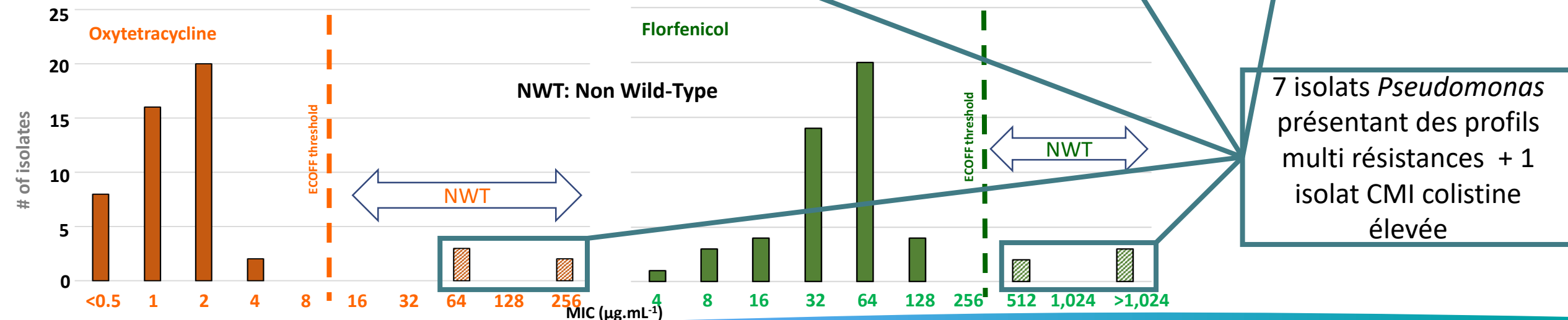
Détermination des profils de résistance aux antibiotiques

Selon les breakpoints cliniques



Selon les calculs d'ECOFF using ECOFFinder

Turnidge et al., 2006 *Clin. Microbiol. and Infect.*



Détermination des profils de résistance aux antibiotiques

Phénotypes de résistance: CMIs

1 isolate

- Colistin [16]
- Ceftazidime [16]

2 isolates

- Oxytetracycline [256]*
- Florfenicol [>1024]
- Trimethoprim/Sulfamethoxazole [512/9728]
- Ceftazidime [16;32]

*[µg.ml⁻¹]

1 isolate

- Colistin [>1024]
- TMP/SMX [4/76]

3 isolates

- Oxytetracycline [64]
- Florfenicol [512;>1024]
- Trimethoprim/Sulfamethoxazole [128/2432;258/4864]

1 isolate

- Colistin [512]

Gaelle Bednarek – Master 2

7 isolats *Pseudomonas* présentant des profils multi résistances + 1 isolat CMI colistine élevée

- Séquençage du génome complet et assemblage
 - Short-reads séquencé par Illumina
 - Long-reads séquencé par ONT
- Identifier les genes de résistance aux antibiotiques
 - Comparer phenotype et genotype
- Identifier la presence d'éléments génétiques mobiles (MGEs)
 - Séquences d'insertion
 - Séquences de prophages
 - Transposons
 - Intégrons
 - Plasmides

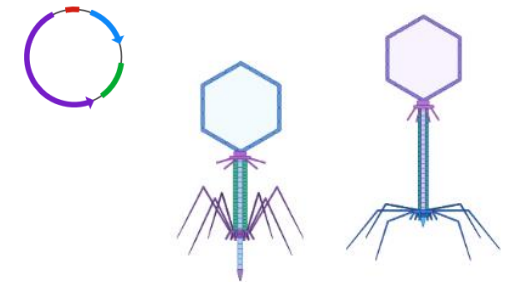


Sequencer (Illumina MiSeq)



