

Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer

Emilie Dauvergne

▶ **To cite this version:**

Emilie Dauvergne. Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer. Microbiologie et Parasitologie. 2018. hal-02010604

HAL Id: hal-02010604
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02010604

Submitted on 7 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE LORRAINE (Faculté des Sciences et Techniques-Université Henri Poincaré)
Master 2 BioMANE (Biotechnologies Microbiologie Aliment Nutrition et Environnement)
Mention Microbiologie Environnementale et sanitaire

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer

Par Emilie Dauvergne

Maîtres de Stage : Anne Brisabois, Chef du département Produits de la pêche et de l'aquaculture ; Patrick Fach, Responsable de la plateforme IdentyPath (IDPA)
Encadrante : Sabine Delannoy, chargée de projet microbiologie (IDPA)
Tuteurs pédagogiques : Pierre Leblond, Frédéric Jorand

Lieu et dates du stage : Agence nationale de sécurité sanitaire en charge de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses) ; laboratoire de Sécurité des Aliments ; Plateforme IdentyPath (IDPA).

Du 1 Février au 31 Juillet 2018**.** 14 rue Pierre et Marie Curie ; 94701 Maisons-Alfort Cedex

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Laurent Laloux, directeur du Laboratoire de sécurité des aliments pour m'avoir accueilli dans son établissement.

Je tiens également à remercier Anne Brisabois et Patrick Fach, mes maîtres de stage qui m'ont apporté leurs avis et leur soutien durant ce stage et qui se sont toujours montrés disponibles et à l'écoute de mes interrogations.

Je remercie particulièrement Sabine Delannoy pour tous ses conseils, ses remarques pertinentes, sa patience, sa transmission d'expérience technique sur les tests in silico ainsi que les manipulations effectuées en laboratoire et qui m'a encadré sur la durée du stage sur le site de Maisons-Alfort; Sophie Granier pour toutes ses expériences, anecdotes passionnantes, amusantes, son savoir sur l'antibiorésistance et son expertise qui a été nécessaire sur le projet AMR Chip; Hattie Webb pour sa patience et ses conseils sur les manipulations de laboratoire ainsi que son aide et son savoir quant aux gènes de résistance aux antibiotiques.

Je tiens à remercier Graziella Bourdin, Arnaud Briet, et Sarah Leclerq de l'unité B3PA de Boulogne-Sur-Mer pour leurs avis et leur aide au projet AMR Chip au travers de réunions et de l'apport d'informations recueillies sur la collection des souches isolées des produits de la mer.

Je remercie tous les laboratoires qui ont acceptés de collaborer sur ce projet par l'envoi de contrôles positifs nécessaires pour la réalisation de la puce.

Je tiens également à remercier Nathalie Dallet et Nathalie Bongoua pour l'aspect administratif et pour leur accueil au sein de l'ANSES durant ce stage.

Je remercie enfin tous mes collègues de l'open-space pour leur humour, leur bonne humeur, leur esprit d'équipe et la motivation toujours au rendez-vous.

Sommaire

INTRODUCTION 1
1. Présentation de l'Anses et de ses laboratoires 1
1.1 Présentation du laboratoire de sécurité des aliments 1
1.1.1 Présentation de la plateforme IdentyPath (IDPA) 1
2. Contexte de l'étude 3
2.1 L'Antibiorésistance 3
2.1.1 Antibiotiques et mécanismes d'action 3
2.1.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques 4
2.1.3 Diffusion de la résistance 6
2.2 L'Antibiorésistance bactérienne : un enjeu majeur en santé publique 7
2.2.1 Conséquences de l'antibiorésistance bactérienne 7
2.2.2 Classes d'antibiotiques d'importance critiques en santé humaine 8
2.2.3 Les systèmes de surveillance 8
3. Les produits de la mer, source potentielle de bactéries résistantes aux antibiotiques 9
3.1 Surveillance et produits de la mer 9
3.2 Milieu aquatique et transferts 9
3.3 Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer 10
MATERIEL ET METHODE 11
1. Collections de souches étudiées 11
1.1 Contrôles positifs 11
1.2 Extractions des contrôles positifs 12
1.3. Collection des souches « terrains » isolées des produits de la mer de Boulogne-Sur-Mer (Collection B3PA) 12
3. PCR temps réel 13
3.1 Principe Technique de PCR temps réel 13
3.2 Principe de la PCR temps-réel très haut débit Fluidigm 14
3.3 Protocole décrit 14
4. Choix des cibles 15
4.1 Gènes de résistance aux antibiotiques 15
4.2 Marqueurs d'éléments génétiques mobiles 16
4.3 Dessins des amorces et tests *in silico* 17
RESULTATS 19
1. Dessin des marqueurs de gènes d'antibiorésistance 19
2. Validation de la Puce Fluidigm 22
3. Recherche de marqueurs de résistance dans la collection de souches B3PA 26
DISCUSSION 27

1. Spécificité de l'outil de détection développé 27
2. Spécificité diagnostique des couples d'amorces lors de la validation de la puce Fluidigm 27
3. Marqueurs non validés 29
4. Marqueurs d'Antibiorésistance détectés dans la collection B3PA 30
5. Limites de l'outil de détection utilisé 32
CONCLUSION 33
BIBLIOGRAPHIE 1
WEBOGRAPHIE 6
ANNEXE 1 : Organigrammes de l'ANSES et du LSAl 7
ANNEXE 2 : Collection B3PA 9

Liste des figures

Figure 1: Outils de la plateforme IdentyPath (extrait de Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n°68/Spécial Vigilance sur chaîne alimentaire) 2
Figure 2: Cibles d'antibiotiques à différents niveaux de la cellule (extrait de Biology of Micro-organisms, 11ème édition, 2006) 3
Figure 3: Principaux mécanismes de résistance bactériens aux antibiotiques (extrait de la Recherche, n°314, Novembre 1998) 5
Figure 4: Carte du plasmide pBlueScriptIISK(+) avec insert *mcr-7* 11
Figure 5: Collection B3PA (Annexe2) 13
Figure 6: Principe de l'intercalant SybrGreen vs EvaGreen (Extrait de Sun et al, 2016) 14
Figure 7: Plan de chargement de la puce 96x96. 15
Figure 8: Paramètres de la PCR temps réel utilisés 15
Figure 9: Schéma du protocole utilisé pour les tests *in silico*. 18
Figure 10: Détection du gène bla_{TEM} (PCR temps réel, EvaGreen) 23
Figure 11: Détection du gène *qnrB* (PCR temps réel, EvaGreen) 23
Figure 12: Résultats bruts d'amplification avant l'application des filtres (Ct et Tm) 27
Figure 13 : Technique de CIM (Carbapenem inactivation method) (extrait de van der Zwaluw K *et al*, 2015) 28
Figure 14: Principe du séquençage de nouvelle génération (NGS) Illumina (extrait de https://emea.illumina.com) 29
Figure 15: Résultat du blast de la séquence FosA4 chez *Morganella*. 30
Figure 16: Expansion du gène bla_{NDM} à travers le monde (Extrait de Normann et Poirel, 2014) 31

Liste des tableaux

Tableau 1: Antibiorésistance bactérienne associée aux classes d'intégrons. (Extrait de Génétique bactérienne IV : Les intégrons - Faculté de Médecine de Limoges. 2002 7
Tableau 2: Gènes de résistance aux antibiotiques ciblés. 16
Tableau 3: Gènes de résistance aux antibiotiques ciblés. 21
Tableau 4 : Gènes signature d'éléments génétiques mobiles ciblés. 22
Tableau 5: Liste des couples d'amorces validés à 100% au niveau de la sensibilité et spécificité diagnostiques 24
Tableau 6: Liste des couples d'amorces pour lesquels la sensibilité diagnostique est de 100% mais dont la spécificité diagnostique n'a pas pu être déterminée. 24
Tableau 7: Liste des couples d'amorces validés pour la sensibilité diagnostique mais dont la spécificité est moins bonne que prévue. 25
Tableau 8: Liste des couples d'amorces non validés (en raison de la présence de faux positifs) 25
Tableau 9: Liste des couples d'amorces non validés. 25
Tableau 10: Liste des couples d'amorces en attente de validation 25
Tableau 11: Résultats de détection des gènes cibles dans la collection B3PA 26

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARG-ANNOT : base de données, annotation de gènes de résistance aux antibiotiques

ARNr : Acide ribonucléique ribosomale

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ATBR : Antibiorésistance

BacMet : Base de données de gènes de résistance aux biocides antibactériens et métaux

BLSE : bêta-lactamases à spectre élargi

B3PA : L'unité Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture

CARD : Base de données, résistance aux antibiotiques

Ct : en anglais « Cycle Treshold », en français « valeur de cycle correspondant au signal seuil »

DGAl : Direction générale de l'Alimentation

ECDC : de l'anglais « European Centre for Disease Prevention and Control », en français « Centre Européen pour la Prévention et le Contrôle des Maladies »

EFSA : de l'anglais « European Food Safety Authority», en français «Autorité Européenne de Sécurité des Aliments »

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

IDPA : Plateforme IdentyPath

IFC : de l'anglais «Integrated Fluidic Circuit», en français «Circuit Fluidique Intégré »

LNR : Laboratoire National de Référence

LPS : lipopolysaccharides

LSAl : Laboratoire de sécurité des Aliments

LR-UE : Laboratoire de référence de l'Union européenne (en anglais EURL)

MATBR : Mission Antibiorésistance

MDR : de l'anglais « multidrug resistance », en français Multirésistance, qualifie une bactérie qui a acquis la résistance à au moins trois classes d'antibiotiques.

MLS : macrolide, lincosamides, streptogramins

NCBI : Centre national pour les informations en Biotechnologie

OMS : Organisation mondiale de la santé (WHO en anglais)

PDR : Pandrug resistance

PLP : Proteins de liaison aux pénicillines

qPCR : Appelée également PCR temps réel, « quantitative Polymerase chaine reaction » méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN.

Resapath : Réseau d'épiémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales

ResFinder : Base de données, Identification de gènes de résistance aux antibiotiques, résistance acquise.

RMTase : ARNr methyltransferase

RTF : en anglais «Resistance transfer factor», en français « Facteur de Transfert de Résistance »

Tm : Température de fusion

XDR : de l'anglais « extensive drug resistance », en français « Résistance extrême aux antibiotiques », qualificatif utilisé pour signaler une résistance à la quasi-totalité des médicaments autorisés pour traiter l'infection.

INTRODUCTION

1. Présentation de l'Anses et de ses laboratoires

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail est un établissement public assurant des missions de veille, d'expertise, de recherche et de référence. L'Anses s'occupe de plusieurs domaines tels que santé humaine, santé et bien-être animal et santé végétale. Cette structure est composée de deux grandes activités : concernant pour l'une, l'évaluation des risques et l'autre, les laboratoires (annexe 1). L'Anses possède un budget pour son fonctionnement annuel, 132 millions d'euros et investit 6 millions d'euros en soutien à la recherche dans le cadre de l'appel à projet de recherche qu'elle organise. L'Agence a émis 13800 avis depuis sa création en 1999. L'Anses possède 10 laboratoires de recherches en France qui détiennent 65 mandats de référence, nationaux, européens, et internationaux (Anses.fr).

1.1 Présentation du laboratoire de sécurité des aliments

Parmi les 10 laboratoires, le laboratoire de sécurité des aliments (LSAl), intervient sur les dangers biologiques et chimiques qui peuvent affecter la sécurité sanitaire et la qualité des aliments. Le LSAl comporte 3 départements : le département des contaminants microbiologiques des aliments, le département des produits de la pêche et de l'aquaculture et enfin le département des contaminants chimiques des aliments. Les missions du LSAl consistent en l'identification, la quantification et la caractérisation des dangers apportés par les aliments (virulence, toxicité, bioaccessibilité). Au sein du LSAl, on retrouve notamment la plateforme IdentyPath, l'unité B3PA (Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture) et la mission AntibioRésistance (MATBR) qui ont travaillé en étroite interaction dans le cadre de ce projet de master.

1.1.1 Présentation de la plateforme IdentyPath (IDPA)

La plateforme IDPA, au sein de laquelle j'ai effectué ce stage de Master, a été créée en 2010. Il s'agit d'une plateforme nationale d'identification et de typage des pathogènes basée sur la mutualisation et le développement des approches de qPCR hauts et moyens débits afin de répondre aux enjeux de santé publique. Cette plateforme permet le développement d'outils de diagnostic rapides, sensibles avec un large spectre. Elle participe ainsi aux missions de référence, d'expertise et de surveillance des laboratoires de l'Agence. Cette plateforme apporte un soutien aux laboratoires de recherche de l'Anses par le développement d'outils

méthodologiques adaptés aux besoins des projets de recherches. La plateforme contribue à l'amélioration de dispositifs de surveillance, de veille, d'alerte et d'identification des dangers bactériens et participe à la création de nouveaux réseaux (échanges, partenariats). Les outils présents sur la plateforme permettent de réaliser des tests PCR en temps réel avec des niveaux variables de débit allant de 36 à 18 432 réactions de qPCR en un seul essai. Le BioMark™ (Fluidigm) et le LightCycler® 1536 (Roche) sont des appareils de très haut et haut débit disponibles sur la plateforme. La plateforme possède aussi un séquenceur de paillasse haut débit MiSeq® (Illumina) et un GeneDisc Cycler ® (Pall) (Figure 1).

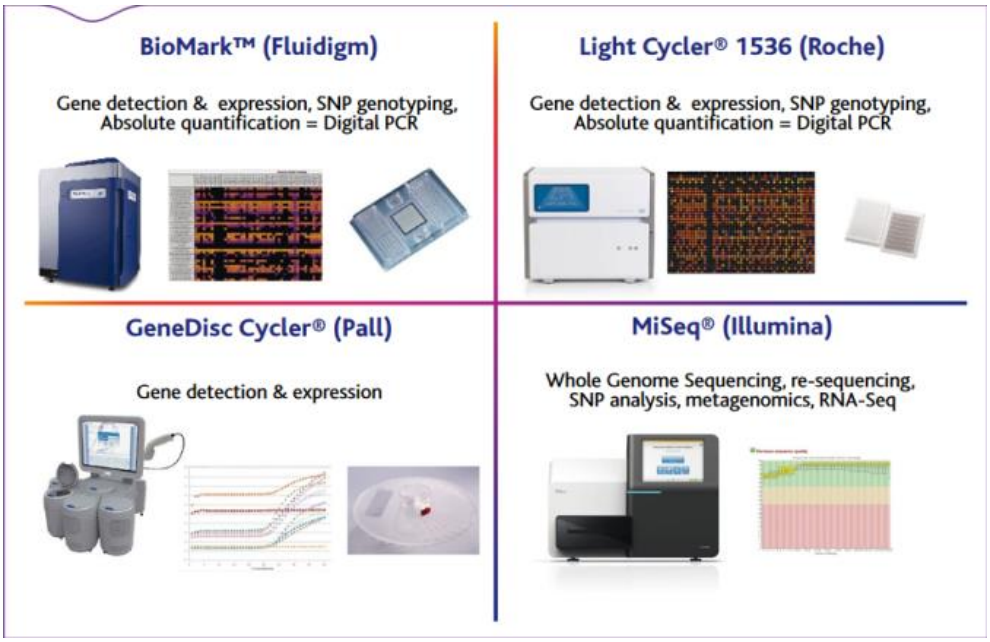


Figure 1: Outils de la plateforme IdentyPath (extrait de Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n°68/Spécial Vigilance sur chaîne alimentaire)

2. Contexte de l'étude

2.1 L'Antibiorésistance

2.1.1 Antibiotiques et mécanismes d'action

Un antibiotique est une substance qui peut être initialement présente dans la nature ou une molécule synthétique. L'antibiotique peut avoir un effet bactériostatique ou bactéricide et agit à différents niveaux de la cellule bactérienne avec des mécanismes d'action différents (Figure 2).

