

Emergence en France des méthylases bactériennes associées à la résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter* sp.

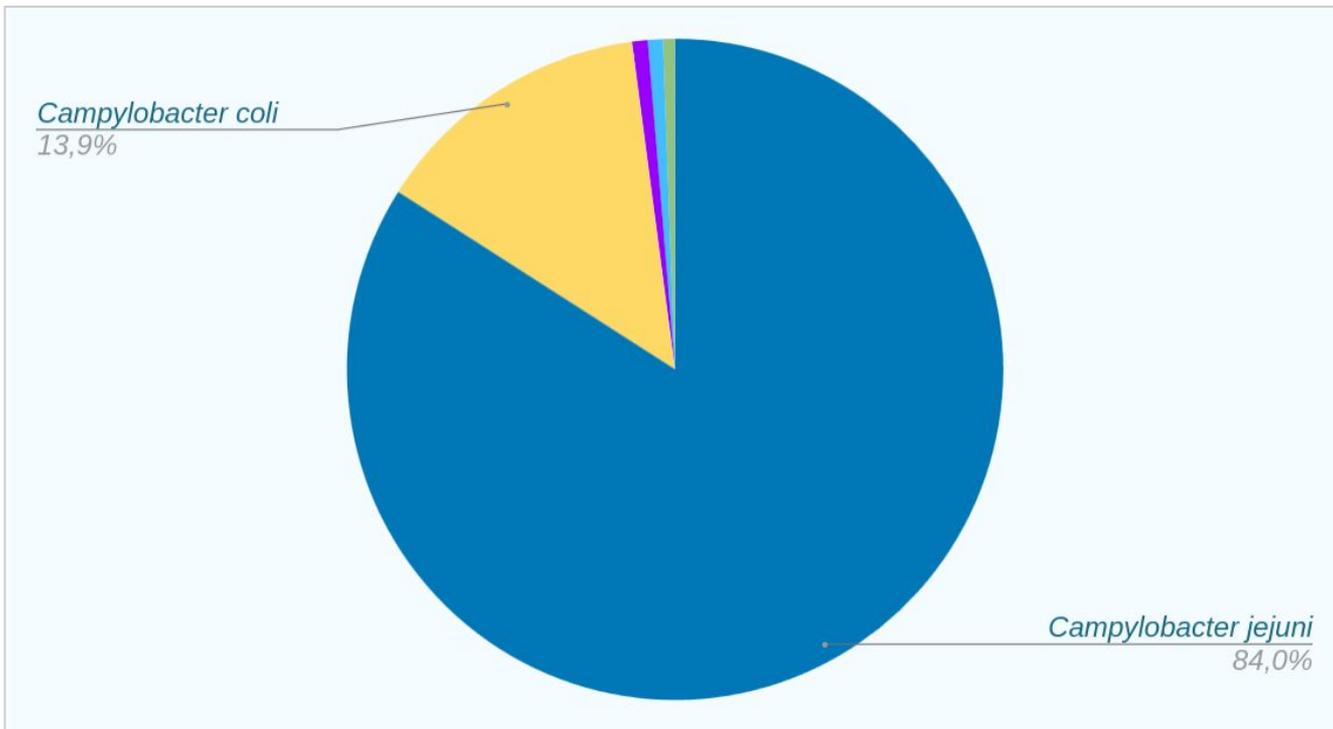
Quentin Jehanne, Lucie Bénéjat-Bruhl, Astrid Ducournau, Johanna Aptel, Léo Gillet, Marine Jauvain, Erick Keisler, Marie Taymont, Émilie Bessède, Philippe Lehours.

Centre National de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters,
CHU de Bordeaux.