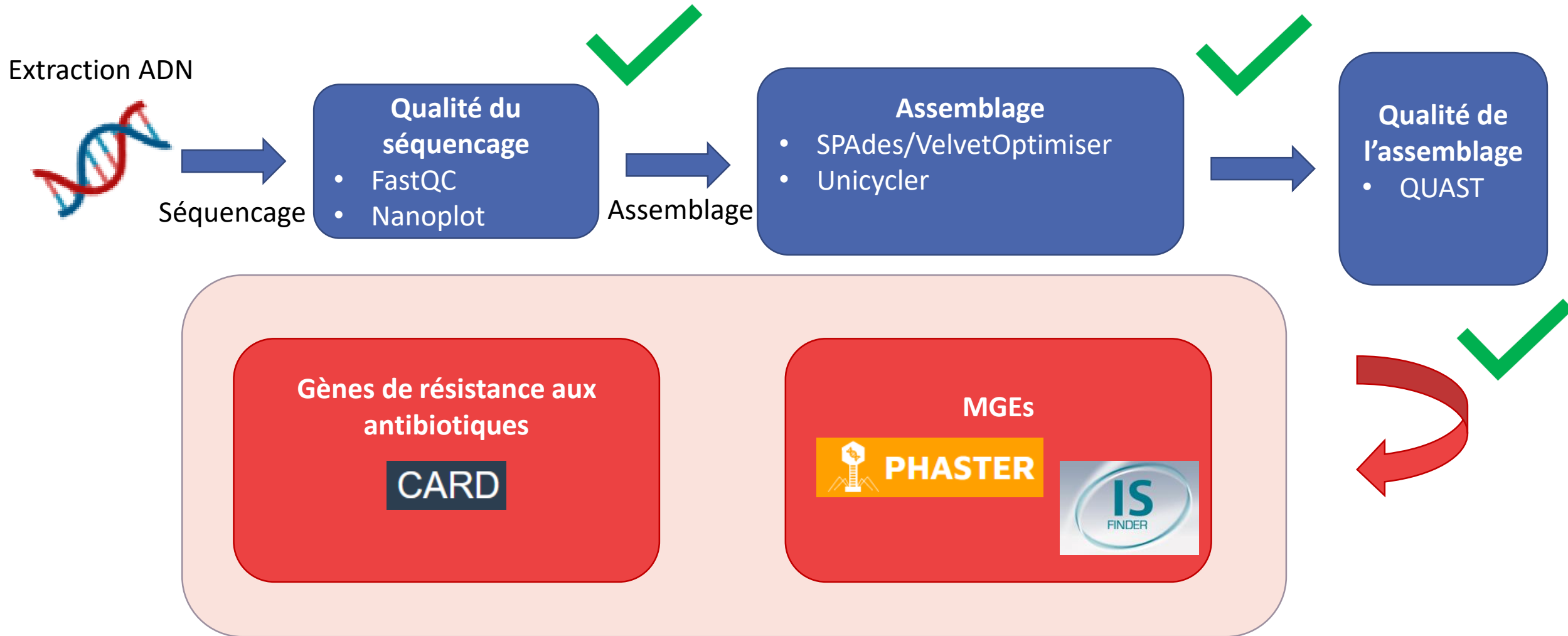
Nanopore Sequencer (GridION)

Created in BioRender.com bio



Created in BioRender.com bio

Analyse : workflow



CARD

Gènes de résistance antibiotiques

2 isolats

- Oxytetracycline *tet(Y)*
- Florfenicol *floR*
- Trimethoprim/Sulfamethoxazole *sul2*
- Ceftazidime ?

1 isolat

- Colistine ?
- Ceftazidime ?

1 isolat

- Colistine ?
- TMP/SMX *sul2*

1 isolat

- Colistine ?

3 isolats

- Oxytetracycline *tet(Y)*
- Florfenicol *floR*
- Trimethoprim/Sulfamethoxazole *sul2*

Phénotype peut il être expliqué par le génotype ?

Gènes de résistance antibiotiques

Phénotype peut il être expliqué par le génotype ?



Quid résistance **Colistine** et **Ceftazidime** ?