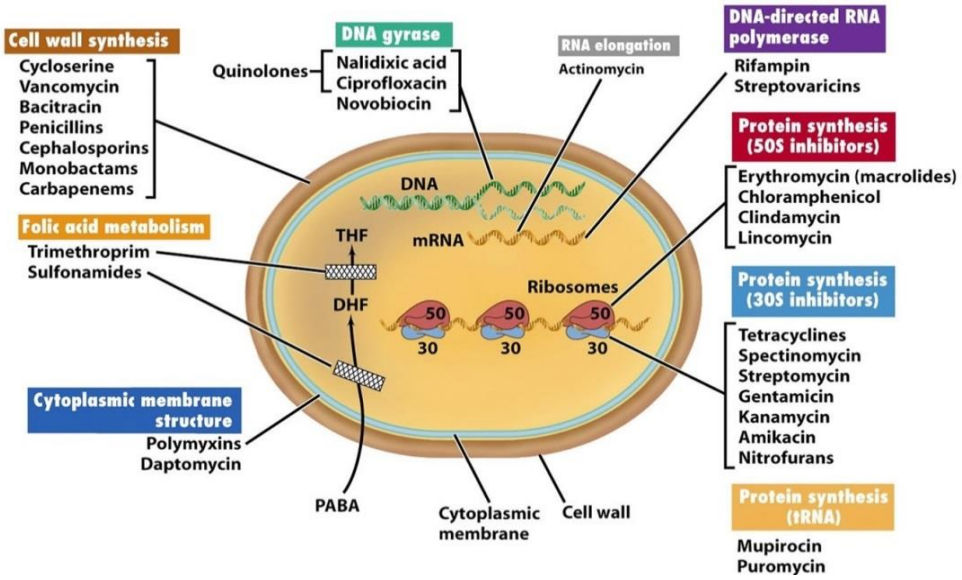


Figure 2: Cibles d'antibiotiques à différents niveaux de la cellule (extrait de Biology of Micro-organisms, 11ème édition, 2006)

Il existe différentes familles d'antibiotiques. Les β-lactamines (pénicillines, carbapénèmes, monobactames, céphalosporines), les acides phosphoniques, les glycopeptides, les lipopeptides et les polymyxines agissent comme inhibiteurs de la synthèse des enveloppes bactériennes. Les aminosides, macrolides et apparentés, les phénicolés, les cyclines, les acides fusidiques et les oxazolidinones inhibent la synthèse des protéines. Les quinolones, mupirocines et l'ansamycine agissent comme inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques. Les sulfamides agissent comme inhibiteurs de la synthèse d'acide folique. Dans cette étude, il a été choisi d'étudier la présence de gènes de résistance aux classes d'antibiotiques suivantes :

-Les β-lactamines ont une action bactéricide et représentent 60% des antibiotiques utilisés en médecine humaine. Elles possèdent leur site actif à l'intérieur de leur noyau (noyau β-lactamine caractérisant cette classe d'antibiotique) (Saini et Bansal, 2012). La fixation des

β-lactamines aux protéines de liaison (PLP) permet l'inhibition de l'activité des transpeptidases et ainsi arrête la synthèse du peptidoglycane (constitutif de la paroi bactérienne). Les β-lactamines comprennent plusieurs groupes : pénicillines (à spectre étroit, dégradées par les pénicillinases, à spectre moyen, à spectre large, à spectre étendu), céphalosporines (première à cinquième génération), monobactames, carbapénèmes, et inhibiteurs de β-lactamases (Faure, 2010 ; Papp-Wallace *et al*, 2011).

-Les acides phosphoniques ont un effet bactéricide en agissant sur la pyruvyl transférase inhibant ainsi la synthèse du peptidoglycane.

-Les polymyxines comprennent notamment la colistine. Cet antibiotique exerce son action létale en interagissant avec la membrane de la bactérie (au niveau de ses LPS) en augmentant la perméabilité membranaire de la bactérie.

-Les aminosides, comprennent de nombreuses molécules : gentamicine, amikacine, netilmicine, tobramycine, isépamicine, néomycine, streptomycine et spectinomycine. Cette famille exerce son action létale en se liant à la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries générant une accumulation d'erreurs de transcription au sein des protéines de la bactérie (Graneau-Tsodikova et Labby, 2016 ; Dax, 2012).

-Les macrolides sont des antibiotiques bactériostatiques. Par leur chaîne de 14 ou 16 carbones, ils se fixent sur les sous-unités 50S des ribosomes et empêchent la synthèse de la liaison peptidique. Il existe plusieurs types de macrolides avec 14, 15 ou 16 atomes dans leur macrocycle classés par génération (les kétolides (macrolides de dernière génération), les macrolides vrais, les lincosamides, les ansamycines et les synergistines).

-Les quinolones et fluoroquinolones, dérivées de l'acide nalidixique, ont pour mécanisme l'inhibition de la topoisomérase II (effet clastogène) et une fixation irréversible sur les extrémités des brins d'ADN durant la phase S de la mitose.

2.1.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques résulte d'une co-évolution entre organismes sécrétant des antibiotiques et ceux s'y adaptant. Ces mécanismes ont une origine ancestrale (Drancourt *et al*, 2016). Les résistances bactériennes aux antibiotiques résultent du mode d'action de l'antibiotique. Les grands types de mécanismes de résistance peuvent être classés en 4 catégories selon leurs modes d'action : le brouillage, le blindage, le camouflage et l'esquive (Figure 3).

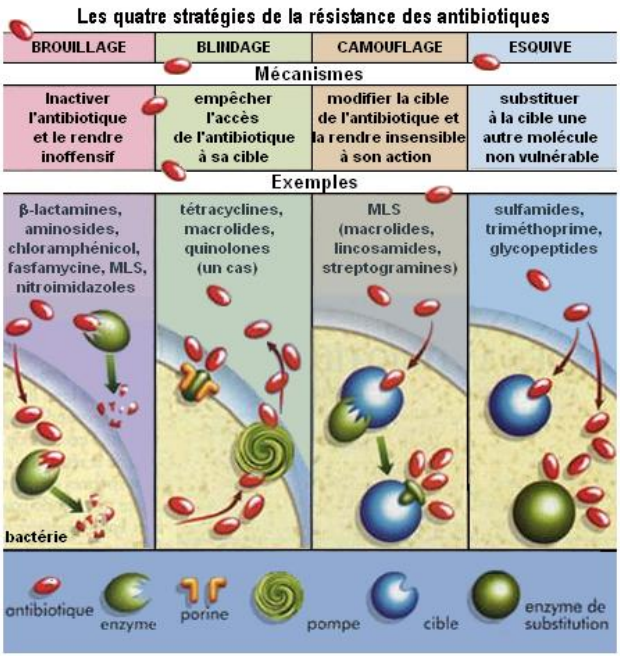


Figure 3: Principaux mécanismes de résistance bactériens aux antibiotiques (extrait de la Recherche, n°314, Novembre 1998)

Le brouillage implique l'inactivation de l'antibiotique ; c'est le cas pour les β-lactamines inactivées par les β-lactamases, pour les mécanismes de résistance aux aminosides par les ARNr méthyltransférase (RMTases) (Garneau et Labby, 2016) et pour les phénicolés. Cette inactivation s'effectue par le biais d'une enzyme qui modifie ou qui clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive.

Le blindage implique l'inaccessibilité de l'antibiotique à sa cible tel que pour les tétracyclines, macrolides et quinolones par la réduction de la perméabilité membranaire ou encore par les pompes à efflux. Pour les bactéries résistantes grâce à un mécanisme impliquant la perméabilité membranaire, celles-ci peuvent réduire leur nombre de porines ou rendre les porines plus sélectives (Blair *et al*, 2015). Pour les bactéries résistantes impliquant les pompes à efflux, les bactéries surexpriment les systèmes de pompes à efflux qui relarguent les composés toxiques hors de la cellule. C'est l'un des principaux mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales.

Le camouflage implique la modification de la cible de l'antibiotique afin de la rendre insensible à son action tel que pour les macrolides, lincosamides, streptogramines,… Cette modification peut être située au niveau du site de fixation (mécanismes de résistance à la streptomycine). La modification peut aussi être une modification de groupement chimique (méthylase conférant une résistance aux macrolides en modifiant l'ARNr au niveau du site de liaison de l'antibiotique). La surexpression de la macromolécule ciblée, permet à la bactérie

de maintenir suffisamment d'activité biologique pour se développer, malgré la présence de l'antibiotique. Enfin la modification peut résulter d'une mutation acquise. C'est le cas de la résistance aux polymyxines (Colistine) qui peut être acquise par mutation des gènes (*pmrAB* et *phoPQ*) impliqués dans la modification du LPS (site de fixation des polymyxines).

L'esquive implique la substitution à la cible d'une autre molécule non vulnérable par exemple pour les antibiotiques de la famille des sulfamides, triméthoprimes, glycopeptides.

2.1.3 Diffusion de la résistance

La résistance naturelle aux antibiotiques ayant pour support le chromosome bactérien est portée par l'ensemble de la population d'une espèce bactérienne. Elle est transmise au sein de cette population par un transfert vertical. La résistance naturelle est connue pour une espèce donnée et nécessite d'en tenir compte lors d'un traitement thérapeutique. Par exemple les bactéries Gram négatives sont toutes naturellement résistantes aux glycopeptides.

La résistance acquise portée par des gènes de résistance s'effectue par transfert vertical et par transfert horizontal ; elle se transmet au sein d'une même espèce et d'une espèce bactérienne à une autre. De ce fait, la résistance acquise entraîne la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques. Le transfert de gènes de résistance s'effectue par trois grands mécanismes que sont la conjugaison (le plus probable et le plus fréquent), la transduction ainsi que la transformation. Les gènes de résistances aux antibiotiques peuvent être situés sur des plasmides. Les plasmides sont caractérisés par un phénomène d'incompatibilité (deux plasmides proches structurellement ne peuvent coexister dans une même bactérie) et dépendent du facteur de transfert. Ces mêmes gènes de résistance peuvent être également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Les gènes d'antibiorésistance sont principalement associés aux intégrons de classe 1, 2 et 3 (Tableau 1).

Les résistances acquises par mutation (exemple de la résistance à la colistine) ne présentent pas les mêmes enjeux en termes de santé publique puisque elles ne sont pas transférables horizontalement.

Une même bactérie peut héberger différents mécanismes de résistance (gène de résistance, mutation et réduction de la perméabilité par exemple).

Intégrons de classe 1	Intégrons de classe 2	Intégrons de classe 3
Résistance aux β-lactamines : **β-lactamases classes A, C, D** **β-lactamases classe B** Résistance aux aminosides : **6' – acétyltransférases** **3 – acétyltransférases** **2'' – adénylyltransférases** **3'' – adénylyltransférases** Résistance au chloramphénicol : **acétyltransférases** **Mécanisme non enzymatique** Résistance au triméthoprime : **Dihydrofolate réductases classes A et B** Résistance à la rifampicine : **ADN-ribosyl transférase** Résistance à l'érythromycine : **Erythromycine estérase** Résistance aux ammoniums quaternaires	**Résistance aux aminosides :** 3'' – adénylyltransférases **Résistance à la streptomycine :** Acétyltransférase **Résistance au triméthoprime :** Dihydrofolate réductases classes A et B	**Résistance aux β-lactamines :** β-lactamases classe B **Résistance aux aminosides :** 6' - acétyltransférases

Tableau 1: Antibiorésistance bactérienne associée aux classes d'intégrons. (Extrait de Génétique bactérienne IV : Les intégrons - Faculté de Médecine de Limoges. 2002

La diffusion de plusieurs gènes de résistance portés sur un même plasmide par transfert horizontal peut générer des souches bactériennes multirésistantes (MDR). Cette multirésistance est dénommée PDR (pandrug resistance) ou XDR (extreme drug resistance) lorsque les solutions antibiotiques sont limitées voire inexistante (impasses thérapeutiques). Le transfert de gènes tend également à rendre résistantes, des espèces initialement sensibles. Par exemple, *Staphylococcus aureus* ou encore *Streptococcus pneumoniae* responsables d'infections communautaires peuvent devenir des espèces multirésistantes. De ce fait, la maîtrise de la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue un enjeu majeur de santé publique.

2.2 L'Antibiorésistance bactérienne : un enjeu majeur en santé publique

2.2.1 Conséquences de l'antibiorésistance bactérienne

Il est actuellement estimé que la résistance bactérienne aux antibiotiques cause 700000 morts chaque année dans le monde. Ce nombre pourrait s'élever à 10 millions en 2050 si aucune action n'est mise en œuvre (O'Neill *et al*, 2016 (amr-review.org)). La résistance bactérienne engendre aussi un coût financier. En 2011 déjà, le surcoût dû à l'antibiorésistance bactérienne était estimé à 1,5 milliard d'euros dans l'Union Européenne (Commission Européenne et Direction générale des consommateurs et de la santé, 2011(ec. europa.eu)). La découverte de nouveaux antibiotiques ne compense pas l'émergence de résistances (Butaye *et al*, 2015) ce qui aboutit, à long terme, à des impasses thérapeutiques. En santé animale, la législation européenne interdit tout usage d'antibiotiques depuis le 1er janvier 2006 comme

facteurs de croissance chez les animaux de rente (terrestres ou aquacoles). Cependant, la législation est différente dans toutes les parties du monde.

2.2.2 Classes d'antibiotiques d'importance critiques en santé humaine

L'OMS a traité de la résistance aux antibiotiques en lien avec des bactéries pathogènes. Elle a permis de lister les familles d'antibiotiques critiques en santé humaine classées par ordre d'importance (WHO, 2016). L'OMS a également dressé une liste d'agents pathogènes pour lesquels les phénomènes de résistance posaient un enjeu critique en santé humaine afin d'orienter les recherches (WHO, 2017). Dans cette liste, on retrouve principalement des genres de bactéries Gram négatives *: Acinetobacter, Pseudomonas, Enterobacteriaceae* (*Klebsiella, Escherichia, Enterobacter, Serratia, Proteus, Providencia, Morganella*), *Campylobacter, Salmonella, Neisseria, Haemophilus, Shigella* et quelques genres de bactéries Gram positives *Enterococcus, Staphylococcus, Streptococcus.* Le projet présenté ici s'est appuyé sur les classes d'antibiotiques et sur les pathogènes présentés dans les rapports 2016 et 2017 de l'OMS.

2.2.3 Les systèmes de surveillance

Les bactéries porteuses de résistance aux antibiotiques occupent trois compartiments dynamiques : environnementaux, animaux et humains dans lesquels des échanges de gènes de résistance aux antibiotiques ont lieu (Robinson *et al*, 2016). La matrice alimentaire est un des vecteurs de la transmission de résistance aux antibiotiques entre le compartiment animal et environnemental avec le compartiment humain (Webb *et al*, 2017). Divers systèmes de surveillance ont été mis en place en France, en Europe et dans le monde. A l'échelle européenne, la surveillance est coordonnée par l'EFSA chez l'animal et produits dérivés et par l'ECDC chez l'Homme. L'EFSA est un organisme dont l'activité est d'émettre des avis et des conseils scientifiques en relation avec les politiques et législations européennes en matière de chaîne alimentaire. En collaboration avec l'ECDC, l'EFSA publie régulièrement des rapports sur la surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques. Cette année, le dernier rapport élaboré avait pour sujet la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries zoonotiques chez l'Homme, les animaux et dans les aliments.

Le LR-UE (Laboratoire de référence de l'Union Européenne) « Antibiorésistance » pilote un réseau de LNRs (Laboratoire national de référence) dans chaque Etat membre. En France, le LNR résistance antimicrobienne (rassemblant plusieurs laboratoires de l'Anses), est nommé par la DGAl (Direction générale de l'Alimentation) par l'arrêté du 29 décembre 2009.

Une partie des missions du LNR, encadrées par le décret n°2006-7 du 4 janvier 2006, s'inscrivent dans la directive 2003/99/CE (17 novembre 2003). Ces missions consistent en la surveillance à l'échelle nationale de la résistance aux antibiotiques des bactéries zoonotiques et commensales isolées d'animaux d'élevage (denrées alimentaires) destinés à entrer dans la chaîne alimentaire. A côté du LNR, il existe en France un réseau de laboratoires : le Résapath (Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) qui permet de collecter des données d'antibiorésistance chez l'animal malade (sauvage, en élevage, ou de compagnie) qui sera, le cas échéant, écarté de la chaîne alimentaire. La surveillance de l'antibiorésistance des bactéries issues des produits alimentaires se concentre sur trois grandes filières de production terrestres : bovines, porcines et de volaille.

3. Les produits de la mer, source potentielle de bactéries résistantes aux antibiotiques

3.1 Surveillance et produits de la mer

En termes de matrice alimentaire, il n'existe pas de système de surveillance actuellement sur les produits de la mer (péchés, d'élevages, sauvages). Ce secteur mériterait d'être étudié compte tenu de la consommation importante (20 kg/an/habitant d'après la FAO, 2016) des produits de la pêche et de l'aquaculture (secteur en augmentation) qui constituent une ressource de première importance en termes non seulement de revenu mais également en matière de nutrition et d'alimentation. Compte tenu de la description de gènes de résistance dans certaines bactéries d'origine marine tel que bla_{NDM} chez *Vibrio parahaemolyticus* (Briet *et al,* 2018) et de l'importance de certains produits de la mer consommés (crevettes, cabillauds, moules, homards, huîtres et poissons plats en France), il semble opportun de mieux connaître l'exposition du consommateur vis-à-vis de bactéries résistantes aux antibiotiques.

3.2 Milieu aquatique et transferts

L'environnement aquatique est un milieu favorable pour l'acquisition et la dissémination de l'antibiorésistance (Watts *et al,* 2017), notamment en raison de la présence simultanée de bactéries d'origines différentes, et d'antibiotiques, leurs résidus et de biocides provenant d'activités anthropiques (Marti *et al*, 2014 ; Rizzo *et al*, 2013). Les antimicrobiens utilisés en aquaculture notamment induisent une pression de sélection au sein des bactéries autochtones ou non dans le milieu marin. Il existe peu d'informations sur le système de

contrôle de l'utilisation des antibiotiques en aquaculture dans les pays en voie de développement constituant pourtant 90% de la production en aquaculture (Cabello 2006 ; Santos *et al*, 2016). Un mésusage des antibiotiques ne peut pourtant qu'augmenter la pression de sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques. Les effluents provenant des eaux usées d'hôpitaux contenant des antibiotiques et leurs métabolites qui *in fine*, se déversent dans l'environnement marin contribuent également à cette augmentation de pression de sélection. Le milieu marin pourrait donc jouer le rôle de réservoir de gènes de résistance amplifié entre autre par l'activité anthropique.

3.3 Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer

Quelques études se sont intéressées à ce secteur. Aussi, bla_{VCC-1} a été détecté chez *Vibrio cholerae* dans les eaux côtières d'Allemagne et isolés de crevettes vendues pour leur consommation au Canada (Hammerl *et al*, 2017). Une autre étude a caractérisé des intégrons de classe 1 sur une cassette portant des gènes de résistance aux trimethoprimes/sulfamethoxazole, sulfisoxazole, ampicilline, tétracycline et au chloramphénicol chez *Salmonella enterica* issue des produits de la mer importés du Vietnam et d'Inde. Cette cassette serait la même chez *V. cholerae* et pourrait avoir été transmise entre les deux espèces bactériennes. Ceci serait un exemple du phénomène d'expansion de l'antibiorésistance par transfert horizontal et vertical (Khan *et al*, 2006). Dans certaines études plus ciblées sur le microbiote du poisson en aquaculture, des résistances aux β-lactamines ont été majoritairement identifiées (Ruzauskas *et al*, 2018). Les produits de la mer sont également perçus comme des réservoirs d'intégrons associés à des gènes d'antibiorésistance pour les Gram négatives au Japon (Ahmed *et al*, 2015).

Dans les produits de la mer, quelques cas d'études encore peu fréquents nous montrent que les bactéries isolées de ces produits sont non seulement riches en éléments génétiques mobiles, mais également riches en gènes de résistance aux antibiotiques. C'est sur ces deux aspects que va se concentrer notre étude : la détection de gènes de résistance aux antibiotiques d'importance critique en santé humaine présents sur des éléments génétiques mobiles étudiés à partir de bactéries issues des produits de la mer couramment consommés par les français (collection de bactéries isolées par l'unité B3PA). Ce projet de master s'est concentré sur les bactéries Gram négatives. Une puce originale utilisant le système de qPCR très haut débit Biomark (Fluidigm) sera développée et permettra la détection de marqueurs de résistance.

MATERIEL ET METHODE

1. Collections de souches étudiées

1.1 Contrôles positifs

Afin de valider les couples d'amorces qui ont soit été dessinés, soit modifiés ou issus de publications nous avons constitué une collection de contrôles positifs. Ces souches pour lesquelles la présence des gènes ciblés (génotype) est connue permettent de vérifier la détection correcte des gènes ciblés par les amorces utilisées. Lorsque cela a été possible, plusieurs contrôles positifs ont été inclus pour chaque cible afin d'inclure la plus grande diversité génétique possible. Les témoins positifs proviennent en grande partie de la collection de MATBR. Le reste des contrôles positifs a été collecté auprès du réseau de collaborateurs du laboratoire. Ils ont soit été transmis sous forme d'ADN déjà extrait, soit sous forme de souche bactérienne pure. Des plasmides (Figure 4) porteurs des fragments de gènes ciblés ont été synthétisés (GeneCust) lorsque les contrôles positifs n'étaient pas disponibles.

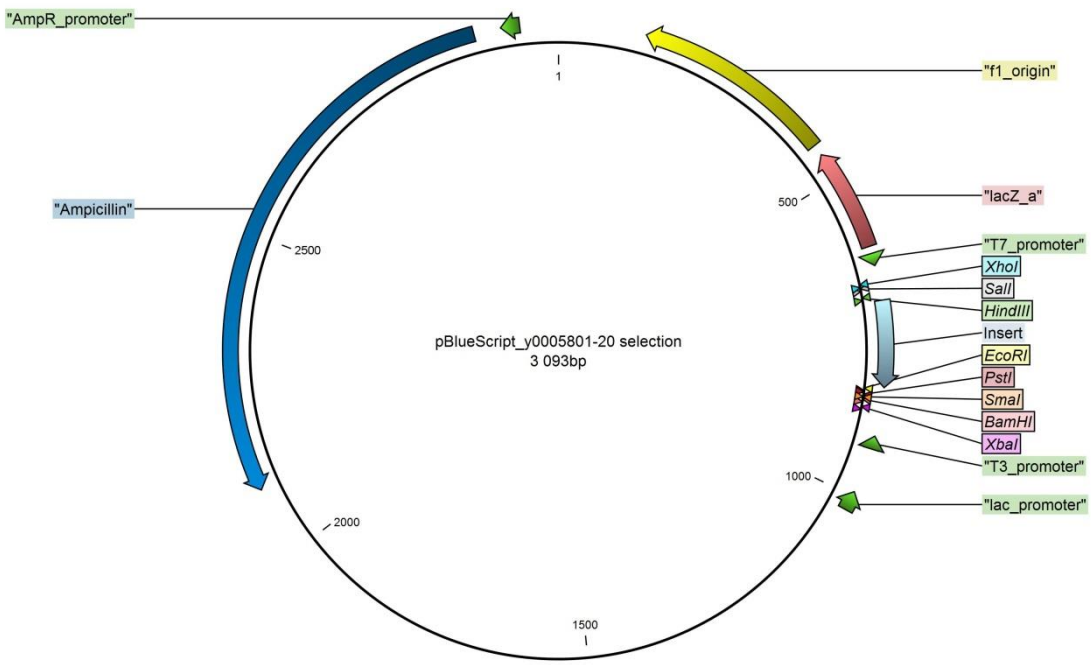


Figure 4: Carte du plasmide pBlueScriptIISK(+) avec insert *mcr-7*

1.2 Extractions des contrôles positifs

L'extraction des ADN des témoins positifs (Annexe 3) a été réalisée par InstaGene^{TM} Matrix (Référence : BioRad, 7326030) à 6% d'InstaGene matrix et contenant des microbilles chargées négativement permettant de fixer les cations Mg^{2+} (cofacteurs de l'activité des ADNases). 100µl d'InstaGene^{TM} Matrix ont été utilisés pour l'extraction de chaque colonie isolée à partir de cultures pures sur milieu Mueller-Hinton (BioRad). L'extraction s'est déroulée en deux étapes d'incubation : une à 56°C pendant 30 min permettant la désolidarisation de la cellule bactérienne et une autre à 100°C pendant 10 min permettant de rompre membranes et paroi. Enfin, une étape de centrifugation est effectuée à 12400 *g* pendant 2 min. Les souches témoins positives ont été repiquées, en parallèle de l'extraction d'ADN, dans des tubes contenant de la gélose de conservation et conservées à température ambiante dans l'obscurité. Ces stocks permettront de revenir à la souche extraite dans le cas où les résultats de qPCR seraient différents de ceux attendus. Le phénotype de certaines souches « contrôle positifs » provenant de sources extérieures à MATBR a été déterminé par la réalisation d'antibiogrammes avec des disques d'antibiotiques lus par le logiciel BioMIC2015.

1.3. Collection des souches « terrains » isolées des produits de la mer de Boulogne-Sur-Mer (Collection B3PA)

Dans le cadre de la thèse d'Arnaud Briet menée au sein de l'unité B3PA, une large collection de bactéries a été isolée à partir de la chair, des branchies et de la peau des produits de la mer. Ces produits de la mer comprennent les différentes catégories de produits les plus consommés en France : crevettes, homards, coquillages, poissons plats et cabillaud (*Gadus morua*) (Figure 5).

Les 159 bactéries Gram négatives de la collection B3PA ainsi constituée appartiennent aux genres bactériens *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Escherichia*, *Morganella*, *Shewanella, Acinetobacter* et *Klebsiella* selon la distribution présentée en figure 4. Notre étude s'est concentrée sur les genres bactériens Gram négatifs présents sur la liste de l'OMS des agents pathogènes prioritaires pour lesquels les phénomènes de résistance sont les plus critiques.

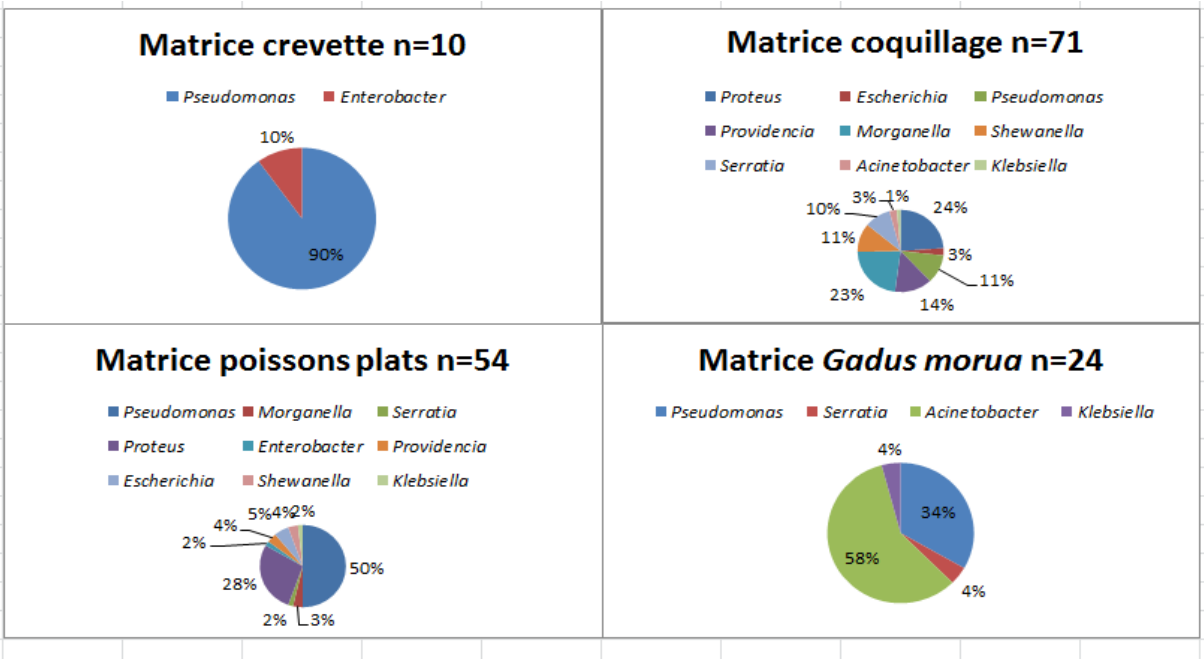


Figure 5: Collection B3PA (Annexe2)

3. PCR temps réel

3.1 Principe Technique de PCR temps réel

La PCR temps réel permet l'amplification de fragments d'ADN au cours de laquelle des fluorophores sont utilisés pour détecter la quantité de produits générés à chaque cycle (Higuchi *et al*, 1992). En qPCR, la fluorescence (proportionnelle à la quantité de produits synthétisés) est mesurée à la fin de chaque cycle (Wong et Medrano, 2005). Un agent intercalant (Sybr Green ou EvaGreen) peut être utilisé pour la fluorescence. L'agent intercalant se fixe sur l'ADN double brin synthétisé à chaque cycle. Cet agent intercalant libre dans le milieu réactionnel n'émet pas de fluorescence ; c'est seulement lors de son incorporation dans l'ADN double brin synthétisé que celui-ci devient capable d'émettre un signal fluorescent qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié. De façon alternative, on peut utiliser des sondes (TaqMan) de nucléotides marquées par un fluorophore dont la fluorescence apparaît alors que la synthèse de l'ADN progresse et que la sonde est dégradée et le flurorophore libéré dans le milieu réactionnel. Dans cette étude, nous avons utilisé un agent intercalant, l'EvaGreen (Figure 6). Cet intercalant est doté d'un pouvoir saturant permettant de vérifier la spécificité de l'amplicon détecté en réalisant une courbe de fusion des amplicons obtenus. La spécificité de l'amplicon est alors donnée par sa température de fusion (Tm).

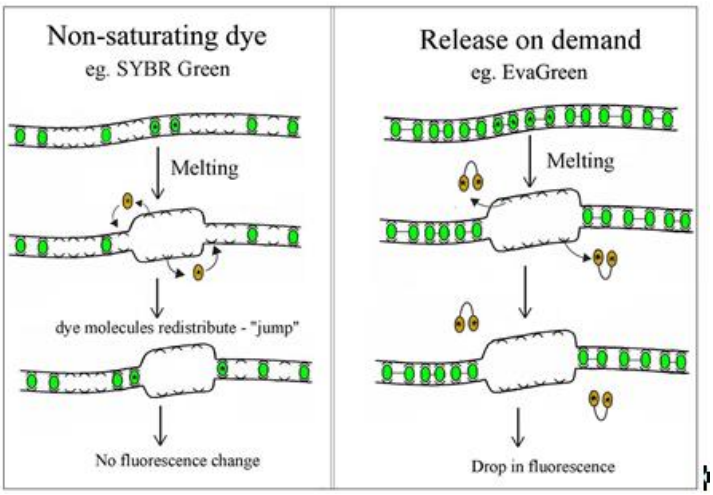


Figure 6: Principe de l'intercalant SybrGreen vs EvaGreen (Extrait de Sun et al, 2016)

3.2 Principe de la PCR temps-réel très haut débit Fluidigm

La PCR temps-réel très haut débit Fluidigm permet de réaliser 2304 à 9216 réactions de PCR temps réel par puce par le biais de circuits microfluidiques (IFC). Chaque chambre réactionnelle contient un volume de 6 à 9 nL. Cette technologie permet de réaliser un screening d'un grand nombre d'échantillons pour de faibles coûts et de diminuer le nombre de manipulations : 193 étapes de pipetage comparé à plus de 18 000 étapes de pipetage lors d'essais de cette grandeur sur plaque standard à 384 micropuits. Ainsi, les plaques IFC 96.96 utilisées dans le cadre de ce projet permettent de tester simultanément la présence de 96 gènes dans 96 échantillons, soit 9216 réactions simultanées.

3.3 Protocole décrit

La plaque Fluidigm 96x96 dynamic array est chargée d'un côté avec les couples d'amorces (5µM chacune) préalablement mélangés avec un réactif détergent (Assay Loading Reagent 1X (Fluidigm, 85000736)). L'autre côté de la plaque est chargé avec un mix réactionnel contenant les extraits d'ADN (extrait de la collection B3PA ou des contrôles positifs), ainsi les réactifs suivants PerfeCTa® qPCR ToughMix® 1X (QuantaBio, 95112-05K), DNA Binding dye sample loading reagent 1X (Fluidigm, 100-0388), Evagreen 1X (Botium 31000), ROX reference dye 1X (Invitrogen) (Figure 7).

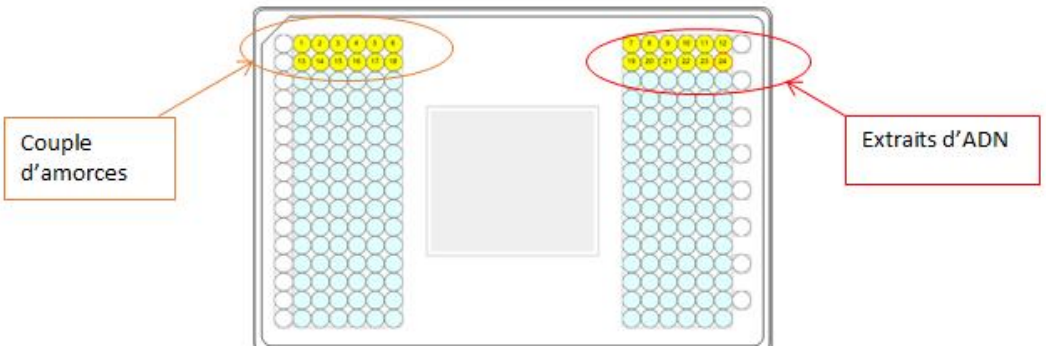


Figure 7: Plan de chargement de la puce 96x96.

Grâce au système de canaux microfluidiques, l'automate IFC controller HX va assurer le mélange de chaque extrait d'ADN avec chaque couple d'amorces dans 9216 chambres réactionnelles de 6 nL chacune. La plaque est ensuite soumise à la procédure de PCR temps réel dans le Biomark (Figure 8). Sachant que toutes les réactions ont lieu en même temps, il est nécessaire que les propriétés des amorces soient homogènes.