- Résistance à la colistine probablement médiée par une mutation au niveau du LPS (Sherry and Howden, 2018)
- Résistance à la ceftazidime médié par une pompe à efflux et le gène AmpC codant pour une β -lactamases (Al-Agamy et al., 2013)



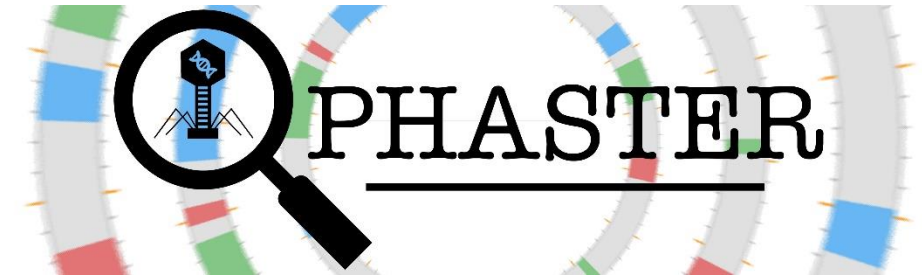
Autres genes identifiés ?

- AbaQ (Efflux pump that mediates resistance to quinolone-type antibiotics); APH(6)-Id (streptomycin 3''-kinase activity); adeF (AdeF is the membrane fusion protein of the multidrug efflux complex AdeFGH); soxR (global regulator contributing to multidrug *resistance*);

Présence d'éléments génétiques mobiles (MGEs)

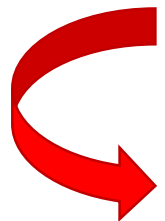
➤ Présence de séquence prophages?

- Différentes sequences identifiées (complete ou non)



➤ Présence d'éléments génétiques mobiles?

- Séquence d'insertion, IS – famille IS66, IS1182, autres
- Famille Tn3 transposon



Séquences portant potentiellement des gènes de résistance
Éléments favorisant le transfert de séquences, de gènes

Principaux résultats

- ❑ La plupart des isolats de *Pseudomonas* appartenaient au phylogroupe *P. fluorescens*
- ❑ Certains isolats ont montré des phénotypes de résistance à des antibiotiques de haute importance pour la médecine humaine (colistine) ou critiques pour la médecine vétérinaire (céphalosporine)
- ❑ 5 / 51 isolats sont multi résistant (R a au moins 3 classes d'antibiotiques)
- ❑ Phénotype/génotype
- ❑ Différents gènes et éléments génétiques mobiles retrouvés

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2003, p. 4246–4251
0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.9.4246-4251.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Presence of *Pseudomonas putida* Strains Harboring Plasmids Bearing the Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP} in a Hospital in Japan
Sachie Yomoda,¹ Toyoji Okubo,² Ayako Takahashi,¹ Masami Murakami,¹ and Shizuko Iyobe^{2*}

frontiers
in Microbiology

Vol. 41, No. 9

Occurrence of Transferable Integrations and *sul* and *df* Genes Among Sulfonamide-and/or Trimethoprim-Resistant Bacteria Isolated From Chilean Salmonid Farms

Mariana Domínguez¹, Claudio D. Miranda^{2,3*}, Oliver Fuentes^{1,4}, Mery de la Fuente^{1,5}, Félix A. Godoy⁶, Helia Bello-Toledo¹ and Gerardo González-Rocha¹

ORIGINAL RESEARCH
published: 12 April 2019
doi: 10.3389/fmicb.2019.00748

nature
COMMUNICATIONS

A megaplasmid family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*

Adrian Cazares¹, Matthew P. Moore¹, James P.J. Hall², Laura L. Wright¹, Macauley Grimes¹, Jean-Guillaume Emond-Rhéault³, Pisut Pongchaikul⁴, Pitak Santanirand⁴, Roger C. Levesque³, Joanne L. Fothergill¹ & Craig Winstanley¹

Les sous-populations de *Pseudomonas* résistantes aux antibiotiques peuvent transférer des traits résistants à des bactéries pathogènes pour les poissons (comme *A. salmonicida*) ou même pour l'homme (comme *P. aeruginosa*) ?

Merci pour votre attention!

Contact: kenny.oberle@oniris-nantes.fr
segolene.calvez@oniris-nantes.fr



BIOEPAR



Qualité

- Depth cover = **50X**
- Short reads assembly

Genome size:

- *Pseudomonas* genome length **6Mbp**

Taille des génomes environ 6Mbp et 6,5Mbp = Presque le gènome entire !