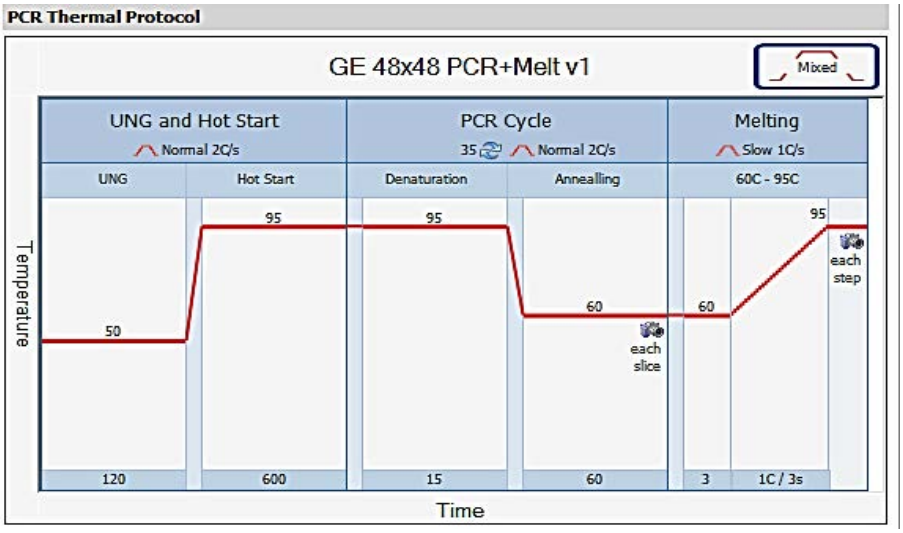


Figure 8: Paramètres de la PCR temps réel utilisés

4. Choix des cibles

4.1 Gènes de résistance aux antibiotiques

Les gènes choisis dans cette étude (Tableau 2) ont été sélectionnés en fonction de leur importance en santé publique selon la liste de l'OMS répertoriant les classes d'antibiotiques critiques en santé humaine. Nous nous sommes également attachés à sélectionner des gènes qui avaient été décrits dans la littérature comme portés par des éléments génétiques mobiles (donc transférables) dans des bactéries gram négatives. La nomenclature des variants des

gènes ciblés est non universelle et de nombreux variants contiennent des séquences très variables.

Classe d'Antibiotique	Gène de résistance	Références
Aminosides	*npmA ; armA ; rmtA ; rmtB ; rmtC ; rmtD1&D2 ; rmtE ; rmtF ; rmtG ; rmtH* et *aac(6')-Ib-cr*	Tijet et al, 2011 ; Fontes *et al*, 2011 ; Graneau-Tsodikova et labby, 2015
β-lactamines	$bla_{\text{OXA-10-like}}$; $bla_{\text{OXA-23-like}}$; $bla_{\text{OXA-58-like}}$; $bla_{\text{OXA-48-like}}$; $bla_{\text{OXA-51-like}}$	Poirel *et al*, 2010 ; Walther-Ramussen et HØiby, 2006 ; Evans et Amyes, 2014 ; Poirel *et al*, 2012 ; Antunes et Fisher, 2014 ; Witchuda Kamolvit *et al*, 2014
β-lactamines	$bla_{\text{CTX-M}}$ (cluster 3 ; 2 ; 14 ; 8)	Zhao et Hu, 2013
β-lactamines	bla_{PER}	Elham Davodian *et al*, 2016
β-lactamines	bla_{IMP}	Shanthi Amudhyan *et al*, 2012
β-lactamines	bla_{VEB}	Elham Davodian *et al*, 2016
β-lactamines	bla_{SHV}	Gniadkowski, 2008
β-lactamines	bla_{TEM}	Gniadkowski, 2008
β-lactamines	bla_{CMY}	Barlow et Hall, 2002
β-lactamines	bla_{GES}	Kayama *et al*, 2018
β-lactamines	$bla_{\text{VCC-1}}$	Hammerl *et al*, 2017
Fosfomycines	*fosA2 ; fosA3 ; fosA4 ; fosA5 ; fosA6 ; fosA7*	Tsung-Ying *et al*, 2017
Polymyxines	*mcr-1* ; *mcr-2* ; *mcr-3* ; *mcr-4* ; *mcr-5*; *mcr-6*; *mcr-7*	Cabello *et al*, 2017
Macrolides	*mph(A); mph(B); mph(C); mph(D); mph(E); mph(G);*	Pawlowski *et al*, 2018
Lincosamides	*erm(A); erm(B) ; erm(C) ; erm(F); erm(G) ; erm(X)*	Baron *et al*, 2017 ; Popowska *et al*, 2012
Ansamycine	*arr-2 ; arr- ; arr-4 ; arr-5*	Floss et Yu *et al*, 2005
Quinolones	*qnrA ; qnr ; qnrC ; qnrS ; qnrD ; qnrVC*	Jacoby *et al*, 2014

Tableau 2: Gènes de résistance aux antibiotiques ciblés.

4.2 Marqueurs d'éléments génétiques mobiles

Les intégrons sont des éléments génétiques mobiles caractérisés par la présence d'un gène *intI* codant pour une intégrase (Gillings, 2014). Les intégrons de classe 1, 2 et 3 étant fréquemment associés à des gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes *intI1, intI2* et *intI3* spécifiques chacun d'une classe d'intégron, ont été sélectionnés.

De la même façon, les plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité fréquemment porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae* ont été ciblés : incA/C, incFIC, incFIA, incFIB, incK, incB/O, incZ, incL/M, incFII, incN, incHI2, incI1 (Carratoli *et al*, 2009). Les gènes ciblés pour chaque groupe sont les gènes et

éléments *cis* impliqués dans le contrôle de la réplication : gène *repA* codant pour la réplicase, itérons et RNAI.

4.3 Dessins des amorces et tests *in silico*

Pour l'ensemble des cibles sélectionnées, les amorces ont été soit reprises de la bibliographie lorsque ceci était possible ou le cas échéant, ont été dessinées.

La première étape a donc été de récupérer dans la bibliographie les couples d'amorces disponibles pour les cibles sélectionnées. En l'absence d'amorces existantes dans la bibliographie, les séquences de tous les variants connus pour chaque gène ont été collectées à partir de différentes bases de données (NCBI, ResFinder, ARG-ANNOT, CARD), alignées à l'aide du logiciel BioEdit et de nouvelles amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi.).

Les amorces identifiées dans la littérature ou les amorces *de novo*, suivent ensuite le même processus de validation (Figure 9). Au cours de ce processus, il est vérifié que la taille des amplicons ne dépasse pas 250 paires de bases (pb) et que les paramètres thermodynamiques et physico-chimiques des amorces correspondent aux critères spécifiques de la technique. Ainsi, la taille des amorces doit être comprise entre 18 et 22 nucléotides (nt). La température de fusion (Tm) de l'ensemble des amorces doit être identique et est fixée à 60°C ±1 pour obtenir une PCR optimale dans les conditions appliquées lors de la réaction de PCR dans le Biomark (paragraphe 3.3). Il est également nécessaire que les amorces ne forment pas de dimères ou de structures en épingles et ne doivent pas faire de mésappariements. Leur pourcentage en G et C doit être compris entre 40 et 60%. L'ensemble de ces paramètres ont été vérifiés à l'aide de l'outil OligoCalc (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html).

Lors de l'étape suivante il est nécessaire de vérifier l'inclusivité des amorces, c'est-à-dire de vérifier que les amorces détectent effectivement le gène sélectionné ainsi que tous ses variants. Les variants des gènes identifiés dans différentes bases de données (NCBI, ResFinder, ARG-ANNOT, CARD) ont été compilés au sein d'une base de données locale. Les amorces ont ensuite été analysées par Blast sur la base de données locale à l'aide du logiciel CLC Genomic Workbench. L'exclusivité des amorces, c'est-à-dire le fait qu'elles ne détectent que la cible pour laquelle elles ont été dessinées, a été vérifiée par Blast sur base de données locale et sur la base de données du NCBI. Une fois cette étape validée, les amorces peuvent être synthétisées (Eurofins). Si l'une des étapes n'est pas validée (validation des

paramètres thermodynamiques et physicochimiques ou l'étape du blast), un (nouveau) dessin *de novo* sera réalisé.

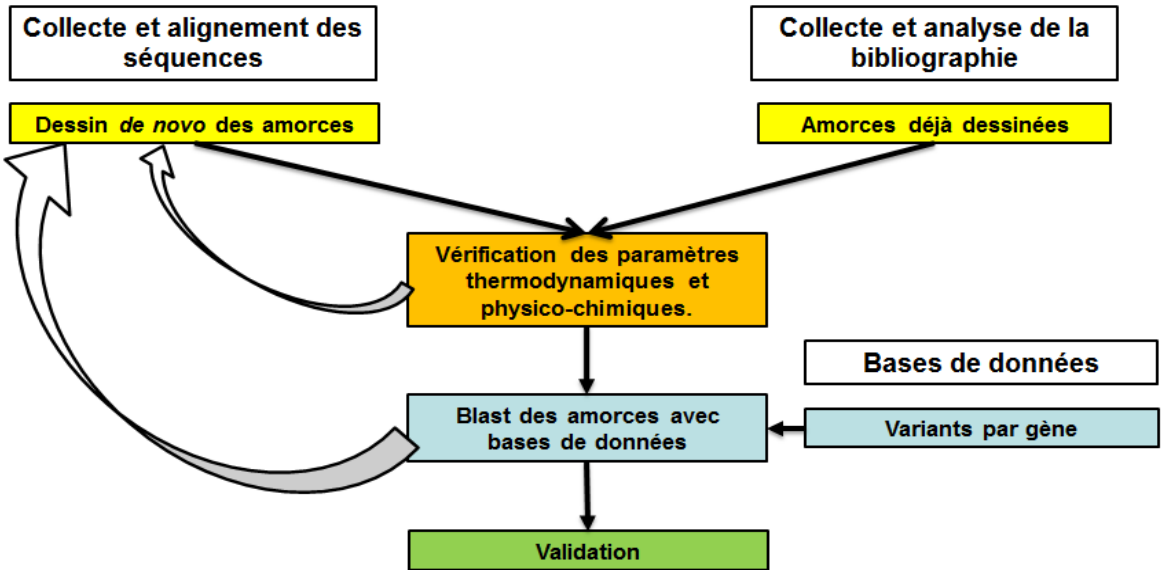


Figure 9: Schéma du protocole utilisé pour les tests *in silico*.

RESULTATS

1. Dessin des marqueurs de gènes d'antibiorésistance

Les tableaux 3 et 4 représentent les 101 couples d'amorces dessinées au cours de ce stage. Pour certains couples d'amorces, il a fallu par exemple une amorce sens pour deux anti-sens (ou vice-versa) afin de détecter le gène cible. De ce fait, un total de 184 amorces ont été soit sélectionnées, soit modifiées, soit dessinées permettant l'amplification de 66 gènes de résistance aux antibiotiques d'importance critique en santé humaine et de 19 marqueurs associés aux éléments génétiques mobiles (intégrons et plasmides).

Le dessin s'est réalisé sur 3 mois pour l'ensemble des gènes de la liste de ce projet.

Les séquences nucléotidiques de tous les variants connus pour chaque gène ont été extraites et alignées après compilation de différentes bases de données répertoriant des séquences de gènes de résistance aux antibiotiques : ResFinder, CARD, ARG-ANNOT et NCBI. Le dessin des amorces a été effectué sur les zones les plus conservées possibles des alignements de séquences. Pour certains gènes, il a fallu dessiner plusieurs couples d'amorces afin de pouvoir détecter l'ensemble des variants connus en raison de la grande diversité génétique et/ou du nombre de variants répertoriés pour ces gènes. Ceci a par exemple été le cas pour le gène *qnrB*, pour lequel 5 couples d'amorces ont été nécessaires afin de détecter les 80 variants répertoriés. Pour certains gènes présentant une diversité génétique importante, l'alignement de l'ensemble des variants n'a pas permis d'identifier de région conservée sur l'ensemble des séquences. Pour ces gènes, des arbres phylogénétiques ont alors été réalisés. Ces arbres phylogénétiques construits sur la similarité des séquences (Neighbor Joining) ont permis de regrouper les séquences similaires qui ont ensuite été alignées. Ces arbres ont également permis de s'affranchir de l'absence de nomenclature pour certains gènes et de regrouper les variants en clusters par homologie de séquence. C'est par exemple le cas du gène *fosA* impliqué dans la résistance à la fosfomycine pour lequel les variants ont pu être numérotés dans la littérature en l'absence de toute cohérence. Ainsi, pour les gènes de résistance : bla_{TEM}, bla_{CMY}, $bla_{\text{OXA-51-like}}$, *qnrB*, bla_{SHV}, bla_{VIM} et *fosA*, il a fallu effectuer les arbres phylogénétiques. Un couple d'amorce comporte une amorce sens et une amorce anti-sens afin d'amplifier une section du gène ciblé la plus conservée possible. Pour certains gènes, il a été nécessaire de dessiner un couple contenant 3 amorces afin de capturer la diversité du gène. Ceci a été le cas pour les gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ appartenant au cluster 2. Pour certains gènes, il a fallu dessiner des amorces contenant des nucléotides dégénérés afin de

pouvoir détecter l'ensemble des variants. Par exemple, l'amorce reverse dessinée pour cibler le gène *bla*$_{OXA-51}$ a nécessité l'introduction d'un nucléotide ambigüe.

Les amorces ont été soit dessinées à 61%, soit modifiées à 12% de la bibliographie, et soit issues de la bibliographie à 16%. La composition en oligonucléotides des amorces est restée confidentielle et peut être envoyée à la demande du jury.

Gène	classe d'antibiotique	Source amorce F	Source amorce R	Variants
mcr-1	Polymixines	Unpublished: Webb *et al*,2018	Unpublished: Webb *et al*,2018	12
mcr-2	Polymixines	Unpublished:.Webb *et al*,2018	Unpublished:.Webb *et al*,2018	2
mcr-3	Polymixines	Unpublished: Webb *et al*,2018	Unpublished: Webb *et al*,2018	8
mcr-4	Polymixines	Unpublished: Webb *et al*,2018	Unpublished:.Webb *et al*,2018	3
mcr-5	Polymixines	Unpublished: Webb *et al*,2018	Unpublished: Webb *et al*,2018	1
mcr-6	Polymixines	cette étude	cette étude	1
mcr-7	Polymixines	cette étude	cette étude	1
mph(A)	Macrolides	Looft *et al*, 2012 (modifié)	Looft *et al*, 2012	2
mph(B)	Macrolides	Looft *et al*, 2012	cette étude	1
mph(C)	Macrolides	cette étude	cette étude	1
mph(D)	Macrolides	cette étude	cette étude	1
mph(E)	Macrolides	cette étude	cette étude	1
mph(G)	Macrolides	cette étude	cette étude	2
erm(A)	Macrolides	cette étude	cette étude	3
erm(B)	Macrolides	cette étude	cette étude	14
erm(C)	Macrolides	Looft *et al*, 2012	cette étude	12
erm(F)	Macrolides	Zhu *et al*, 2013	cette étude	3
erm(G)	Macrolides	cette étude	cette étude	2
erm(X)	Macrolides	Zhu *et al*, 2013	Looft *et al*, 2012 (modifié)	5
arr-2	Macrolides	cette étude	cette étude	1
arr-3	Macrolides			2
arr-4	Macrolides	cette étude	cette étude	1
arr-5	Macrolides	cette étude	cette étude	1
*bla*CTX-M-3 cluster	βlactamines	Roschanski *et al*, 2014 (modifié)	Roschanski *et al*, 2014 (modifié)	42
*bla*CTX-M-14 cluster	βlactamines	Roschanski *et al*, 2014 (modifié)	Roschanski *et al*, 2014 (modifié)	38
*bla*CTX-M-8 cluster	βlactamines	Roschanski *et al*, 2014 (modifié)	Roschanski *et al*, 2014 (modifié)	3
*bla*CTX-M-2 cluster	βlactamines	cette étude	Roschanski *et al*, 2014 (modifié)	16
bla$_{KPC}$	βlactamines	Muziasari *et al*, 2016 (modifié)	Muziasari *et al*, 2016 (modifié)	20

bla$_{GES}$	βlactamines	Muziasari *et al*, 2016	cette étude	25
bla$_{SHV}$	βlactamines	cette étude	cette étude	216
bla$_{TEM}$	βlactamines	cette étude	Zhu *et al*, 2013 (modifié)	180
bla$_{VEB}$	βlactamines	cette étude	cette étude	19
bla$_{VCC}$	βlactamines	cette étude	cette étude	1
bla$_{PER}$	βlactamines	cette étude	cette étude	8
bla$_{VIM}$	βlactamines	cette étude	cette étude	42
bla$_{NDM}$	βlactamines	Buelow *et al*, 2017 (modifié)	Buelow *et al*, 2017(modifié)	18
bla$_{IMP}$	βlactamines	cette étude	cette étude	39
bla$_{CMY}$	βlactamines	cette étude	cette étude	101
*bla*OXA-10-like	βlactamines	cette étude	cette étude	27
blaOXA-23-like	βlactamines	cette étude	cette étude	18
blaOXA-58-like	βlactamines	cette étude	cette étude	5
blaOXA-48-like	βlactamines	cette étude	cette étude	11
blaOXA-51-like	βlactamines	cette étude	cette étude	95
npmA	Aminoglycosides	Fritsche *et al*, 2008 (modifié)	cette étude	1
armA	Aminoglycosides	Guo *et al*, 2014 (modifié)	Guo *et al*, 2014 (modifié)	1
rmtA	Aminoglycosides	Yamane *et al*, 2003	cette étude	1
rmtB	Aminoglycosides	Yan *et al*, 2004 (modifié)	cette étude	2
rmtC	Aminoglycosides	cette étude	cette étude	1
rmtD1 et *rmtD2*	Aminoglycosides	cette étude	cette étude	2
rmtE	Aminoglycosides	cette étude	cette étude	1
rmtF	Aminoglycosides	Hidalgo *et al*, 2013 (modifié)	cette étude	1
rmtG	Aminoglycosides	cette étude	cette étude	1
rmtH	Aminoglycosides	cette étude	cette étude	1
qnrA	Quinolones	Buelow *et al*, 2018	Buelow *et al*, 2018	7
qnrB	Quinolones	cette étude	cette étude	80
qnrC	Quinolones	Buelow *et al*, 2018	Buelow *et al*, 2018	1
qnrS	Quinolones	cette étude	cette étude	9
qnrD	Quinolones	cette étude	cette étude	2
qnrVC	Quinolones	cette étude	cette étude	9
aac(6')-Ib-cr	Quinolones et aminoglycosides	cette étude	cette étude	4
fosA2	Acides phosphoniques	cette étude	cette étude	1
fosA3	Acides phosphoniques	cette étude	cette étude	1
fosA4	Acides phosphoniques	cette étude	cette étude	2
fosA5	Acides phosphoniques	cette étude	cette étude	2
fosA6	Acides phosphoniques	cette étude	cette étude	2
fosA7	Acides phosphoniques	cette étude	cette étude	2

Tableau 3: Gènes de résistance aux antibiotiques ciblés.

Gène	Elément génétique mobile	Source F	Source R
intI1	intégrons de classe1	Muziasari *et al*, 2016	Muziasari *et al,* 2016
intI2	intégrons de classe 2	Muziasari *et al*, 2016	cette étude
intI3	intégrons de classe 3	Muziasari *et al*, 2017	Muziasari *et al*, 2016
repA (IncA/C)	Plasmide IncA/C	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
repA (IncFIC)	Plasmide IncFIB	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
repA (IncFIA)	Plasmide IncFIA	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
repA (IncFIB)	Plasmide IncFIB	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
RNAI (IncK/B/O/Z)	Plasmide K/B/O/Z	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
repA (IncL/M)	Plasmide IncL/M	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
repA(IncFII)	Plasmide IncFII	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
repA(IncN)	Plasmide IncN	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
Iterons (IncHI2)	Plasmide IncHI2	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy
RNAI (incI1)	Plasmide IncI1	Sabine Delannoy	Sabine Delannoy

Tableau 4 : Gènes signature d'éléments génétiques mobiles ciblés.

2. Validation de la Puce Fluidigm

La première étape a consisté à valider le couple d'amorce U16S par qPCR conventionnelle avec le LightCycler® nano (Roche). Les amorces U16S ciblent le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr). Les amorces U16S ont été dessinées de façon à détecter plus de 90% des séquences des gènes ARNr 16S bactériens et servent de contrôle positif pour la PCR temps réel (présence d'ADN bactérien). Le contrôle négatif utilisé est de l'eau PCR.

Le couple d'amorce U16S a été validé à 100% par qPCR sur 30 types d'organismes différents : *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter faecalis, Enterobacter gergoviae, Enterobacter hormaechei, Enterobacter kobei, Enterobacter pyrinus, Enterobacter sp, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Escherichia hermanii, Escherichia coli, Hafnia alvei*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Kluyvera intermedius*, *Vibrio vulnificus*, *Pantoea. Spp*, *Raoultella planticola*, *Raoultella terrigena*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica agona*, *Salmonella enterica dublin*, *Salmonella enterica typhimurium*, *Serratia fonticola*, *Serratia marcesens*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica.*

L'ensemble des couples d'amorces est validé par PCR temps réel très haut-débit sur la puce Fluidigm avec une collection de contrôles positifs permettant ainsi de valider simultanément l'inclusivité ou sensibilité diagnostique (capacité à détecter toutes les souches contrôles positives portant le gène ciblé) et l'exclusivité ou spécificité diagnostique (l'absence de détection des souches négatives, c'est-à-dire ne portant pas de gène cible) des tests. Une collection de 111 contrôles positifs a été testée, répartie sur deux plaques Fluidigm 96.96.

Pour tous les tests qPCR, le seuil limite de détection (Ct) a été défini à 22. D'autre part, pour chaque couple d'amorce, la température de fusion (Tm) a été évaluée afin d'éliminer les amplifications non spécifiques. Pour les amorces ciblant des clusters de variants, un écart de la Tm a été toléré afin de prendre en compte la diversité génétique des amplicons générés. Un gène peut avoir une quantité importante de variants aux séquences similaires générant des amplicons dont les Tm sont très proches (Figure 10). A contrario, certains gènes avec un nombre limité de variants mais dont les séquences sont très différentes vont générer des amplicons dont les Tm sont très différentes (Figure 11).

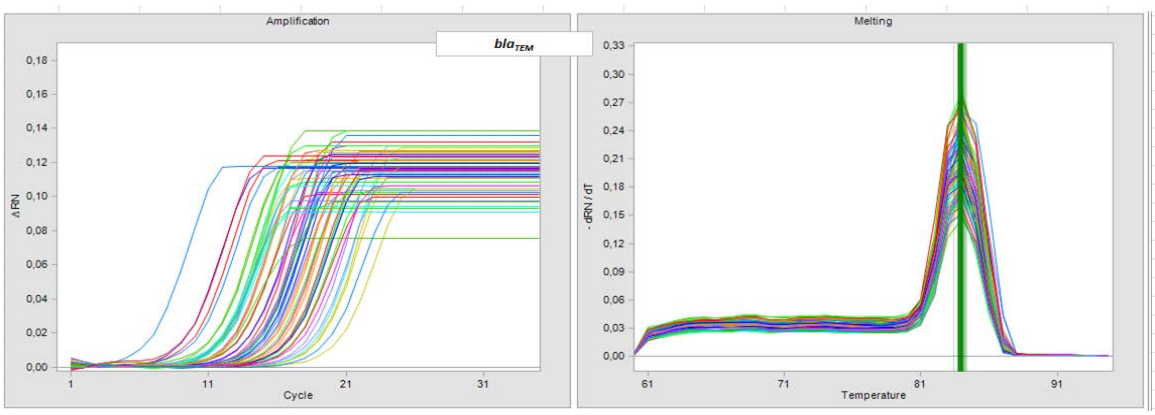


Figure 10: Détection du gène *bla*$_{TEM}$ (PCR temps réel, EvaGreen)

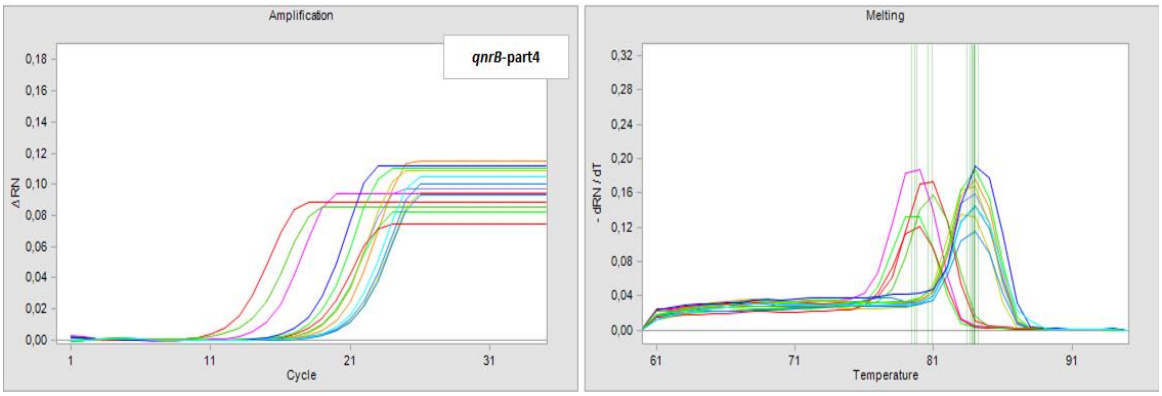


Figure 11: Détection du gène *qnrB* (PCR temps réel, EvaGreen)

A l'issue de cette étape de validation, les amorces ont été classées selon plusieurs catégories : les amorces validées pour la sensibilité et spécificité diagnostique, celles pour lesquelles seule la sensibilité a été validée et les amorces non validées.

Quarante couples d'amorces ont été validés à 100% pour l'inclusivité ou sensibilité diagnostique et l'exclusivité ou spécificité diagnostique (Tableau 5).

armA	*bla*$_{VIM}$ part3 $_{(VIM-7)}$	bla$_{PER}$ part2
rmtA	*bla*$_{NDM}$	bla$_{VEB}$
rmtB	*bla*$_{OXA-23-like}$	*qnrA*
rmtD1et D2	*bla*$_{OXA-58-like}$	*qnrB* part 3-2
rmtE	*bla*$_{CTX-M-2\ (CTX-M-74/75)}$	*qnrB* part 4
rmtH	*bla*$_{OXA-10-like}$ part3	*qnrC*
mcr-3	*mph(C)*	*qnrD*
mcr-4	*mph(D)*	*fosA2*
mcr-5	*mph(G)*	*fosA3*
mcr-6	*erm(B)*	*fosA4* part1
mcr-7	*erm(G)*	*fosA4* part2
intl3	*erm(X)*	*bla*$_{VCC-1}$
bla$_{VIM}$ *part1*	*arr-4*	IncLM
	arr-5	

Tableau 5: Liste des couples d'amorces validés à 100% au niveau de la sensibilité et spécificité diagnostiques

Vingt-six couples d'amorces ont montré une sensibilité diagnostique de 100%, mais leur spécificité diagnostique n'a pas pu être évaluée. En effet, ces amorces ont réagi avec d'autres contrôles positifs que ceux du gène cible. En l'absence d'informations relatives au génotype complet et au phénotype complet de ces isolats, il n'a pas été possible de déterminer si ces réactions correspondent à de « vrais » positifs (gène réellement présent dans le génome de la souche) ou des « faux » positifs (gène absent et amorces détectant un autre gène différent de celui recherché) et donc de valider la spécificité diagnostique pour ces amorces (Tableau 6).

rmtG	*bla*$_{TEM}$
mcr-1	*bla*$_{CMY}$ partie 2
intI1	*qnrS*
intI2	*fosA7* part1
bla$_{KPC}$	*fosA7* part2
bla$_{OXA-10-like}$ part1	IncA/C
cluster *bla*$_{CTX-M-3}$	IncFIA
mph(B)	IncFIB
mph(E)	IncK/B/O/Z
arr-3	IncFII 1/2
aac(6')-Ib-cr	IncN
bla$_{PER}$ part1	IncHI2
bla$_{SHV}$	IncI1-1/2

Tableau 6: Liste des couples d'amorces pour lesquels la sensibilité diagnostique est de 100% mais dont la spécificité diagnostique n'a pas pu être déterminée.

Quatre couples d'amorces ont montré une sensibilité diagnostique de 100% mais une moins bonne spécificité que prévue. En effet, ces amorces ont produit des réactions croisées avec d'autres variants que ceux qu'ils étaient censés cibler. Par exemple, les amorces ciblant le cluster *bla*$_{CTX-M-14}$ réagissent également avec des échantillons contenant un gène du cluster

bla$_{\text{CTX-M-3}}$. Ces amorces peuvent donc être validées mais avec un niveau de spécificité plus large (Tableau 7).

*mcr-2 (*croisement avec *mcr-1)*
cluster *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ (croisement avec le cluster *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$)
cluster *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$ (croisement avec le cluster *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$)
qnrB part 2 (croisement avec *qnrB* part1)

Tableau 7: Liste des couples d'amorces validés pour la sensibilité diagnostique mais dont la spécificité est moins bonne que prévue.

Deux couples d'amorces ayant une sensibilité diagnostique de 100% ont quant-à eux produits des faux positifs c'est-à-dire qu'ils ont réagi avec des souches de génotype connu ne renfermant pas le gène ciblé. Ces deux couples d'amorces n'ont donc pas été validés du fait de leur non spécificité (Tableau 8).

rmtC
rmtF

Tableau 8: Liste des couples d'amorces non validés (en raison de la présence de faux positifs)

Sept couples d'amorces n'ont pas été validés car ils ne détectaient aucun des contrôles positifs (Tableau 9).

bla$_{\text{OXA-48-like}}$
bla$_{\text{OXA-51-like}}$
mph(A)
erm(A)
bla$_{\text{IMP}}$ part1
fosA partie 5/6
bla$_{\text{GES}}$

Tableau 9: Liste des couples d'amorces non validés.

Dix couples d'amorces sont en attente de validation complète, les contrôles positifs pour ces amorces n'ayant pas encore été reçus (Tableau 10).

cluster *bla*$_{\text{CTX-M-8}}$
erm(C)
erm(F)
bla$_{\text{IMP}}$ part3
bla$_{\text{CMY}}$ partie 1
qnrB part 1
qnrB part 1 alt
qnrB part 3-1
qnrVC part1
qnrVC part 2

Tableau 10: Liste des couples d'amorces en attente de validation

3. Recherche de marqueurs de résistance dans la collection de souches B3PA

La recherche de gènes d'antibiorésistance potentiellement présents dans la collection B3PA est réalisée avec les couples d'amorces 100% validés (Tableau 5). Cent cinquante-neuf échantillons ont été analysés sur 2 plaques IFC 96.96. Le seuil limite de détection (Ct) a été positionné à 22 (Voir Validation de la puce). Parmi les 159 souches de la collection B3PA 18 souches (11,3%) ont été trouvées positives pour au moins l'un des gènes recherchés. Ceux-ci incluent les gènes *qnrA*, *fosA2*, *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$ (variants 74 et 75), *fosA4* (variant AB908992) et IncL/M (Tableau 11).

Marqueurs	Ct contrôle	Tm contrôle	Collection B3PA	Ct collection B3PA	Tm collection B3PA
qnrA	[11,5-15,95]	[84,94-85,14]	252-OUTC1: *Shewanella haliotis* 321-CHTC1: *Shewanella* 316-CHCH1: *Shewanella indica* 322-CHGS4: *Shewanella* 316-CHCH3: *Shewanella* 317-CHTC2: *Shewanella algae* 320-CHGS2: *Shewanella* 320-CHTC1 : *Shewanella algae* 319-CHGS3: *Shewanella haliotis*	14,84 9,64 13,33 12,67 10,51 12,29 13,32 12,34 12,17	84,6 84,63 84,51 84,61 84,78 83,76 84,84 84,73 84,93
fosA2	[10,09-10,48]	[88,22-88,28]	250-PETB1 : *Enterobacter cloacae*	15,02	88,1
*bla*CTX-M-2 cluster (variant 74/75)	[14,44-15,86]	[88,86-88,72]	308-PECF1 : *Pseudomonas helmanticensis*	19,58	89,58
bla$_{\text{NDM}}$	[15,01-15,95]	[86,28-86,76]	304-PECF1 : *Pseudomonas helmanticensis* 319-CHSA1 : *Morganella morganii* 316-CHPE2 : *Morganella* 320-CHTC1 : *Shewanella algae*	20,5 19,47 19 19,82	87,13 85,39 85,42 86,06
fosA4 partie 2	[11,93-12,12]	[88,06-88,28]	319-CHSA1 : *Morganella morganii* 316-CHPE2 : *Morganella*	21,58 21,05	87,55 87,6
IncL/M	16,17	84,84	251-PESA2 : *Escherichia coli* 251-PESA1 : *Escherichia coli* 251-PETB1 : *Escherichia coli*	15,45 16,89 15,06	85,05 84,86 84,98

Tableau 11: Résultats de détection des gènes cibles dans la collection B3PA

DISCUSSION

1. Spécificité de l'outil de détection développé

Les résultats bruts de détection ont montré un certain nombre d'amplifications tardives non spécifiques (Figure 12). Ces signaux non spécifiques tardifs sont dus à l'utilisation d'un agent intercalant. En effet, un agent intercalant peut se fixer à n'importe quelle molécule d'ADN double brin (sa spécificité repose entièrement sur le dessin des amorces) et donc induire des signaux non spécifiques (de plus en plus nombreux au fur et à mesure des cycles d'amplification). En effet, si les amorces arrivent même partiellement à reconnaitre certaines séquences qui ne leur sont pas complètement homologues, on peut alors observer des signaux tardifs. Afin de ne plus générer d'amplification non spécifique, il sera intéressant d'utiliser une sonde TaqMan, une amorce supplémentaire conférant une plus grande spécificité au signal.

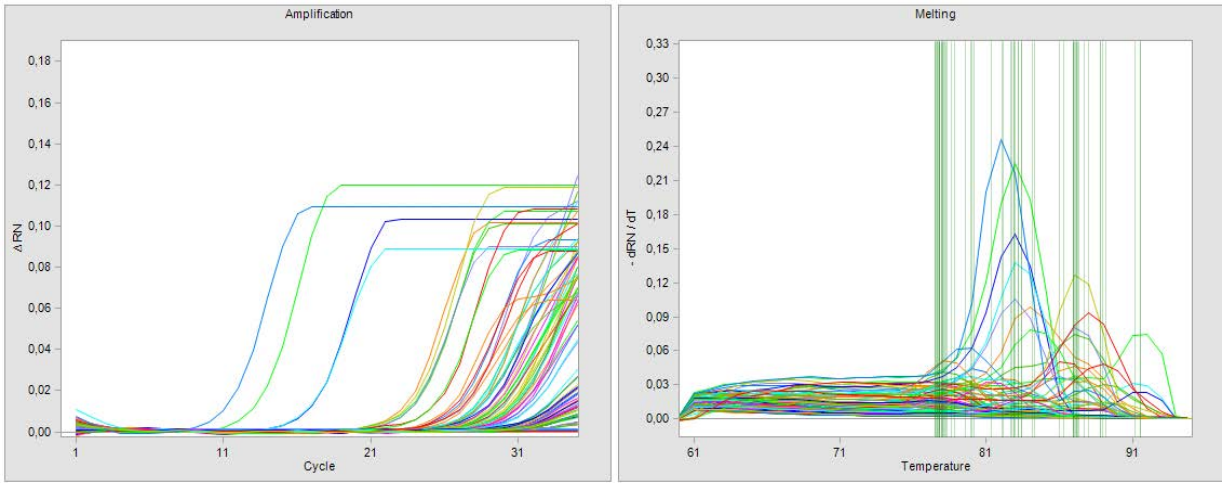


Figure 12: Résultats bruts d'amplification avant l'application des filtres (Ct et Tm)

2. Spécificité diagnostique des couples d'amorces lors de la validation de la puce Fluidigm

De nombreux couples d'amorces ont montré une spécificité trop faible.

Concernant les amorces détectant d'autres variants du gène en plus de ceux qu'elles devaient détecter (par exemple pour le couple d'amorce *mcr-2* détectant les gènes *mcr-2* et *mcr-1*), une plus grande spécificité pourrait être retrouvée en utilisant par exemple une sonde TaqMan.

Deux couples d'amorces (*rmtC* et *rmtF*) ont générés des réactions non spécifiques avec des gènes non cibles. Dans ces deux cas les séquences nucléotidiques des gènes étaient

particulièrement riches en répétitions de nucléotides ce qui rend difficile le dessin des amorces. Les amorces dessinées ne sont ainsi pas optimales et ont pu générer ces signaux non spécifiques. Dans ce cas, il faudra redessiner de nouvelles amorces en veillant à mieux respecter les paramètres thermodynamiques et physico-chimiques.

La spécificité diagnostique des amorces réagissant uniquement avec des souches contrôles dont le phénotype et le génotype sont connus a pu être validée. En revanche ceci n'est pas possible lorsque les amorces réagissent avec des contrôles dont le génotype complet et/ou le phénotype complet n'a pas été décrit (Tableau 6). La réalisation d'un antibiogramme (avec un test CIM si besoin, Figure 13) et le séquençage du génome total (en utilisant par exemple l'approche whole genome sequencing avec la technologie Illumina : Figure 14) des souches pour lesquelles les informations sont manquantes pourraient nous permettre de valider ces amorces et/ou éventuellement de détecter les faux positifs.

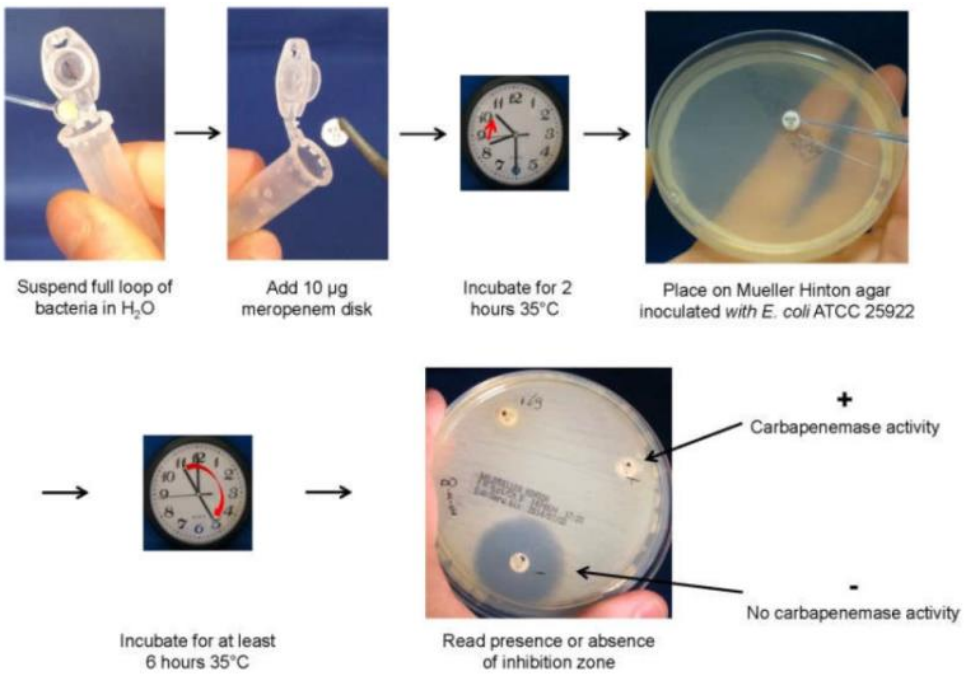


Figure 13 : Technique de CIM (Carbapenem inactivation method) (extrait de van der Zwaluw K *et al*, 2015)

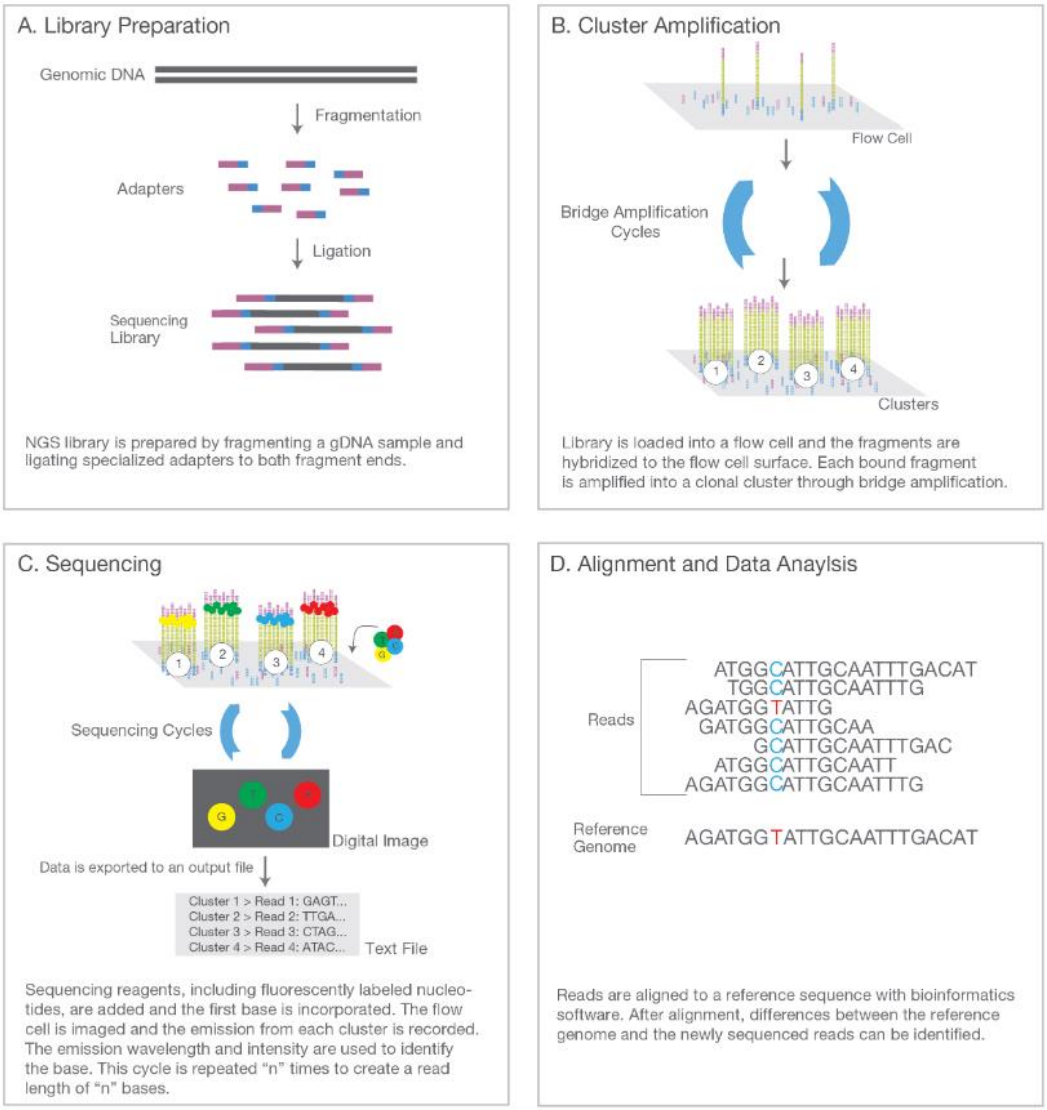


Figure 14: Principe du séquençage de nouvelle génération (NGS) Illumina (extrait de https://emea.illumina.com)

3. Marqueurs non validés

Sept couples d'amorces (Tableau 9) n'ont produit aucune réaction d'amplification avec les contrôles positifs. La présence de nucléotides dégénérés dans le dessin des amorces, des séquences ciblées riches en suite de même nucléotide, riches en GC, ou un design effectué sur une région peu conservée peuvent être responsables de l'absence d'amplification. Pour ces amorces un nouveau dessin est à envisager en tenant compte de ces contraintes.

Pour les marqueurs restants (Tableau 10) qui n'ont pas pu être validés en raison de l'absence de contrôles positifs disponibles, les témoins positifs correspondants ont été reçus tardivement et seront analysés dans la suite du stage.

4. Marqueurs d'Antibiorésistance détectés dans la collection B3PA

La présence du gène *qnrA* (résistance aux quinolones) a été détectée au sein de bactéries du genre *Shewanella*. Ceci est cohérent car ce gène a été décrit comme présent de manière naturelle au niveau du chromosome des bactéries *Shewanella algae* qui constituent le réservoir naturel du gène *qnrA* (Poirel *et al*, 2005 ; Jacoby *et al*, 2014). Neuf isolats de *Shewanella* sur dix de la collection B3PA ont été trouvés positifs pour le gène *qnrA*. Ces bactéries comprennent notamment deux espèces autres que *Shewanella algae* : *Shewanella haliotis*, *Shewanella indica* ainsi que quatre *Shewanella* dont l'espèce n'a pas pu être identifiée. Ces espèces pourraient, comme *Shewanella algae*, constituer une espèce réservoir pour le gène *qnrA*. Ces isolats pourraient également avoir reçu un plasmide porteur du gène *qnrA* mobilisé à partir de *Shewanella algae*. La présence du gène *qnrA* n'a pas été détectée au sein de l'isolat appartenant à l'espèce *Shewanella putrefaciens*. Cette espèce ne serait donc pas un réservoir pour le gène *qnrA*.

La présence du gène *fosA2* (n° accession : EU487198) de résistance à la fosfomycine détectée chez *Enterobacter cloacae* semble cohérente avec les données présentes dans la littérature. En effet, la présence de ce gène sur le chromosome de *Enterobacter clocae* a déjà été décrite (Ito *et al*, 2017 ; Huang et al, 2017).

Le gène fosA4 (AB908992) a été détecté dans une bactérie du genre *Morganella.* Les bactéries du genre *Morganella* présenteraient une résistance intrinsèque à la fosfomycine (Ito *et al*, 2017). Bien que des homologues du gène *fosA* soient présents dans plus de 90% des génomes séquencés de *Morganella morganii* (Ito *et al*, 20017), le variant *fosA4* n'a à notre connaissance jamais été décrit au sein de ce genre bactérien. En effet, cette association n'a pas été trouvée dans la littérature ni dans la base de données NCBI (Figure 15). D'autre part, le support génétique (chromosome ou plasmide) des gènes *fosA* identifiés dans les génomes de *Morganella* reste largement inconnu. Cependant, le gène *fosA4* est, chez *E. coli* et *S. enterica*, retrouvé exclusivement sur un support plasmidique (Ito *et al,* 2017).

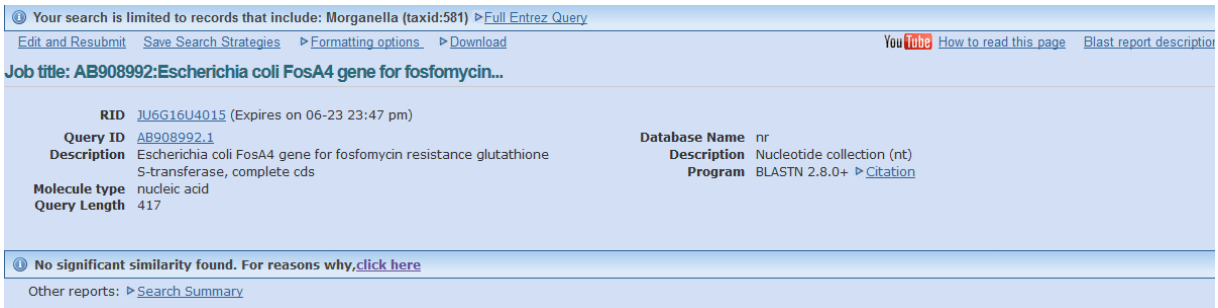


Figure 15: Résultat du blast de la séquence FosA4 chez *Morganella*.

Les gènes *bla*$_{NDM}$ et *bla*$_{CTX-M-2}$(variants 74 et 75) ont été détectés chez *Pseudomonas helmanticensis, Morganella morganii, Morganella, Shewanella algae et Pseudomonas helmanticensis*.

Pour le gène *bla*$_{CTX-M-2\ (}$variants 74 et 75$_{)}$, la Tm observée pour la souche 308-PECF1 : *Pseudomonas helmanticensis* diffère légèrement de la Tm observée pour le contrôle positif (Δ +0.72°C) tout en restant dans l'écart des valeurs attendues. Cette différence peut provenir d'une variation de la séquence de l'amplicon. En effet, le seul contrôle positif dont nous disposions pour ces amorces correspond au variant *bla*$_{CTX-M-74}$. (n° accession : GQ149243). Les séquences détectées pourraient alors correspondre au variant *bla*$_{CTX-M-75}$ (n° d'accession GQ149244) ce qui expliquerait la légère différence de Tm observée. Ce variant CTX-M-75 a déjà été isolé chez *Providencia stuartii* JF29 en 2002 et diffère de CTX-M-2 par une substitution d'un aminoacide (Pro à Ser à la position 18) (Minarini *et al*, 2009).

Il en est de même pour le marqueur *bla*$_{NDM}$, pour lequel les Tm observées pour les isolats diffèrent légèrement de la Tm observée pour le contrôle positif (Δ. +/- 0.89). Le seul contrôle positif utilisé pour ces amorces était positif pour le variant NDM-1. Les souches de la collection B3PA pour lesquelles le gène a été détecté portent probablement l'un des 17 autres variants répertoriés du gène *bla*$_{NDM}$ et mériteraient d'être caractérisées plus finement. Ce gène fait partie de la famille des bêta-lactamases qui s'étend partout dans le monde (Normann et Poirel, 2014) (Figure 16).

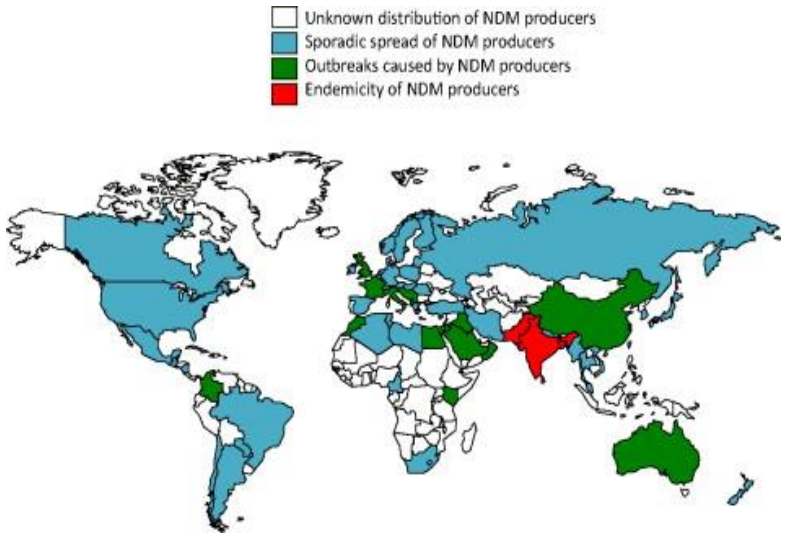


Figure 16: Expansion du gène *bla*$_{NDM}$ à travers le monde (Extrait de Normann et Poirel, 2014)

Le marqueur plasmidique IncL/M a été détecté au sein de bactéries *Escherichia coli*. Des plasmides du groupe IncL/M associés à de nombreux gènes de résistance (*aac (6')-Ib-cr*, $bla_{\text{CTX-M-1-3-15-42}}$, $bla_{\text{TEM-3-10}}$, $bla_{\text{SHV-5}}$, $bla_{\text{IMP-4-8}}$, *armA*, *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB4* et *qnrS1*) ont été décrits chez *Escherichia coli* (Carattoli, 2009). A l'exception des amorces ciblant les gènes *qnrA* et *qnrB*, les amorces ciblant ces différents gènes doivent encore être validées. A l'issue de la validation de l'ensemble des couples d'amorces il sera alors intéressant de vérifier si les souches possédant le marqueur IncL/M possèdent également l'un des gènes de résistance cités ci-dessus. Cela permettrait d'émettre l'hypothèse que les gènes de résistance détectés chez certaines bactéries de la collection B3PA pourraient être situés sur un plasmide.

5. Limites de l'outil de détection utilisé

La limite principale de l'outil de détection développé ici tient au principe même de la méthode. En effet, il est nécessaire de disposer de séquences de référence afin de dessiner des amorces de PCR. Ainsi seuls les gènes et leurs variants déjà décrits peuvent être détectés. Cette approche ne permet donc pas de découvrir de nouveaux gènes ou variants de gènes inconnus. De même, l'absence de détection d'un gène n'est ici pas synonyme d'absence du gène, celui-ci pouvant-être présent mais sous la forme d'un variant non détecté par les amorces utilisées. C'est toutefois un outil ouvert auquel on peut rapidement ajouter (ou supprimer) de nouvelles séquences en fonction de l'évolution des connaissances. Par ailleurs, la méthode développée doit être considérée comme un outil de screening apportant des informations sur le contenu en gènes de résistance de façon non exhaustive. Les souches montrant des signaux positifs devront être étudiées plus finement au niveau génomique par whole genome sequencing et au niveau phénotypique permettant d'évaluer l'expression du gène identifié.

CONCLUSION

La qPCR haut débit (Fluidigm) présente certains avantages du fait de sa rapidité et de son faible coût par exemple par rapport aux techniques de séquençage NGS. Cet outil a permis la détection de marqueurs de résistance.

L'outil a, à ce jour, été validé pour détecter 40 gènes de résistance des bactéries Gram négatives. Les travaux de validation se poursuivent actuellement. La spécificité diagnostique des 10 couples d'amorces pour lesquels nous ne disposions pas de contrôles positifs va être évaluée très prochainement, les contrôles positifs correspondants ayant été obtenus. Par ailleurs, dans les semaines qui viennent, les résultats inattendus (Tableau 6) obtenus pour les contrôles positifs de la collection Anses – MATBR seront confrontés aux données de résistance phénotypique disponibles dans les bases de données du laboratoire. En l'absence de données phénotypiques, la présence des gènes détectés pourra être validée par PCR et/ou séquençage (des produits de PCR ou du génome total).

Afin d'améliorer la spécificité de détection, il pourra être intéressant, dans le futur, de développer des sondes TaqMan.

L'analyse des 159 échantillons de la collection B3PA avec les 40 marqueurs actuellement validés a permis d'identifier 18 échantillons positifs pour cinq marqueurs génétiques. Parmi les marqueurs génétiques identifiés, un correspond à un marqueur de plasmide. Parmi les quatre marqueurs correspondant à des gènes de résistance, trois sont probablement associés à des phénomènes de résistance intrinsèques portés au niveau du chromosome bactérien. Cette très faible prévalence de gènes de résistance au sein de la collection étudiée s'explique par l'absence de sélection initiale lors de l'isolement des souches. Cependant, l'identification des gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ et bla_{NDM}, après confirmation de leur présence sur des éléments génétiques mobiles, indique que les produits de la mer peuvent être des vecteurs potentiels de dissémination de carbapénémases.

D'autre part, à la suite de cette étude, il serait intéressant de continuer de développer les marqueurs sur les éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, intégrons,…). Des marqueurs pour les résistances spécifiques aux bactéries à Gram + seront également à envisager. En raison de leur présence sur des éléments génétiques mobiles, on observe fréquemment un phénomène de co-sélection entre les gènes liés à la résistance aux antibiotiques et les gènes de résistance aux métaux lourd et aux biocides. L'ajout de marqueurs de détection de ces gènes sur nos outils nous permettrait d'approfondir l'étude de l'antibiorésistance à l'échelle environnementale.

Ce système développé durant mon stage représente un outil d'investigation épidémiologique innovant pour la surveillance des gènes de résistance aux antibiotiques ; il permet de tester rapidement et à faible coût un nombre important d'échantillons vis-à-vis d'un nombre important de gènes. Cet outil de screening pourra ainsi être utilisé afin de suivre l'introduction de gènes résistance aux antibiotiques dans la chaîne alimentaire sur le territoire français et ouvre des perspectives diagnostiques prometteuses.

BIBLIOGRAPHIE

Amudhan MS, Sekar U, Kamalanthan A, Balaraman S (2012). *bla_{IMP}* and *bla_{VIM}* mediated carbapenem resistance in Pseudomonas and Acinetobacter species in India. *J. Infect. Dev. Ctries*. 6 (11): 757-762.

Antunes NT, Fisher JF (2014). Acquired D β-lactamases. *Antibiotics (Basel)*. 3(3): 398-434.

Ahmed AM, Maruyama A, Khalifa HO, Shimamoto T, and Tadashi T (2015). Seafood as a Reservoir of Gram-negative Bacteria Carrying Integrons and Antimicrobial Resistance Genes in Japan. *Biomed. Environ. Sci.* 28(12): 924-927.

Barlow M et Hall BG (2002). Origin and Evolution of the AmpC β-lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(5): 1190-1198.

Baron S, Larvor E, Chevalier S, Jouy E, Kempf I, Granier SA et Lesne J (2017). Antimicrobial Susceptibility among Urban Wastewater and Wild Shellfish Isolates of Non-O1/Non-O139 Vibrio cholerae from La Rance Estuary (Brittany, France). *Frontiers in Microbiology*. 8: 1637.

Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13(1): 42–51.

Briet A, Helsens N, Delannoy S, Debuiche S, Brisabois A, Midelet G, Granier SA. (2018) NDM-1-producing Vibrio parahaemolyticus isolated from imported seafood. *J. Antimicrob. Chemother*

Buelow E, Bayjanov JR, Majoor E, Willems RJ, Bonten MJ, Schmitt H, van Schaik W. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system (2018). *FEMS Microbiol Ecol.* 94(7).

Buelow E, Bello González TDJ, Fuentes S, de Steenhuijsen Piters WAA, Lahti L, Bayjanov JR, Majoor EAM, Braat JC, van Mourik MSM, Oostdijk EAN, Willems RJL, Bonten MJM, van Passel MWJ, Smidt H, van Schaik W. (2017). Comparative gut microbiota and resistome profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. *Microbiome.* 5(1):88.

Butaye P, Argudín MA, Threlfall J (2015). Introduction to Antimicrobial-Resistant Foodborne Pathogens. In: Antimicrobial Resistance and Food Safety Methods and Techniques (ed), First, Chapter: Introduction to Antimicrobial-Resistant Foodborne Pathogens. *Elservier press.* pp: 1-17.

Cabello FC (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture : A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol*. 8(7) :1137–44.

Cabello FC, Tomova A, Ivanova L, Godfrey HP. (2017). Aquaculture and *mcr* Colistin Resistance Determinants. *MBio.* 8 (5) e01229-17.

Carratoli A (2009) Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 53(6): 2227-38.

Davodian E, Sadeghifard N, Ghasemian A, Noorbakhsh S. (2016). Presence of blaPER-1 and blaVEB-1 beta-lactamase genes among isolates of Pseudomonas aeruginosa from South West of Iran. *J. Epidemiol. Glob. Health*. 6 (3) : 211-213.

Dax S.L. Antibacterial Chemotherapeutic Agents, 2012, Springer ; 1997 edition.

Done HY, Venkatesan AK, Halden RU. (2015). Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? *AAPS J.* 17(3): 513-24.

Drancourt M. Antiquity of antibiotic resistance. (2016). *Journal des Anti-infectieux*.18 (2) 40-44.

Evans BA, Amyes SG (2014). OXA β-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev*.27(2) :241-63.

Faure S (2010) Transfert d'un gène de résistance aux bêta-lactamines blaCTX-M-9 entre Salmonella et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : influence d'un traitement antibiotique. Thèse de doctorat de l'Université de Rennes.

FAO. (2016) La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous. Rome. 224 pages.

Floss HG and Yu TW (2005). Rifamycins Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chem. Rev***.** 105: 621-632.

Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES (2008). Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*.52(5) :1843-5.

Fontes LC, Neves PR, Oliveira S, Silva KC, Hachich EM, Sato MI, and Lincopan N (2011) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* Coproducing Metallo-β-Lactamase SPM-1 and 16S rRNA Methylase RmtD1 in an Urban River. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 55(6): 3063–64.

Garneau-Tsodikova S, Labby KJ (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside anitibiotics : overview and perspectives. *Med. Chem. Commun*. 7, 11-27.

Gillings MR (2014) Integrons : past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev*. 78(2):257-77.

Gniadkowski M (2008) Evolution of extended-spectrum b-lactamases by mutation.*Clin Microbiol. Infect.* 14 (1): 11–32.

Guo X, Dillon BB, Ginn AN, Wiklendt AM, Partridge SR, Iredell JR (2014). Simple multiplex real-time PCR for rapid detection of common 16S rRNA methyltransferase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 80(1):29-31.

Hammerl JA, Jäckel C, Bortolaia V, Schwartz K, Bier N, Hendriksen RS, Guerra B, Strauch E (2017). Carbapenemase VCC-1–Producing *Vibrio cholerae* in Coastal Waters of Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 23(10) :1735-37.

Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Woodford N, Gonzalez-Zorn B; Association of the novel aminoglycoside resistance

determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(7) : 1543–1550.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Biotechnology (N Y).* 10(4): 413-7.

Huang L, Hu YY, Zhang R (2017) Prevalence of fosfomycin resistance and plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Zhejiang, China. *J Med Microbiol.* 66(9) :1332-1334.

Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, Callaghan JD, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RMQ, Sluis-Cremer N, Doi Y (2017). Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal *fosA* Gene. *MBio*. 8(4).

Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr.* 2 (5). 1-24.

Kamolvit W, Higgins PG, Paterson DL, Seifert Harald (2014). Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 69 (4) : 959-963.

Kayama S, Yano R, Yamasaki K, Fukuda C, Nishimura K, Miyamoto H, Ohge H, Sugai M (2018). Rapid identification of carbapenemase-type bla_{GES} and ESBL-type bla_{GES} using multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 48: 117- 119.

Khan AA, Cheng CM, Van KT, West CS, Nawaz MS and Khan SA (2006). Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes in Salmonella enterica serovars Oslo and Bareily from imported seafood. *J. Antimicrob. Chemother*. 58(6) 1308-10.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, and Rossolini GM (1999). Cloning and Characterization of bla_{VIM}, a New Integron-Borne Metallo-β-Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7): 1584–90.

Lascols C, Podglajen I, Verdet C, Gautier V, Gutmann L, Soussy CJ, Collatz E, Cambau E (2008). A plasmide-Borne Shewanella algae Gene, *qnrA3* and Its Possible Transfer In Vivo between Kluyvera ascorbate and Klebsiella pneumoniae. J.Bacteriol. 190(15):5217-23.

Lee Y, Kim BS, Chun J, Yong JH, Lee YS, Yoo JS, Yong D, Hong SG, D'Souza R, Thomson KS, Lee K, Chong Y (2014). Clonality and Resistome Analysis of KPC-Producing Klebsiella pneumoniae Strain Isolated in Korea Using Whole Genome Sequencing. *Biomed. Res. Int.* 2014(ID 352862):1-6.

Liu L, Feng Y, McNally A, Zong Z (2018). bla_{NDM-21}, a new variant of bla_{NDM} in an Escherichia coli clinical isolate carrying $bla_{CTX-M-55}$ and *rmtB*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. dky226.

Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B.(2006). The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(7):2500-5.

Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(5):1691-6.

Marti E, Variatza E, Balcazae JL (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*. 22(1): 36-41.

Muziasari WI, Pitkänen LK, Sørum H, Stedtfeld RD, Tiedje JM, Virta M (2017). Corrigendum: The Resistome of Farmed Fish Feces Contributes to the Enrichment of Antibiotic Resistance Genes in Sediments below Baltic Sea Fish Farms. *Front Microbiol.* 8:1491.

Papp-Wallace KM., Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011). Carbapenems : Past, Present, and Future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (11) :4943-60.

Paul D, Dhar D, Maurya AP, Mishra S, Sharma GD, Chakravarty A, Bhattacharjee A (2016). Occurrence of co-existing bla_{VIM-2} and bla_{NDM-1} in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Ann. Clin. Microbiol Antimicrob*. 15(2): 15-31.

Pawlowski AC, Stogios PJ, Koteva K, Skarina T, Evdokimova E, Savchenko A, Wright GD (2018) The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nat Commun*. 9(1):112.

Poirel L, Naas T, et Nordmann P. (2010). Diversity, Epidemiology, and Genetics of D β-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 54(1): 24-38.

Poirel L, Potron A, Nordmann P (2012). OXA-48-like carbapenemases : The phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother*. 67(7): 1597-606.

Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P (2005) Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(8): 3523-5.

Popowska M, Rzeczycka M, Miernik A, Krawczyk-Balska A, Walsh F, Duffy B (2017). Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(3):1434-43.

Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.*447 : 345-360.

Roshanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U (2014). Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PLoS One*. 9(7) :e100956.

Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, Hay SI, Jiwakanon J, Kakkar M, Kariuki S, Laxminarayan R, Lubroth J, Magnusson U, Thi Ngoc P, Van Boeckel TP, and Woolhouse ME (2016) Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 110(7): 377-380.

Ruzauskas M, Klimiene I, Armalyte J, Bartkiene E, Siugzdiniene R, Skerniskyte J, Krasauskas R, Suziedeliene E (2018). Composition and antimicrobial resistance profile of Gram negative microbiota prevalent in aquacultured fish. *J. Food Safety*. 38(3): 1-10.

Santos L, Ramos F (2016). Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes : A review. *Trends Food Sci. Technol*. 52: 16–30.

Saini A, Bansal R (2012) Insights on the structural characteristics of NDM-1: The journey so far. *Advances in Biological Chemistry*. 2, 323-334.

Tijet N, Andres P, Chung C, Lucero C, WHONET-Argentina Group , Low DE, Galas M, Corso A, Petroni A, Melano RG (2011). *rmtD2*, a New Allele of a 16S rRNA Methylase Gene, Has Been Present in *Enterobacteriaceae* Isolates from Argentina for More than a Decade. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2): 904–909.

Van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM (2015). The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One. 10(3): e0123690.

Watts JEM, Schreier HJ, Lanska L, Halle MS (2017). The rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture : Sources, Sinks and Solutions : A review. *Mar. Drugs*. 15(6):158.

Walther-Rasmussen J, HØiby N (2006). OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob Chemother.* 57(3): 373-83.

Webb HE, Angulo FJ, Granier SA, Scott HM, Loneragan GH (2017). Illustrative examples of probable transfer of resistance determinants from food animals to humans : Streptothricins, glycopeptides, and colistin. *F1000Research*. 6:1805.

WHO. (2016). WHO list of Critically Important Antimicrobials for Human and Medicine 5th revision: 1-48.

WHO. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 1-7.

Wong, ML et Medrano, JF. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 39(1):75-85.

Zhao WH, Hu ZQ (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol*. 39(1): 79-101.

Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110(9):3435-40.

Yamane K., Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K., Kimura k, Kai k, Ishikawa S, Ozawa Y, Konda T, Arakawa, Y (2007). 16S rRNA Methylase–producing, Gram-Negative Pathogens, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(4), 642–646.

Yan JJ, Wu JJ, Ko WH, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, Lu YJ, Li JD (2004) Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from two Taiwanese hospitals, J. Antimicrob. Chemother. 54 (6) 1007–1012.

Yang TY, Lu PL, Tseng SP (2017). Update on fosfomycin-modified genes in *Enterobacteriaceae*. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. XX : 1-13.

WEBOGRAPHIE

https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf, consulté le 28/03/2018.

https://www.researchgate.net/profile/Cedric_Woudstra/publication/305687278_ANSES%27s_IdentyPath_a_French_platform_for_the_identification_and_typing_of_pathogens_based_on_Next_Generation_Sequencing_and_high-_and_mid-throughput_qPCR/links/5799b90a08aeb0ffcd0b0c8a/ANSESs-IdentyPath-a-French-platform-for-the-identification-and-typing-of-pathogens-based-on-Next-Generation-Sequencing-and-high-and-mid-throughput-qPCR.pdf; consulté le 26/01/2018

http://www.civ-viande.org/2017/08/03/rapport-de-lue-preuves-supplementaires-lien-entre-utilisation-dantibiotiques-resistance-aux-antibiotiques-efsa/ Consulté le 10/04/2018

https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/170222 Consulté le 11/04/2018

https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/180227 Consulté le 12 Avril 2018

ANNEXE 1 : Organigrammes de l'ANSES et du LSAl



http://intranet.anses.fr/agence/Laboratoire-de-la-securite-des-aliments/Organisation%20du%20laboratoire/Documents/LSAI-BSMjanvier2018.pdf

anses
agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail
Connaître, évaluer, protéger

ORGANIGRAMME FONCTIONNEL
Laboratoire de sécurité des aliments, site de Maisons-Alfort et site de Boulogne-sur Mer

Laurent LALOUX, *Directeur*
Anne BRISABOIS, *Directrice adjointe*

Evelyne TOUDIC, assistante de direction

Bertrand LOMBARD, chef de la mission « coordination de la référence » et responsable des LRUE
Adrien ASSERE, responsable adjoint des LRUE
Renaud LAILLER, chef de projet surveillance

Nathalie BONGOUA, chef du SAG

Sylvie RUDELLE, chef du SATAL

Christine DELPONT, correspondant maîtrise des risques

Sylviane DRAGACCI, chef de la mission « soutien et valorisation de la recherche »

Cécile CECCONI, chef de mission « Qualité »

Sébastien ALLIX, chef de mission « sécurité et sureté biologiques »

Sébastien ALLIX, chef de service « Animalerie »

Michel-Yves MISTOU, chef de département Contaminants microbiologiques des aliments

- **Mission Génome Analyse Modélisation et Risques** — Michel-Yves MISTOU, *Chef de mission*
- **Unité Laboratoire central des services vétérinaires** — Agnès CHAMOIN, *Chef d'unité*
- **Unité Staphylocoque, Bacillus, clostridies, Lait** — Jacques-Antoine HENNEKINNE, *Chef d'unité*
- **Mission Antibiorésistance** — Sophie GRANIER, *Chef de mission*
- **Unité Virus entériques** — Sylvie PERELLE, *Chef d'unité*
- **Unité Listeria et *Salmonella*** — Jean-Charles LEBLANC, *Chef d'unité*
- **Plateforme IdentyPath** — Patrick FACH, *Responsable*

Thierry GUERIN, chef de département Contaminants chimiques des aliments

- **Unité Pesticides et biotoxines marines** — Gwenaëlle LAVISON-BOMPARD, *Chef d'unité*
- **Unité Eléments traces métalliques et minéraux** — Petru JITARU, *Chef d'unité*

Anne BRISABOIS, chef de département Produits de la pêche et de l'aquaculture
Guillaume DUFLOS, *adjoint*

- **Unité bactériologie et parasitologie des produits de la pêche et de l'aquaculture** — Graziella BOURDIN, *Chef d'unité*
- Gaëlle Hannequin, *Référent qualité Amélioration continue*
  Odile Bourgau, *Référent Qualité Ressources*
- **Unité Physico-chimie des produits de la pêche et de l'aquaculture** — Guillaume DUFLOS, *Chef d'unité*
- **Unité Biochimie des produits aquatiques** — Thierry GRARD, *Chef d'unité*
- **Sophie ZIELONKA**, *Chef du SAF*

Fonctions transverses sur Maisons-Alfort

Animateur formation : **Claude CHAFEY** *Correspondant communication* : **Adrien ASSERE**
Assistant de prévention : **Christine DELPONT**

Anses LSAI	ORGANIGRAMME LSAI LSA-NO-0002 (LSA-NO-0001 – Note d'organisation LSAI)	Révision	10	1/1
		Date	03/10/2017	

ANNEXE 2 : Collection B3PA

Catégorie d'Aliment	Souche	Genre	Espèce
Cabillaud	304-PECF1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas tolaasii*
Cabillaud	304-PECF2	*Pseudomonas*	ND
Cabillaud	304-OUESBL1	*Pseudomonas*	ND
Cabillaud	305-PEAL1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas brenneri*
Cabillaud	305-OUCF2	*Pseudomonas*	*Pseudomonas weihenstephanensis*
Cabillaud	306-PECH6	*Pseudomonas*	*Pseudomonas brenneri*
Cabillaud	308-PECF1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas helmanticensis*
Cabillaud	310-PECF3	*Pseudomonas*	ND
Cabillaud	332-PECF1	*Serratia*	ND
Cabillaud	304-PEGS1	*Acinetobacter*	ND
Cabillaud	304-PEGS3	*Acinetobacter*	*Acinetobacter puyangensis*
Cabillaud	304-OUTC1	*Acinetobacter*	*Acinetobacter puyangensis*
Cabillaud	304-OUGS1	*Acinetobacter*	*Acinetobacter guillouiae*
Cabillaud	305-PECF2	*Acinetobacter*	*Acinetobacter puyangensis*
Cabillaud	305-PEGS1	*Acinetobacter*	ND
Cabillaud	305-OUCF3	*Acinetobacter*	*Acinetobacter puyangensis*
Cabillaud	309-OUGS1	*Acinetobacter*	ND
Cabillaud	310-PECF1	*Acinetobacter*	ND
Cabillaud	310-OUTC1	*Acinetobacter*	*Acinetobacter puyangensis*
Cabillaud	310-OUCH3	*Acinetobacter*	ND
Cabillaud	310-OUGS1	*Acinetobacter*	ND
Cabillaud	331-PECF3	*Acinetobacter*	*Acinetobacter puyangensis*
Cabillaud	331-PEGS3	*Acinetobacter*	ND
Cabillaud	1-PESA1	*Klebsiella*	ND
Coquillages	105-CPE2	*Proteus*	ND
Coquillages	105-CHTB1	*Escherichia*	*Escherichia coli*
Coquillages	106-CHCF2	*Pseudomonas*	ND
Coquillages	107-CHCARB1	*Pseudomonas*	ND
Coquillages	107-CHESBL1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas mosselii*
Coquillages	107-CHESBL2	*Pseudomonas*	ND
Coquillages	107-CHPE1	*Providencia*	ND
Coquillages	107-CHPE2	*Pseudomonas*	ND
Coquillages	107-CHTC2	*Providencia*	*Providencia rettgeri*
Coquillages	108-CHCF1	*Providencia*	ND
Coquillages	108-CHPE1	*Providencia*	ND
Coquillages	108-CHPE3	*Providencia*	ND
Coquillages	108-CHSA1	*Providencia*	*Povidencia rettgeri*
Coquillages	294-CHCF1	*Proteus*	*Proteus vulgaris*
Coquillages	294-CHCF2	*Proteus*	ND
Coquillages	294-CHGS1	*Proteus*	ND
Coquillages	294-CHPE3	*Proteus*	ND
Coquillages	294-CHPE4	*Proteus*	ND

Coquillages	294-CHTC1	*Proteus*	ND
Coquillages	295-CHGS1	*Proteus*	*Proteus terrae*
Coquillages	295-CHSA1	*Proteus*	ND
Coquillages	295-CHSA2	*Proteus*	ND
Coquillages	295-CHTC3	*Proteus*	ND
Coquillages	295-CHTC5	*Proteus*	ND
Coquillages	295-CHCF1	*Proteus*	ND
Coquillages	295-CHCF2	*Proteus*	ND
Coquillages	296-CHESBL1	*Pseudomonas*	ND
Coquillages	297-CHGS1	*Morganella*	ND
Coquillages	315-CHSA1	*Morganella*	*Morganella morganii*
Coquillages	316-CHCF1	*Morganella*	ND
Coquillages	316-CHCF2	*Proteus*	*Poteus terrae*
Coquillages	316-CHCH1	*Shewanella*	*Shewanella indica*
Coquillages	316-CHCH3	*Shewanella*	ND
Coquillages	316-CHGS2	*Morganella*	ND
Coquillages	316-CHPE1/1	*Proteus*	ND
Coquillages	316-CHPE2	*Morganella*	ND
Coquillages	316-CHSA1	*Morganella*	ND
Coquillages	316-CHTC4	*Morganella*	ND
Coquillages	317-CHPE1	*Morganella*	ND
Coquillages	317-CHSA2	*Morganella*	*Morganella morganii*
Coquillages	317-CHTC2	*Shewanella*	*Shewanella algae*
Coquillages	318-CHCF1	*Morganella*	*Morganella morganii*
Coquillages	318-CHPE2	*Morganella*	ND
Coquillages	318-CHSA1	*Morganella*	*Morganella morganii*
Coquillages	319-CHCF1	*Morganella*	ND
Coquillages	319-CHGS3	*Shewanella*	*Shewanella haliotis*
Coquillages	319-CHGS5	*Morganella*	ND
Coquillages	319-CHTC3	*Morganella*	ND
Coquillages	319-CHSA1	*Morganella*	*Morganella morganii*
Coquillages	320-CHESBL1	*Serratia*	ND
Coquillages	320-CHGS2	*Shewanella*	ND
Coquillages	320-CHSA1	*Proteus*	*Proteus hauseri*
Coquillages	320-CHTC1	*Shewanella*	*Shewanella algae*
Coquillages	320-CHTC7	*Serratia*	ND
Coquillages	321-CHTC1	*Shewanella*	ND
Coquillages	322-CHGS4	*Shewanella*	ND
Coquillages	333-CHCF1	*Serratia*	*Serratia quinivorans*
Coquillages	333-CHPE2	*Serratia*	ND
Coquillages	335-CHGS3	*Serratia*	*Serratia glossinae*
Coquillages	335-CHPE2	*Serratia*	ND
Coquillages	335-CHSA1	*Serratia*	*Serratia fonticola*
Coquillages	344-CHCF2	*Pseudomonas*	ND
Coquillages	105-CHTB2	*Escherichia*	*Escherichia coli*
Coquillages	108-CHCF1	*Providencia*	ND

Coquillages	108-CHSA1	*Providencia*	*Providencia rettgeri*
Coquillages	108-CHPE1	*Providencia*	ND
Coquillages	108-CHPE3	*Providencia*	ND
Coquillages	296-CHESBL1	*Pseudomonas*	ND
Coquillages	352CH-GS1	*Acinetobacter*	ND
Coquillages	352CH-GS2	*Acinetobacter*	ND
Coquillages	104-CH-GS1	*Klebsiella*	ND
Crevettes	5-CCCF1	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	5-CCCF2	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	44-CCSA1	*Enterobacter*	*Enterobacter cloacae*
Crevettes	58-CCGS1	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	89-CCESBL1	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	90-CCSA1	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	90-CCCF1	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	90-CCARB1	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	90-CCOXA1	*Pseudomonas*	ND
Crevettes	90-CCCH1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	119-PEGS1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas brenneri*
Poissons plats	145-OUCF2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	145-PESA2	*Morganella*	*Morganella morganii*
Poissons plats	146-PEESBL1	*Serratia*	*Serratia fonticola*
Poissons plats	146-OUCF2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	146-OUGS1	*Morganella*	*Morganella morganii*
Poissons plats	152-PECARB1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	152-PECARB2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	152-OUCF1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	152-OUCF3	*Proteus*	*Proteus vulgaris*
Poissons plats	152-OUTC4	*Proteus*	*Proteus vulgaris*
Poissons plats	153-PEOXA1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	153-PEGS1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	153-PEGS2	*Proteus*	ND
Poissons plats	153-OUCF1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	153-OUCF2	*Proteus*	*Proteus vulgaris*
Poissons plats	153-PECF2	*Proteus*	*Proteus vulgaris*
Poissons plats	250-PETB1	*Enterobacter*	*Enterobacter cloacae*
Poissons plats	250-PECF1	*Proteus*	*Proteus terrae*
Poissons plats	250-PECF2	*Proteus*	ND
Poissons plats	250-PETC1	*Providencia*	*Providencia vermicola*
Poissons plats	250-OUPE1	*Proteus*	*Proteus hauseri*
Poissons plats	250-OUCF2	*Proteus*	ND
Poissons plats	251-PESA1	*Escherichia*	*Escherichia coli*
Poissons plats	252-PECF1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	251-PECF2	*Pseudomonas*	*Pseudomonas cichorii*
Poissons plats	252-PEOXA1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	251-PESA2	*Escherichia*	*Escherichia coli*
Poissons plats	252-OUCF1	*Proteus*	*Proteus vulgaris*

Poissons plats	252-OUTC1	*Shewanella*	*Shewanella haliotis*
Poissons plats	253-PECF1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas fluorescens*
Poissons plats	251-PETB1	*Escherichia*	*Escherichia coli*
Poissons plats	253-OUSA2	*Providencia*	*Providencia rettgeri*
Poissons plats	253-OUCARB1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	253-OUGS2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	277-PEGS1	*Proteus*	ND
Poissons plats	277-PEGS2	*Proteus*	ND
Poissons plats	277-OUCF1	*Shewanella*	*Shewanella putrefaciens*
Poissons plats	278-OUESBL2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	278-OUCARB1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	279-OUTB1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas stutzeri*
Poissons plats	279-OUGS1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas mendocina*
Poissons plats	297-OUGS2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	280-OUGS1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	287-PECF2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	287-OUCF3	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	289-PECF1	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	289-PECF2	*Proteus*	*Proteus vulgaris*
Poissons plats	289-OUGS1	*Pseudomonas*	*Pseudomonas brenneri*
Poissons plats	290-PESA1	*Proteus*	ND
Poissons plats	290-PEPE2	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	290-PECF2	*Proteus*	*Proteus vulgaris*
Poissons plats	291-OUGS3	*Pseudomonas*	ND
Poissons plats	250-OUSA1	*Klebsiella*	*Klebsiella oxytoca*

RESUME

L'antibiorésistance bactérienne est actuellement un enjeu majeur de santé publique. Il existe des systèmes de surveillance concernant les animaux terrestres : bovins, porcins et volaille. Aucun système de surveillance n'est cependant actuellement mis en place pour les produits de la mer alors que la consommation des produits de la mer constitue une part importante de la consommation française (34,5 kg/habitant/an) et mondiale (20 kg/habitant/an). Cette étude propose le développement d'une puce de qPCR très haut débit (Fluidigm) afin de détecter les gènes d'antibiorésistance d'importance critique en santé humaine. L'étude a permis de valider 40 marqueurs de gènes de résistance pour les bactéries Gram négatives. Nous avons ainsi détecté quatre gènes d'antibiorésistance et un gène signature de plasmide dans une collection de 159 souches Gram négatives isolées des produits de la mer principalement consommés en France. Cet outil pourra être utilisé afin de suivre l'introduction de gènes de résistance aux antibiotiques dans la chaîne alimentaire.

ABSTRACT

Nowadays, bacterial antimicrobial resistance constitutes a challenge in public health. In the European Union surveillance systems monitor antimicrobial resistance in terrestrial food animals: bovine, pigs and poultry. No monitoring system currently exists for seafood even if the consumption of seafood is important (34.5 kg/inh/year consumed in France and 20 kg/inh/year worldwide). In this study we developed a high-throughput qPCR chip to detect antimicrobial resistance genes with a critical importance in human health. We validated qPCR tests targeting 40 antimicrobial resistance genes for Gram-negative bacteria. This method allowed us to detect four antimicrobial resistance genes and one plasmid-associated gene in a collection of 159 Gram-negative bacterial strains isolated from seafood products. This tool will be useful to follow the introduction and dissemination of antimicrobial resistance genes in the food chain.