Bordeaux - 07/02/2024



Les espèces des 9243 souches cliniques de *Campylobacter* du CNRCH en 2022

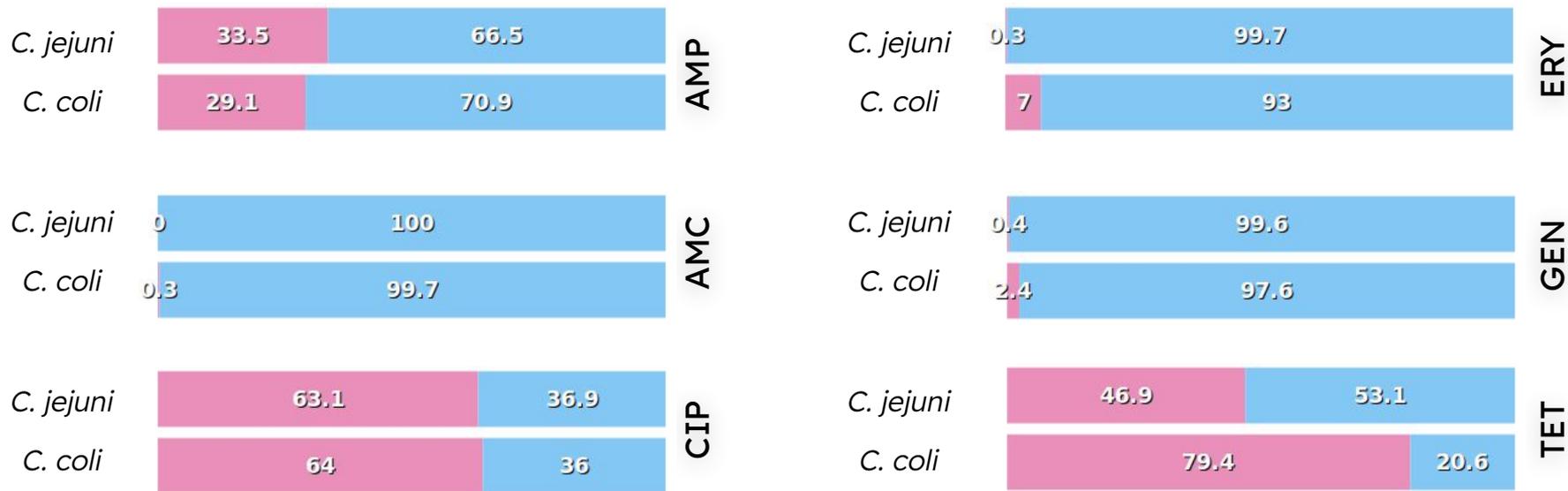


7766 *C. jejuni*
1283 *C. coli*
71 *A. butzleri*
54 *C. fetus*

69 autres espèces :

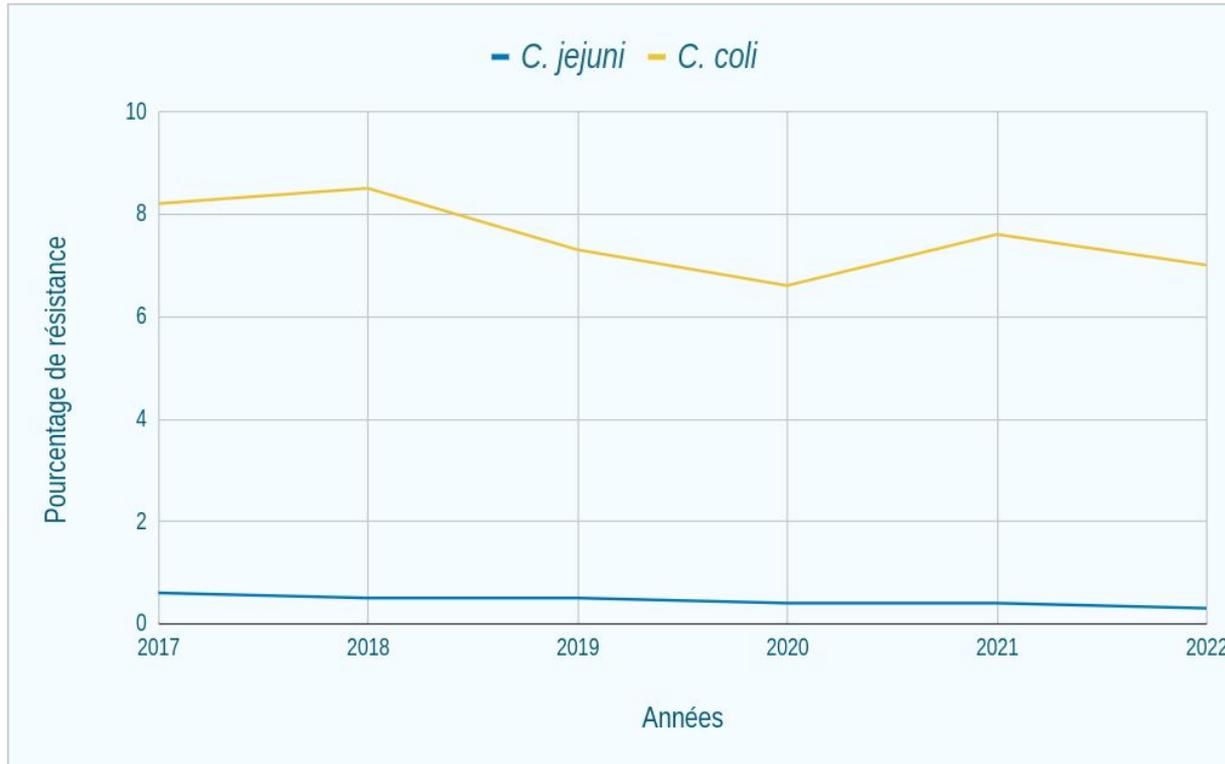
- 18 *C. ureolyticus*
- 10 *C. rectus*
- 8 *C. lari*
- 6 *C. ornithocola*
- 4 *C. gracilis*
- 3 *C. curvus*
- 2 *C. hyointestinalis*
- 2 *C. concisus*
- 3 *C. sp*

La résistance aux antibiotiques en 2022



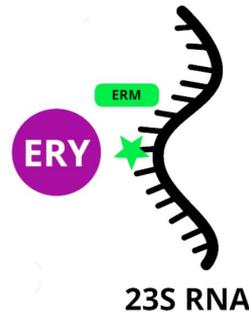
Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques réalisés par la méthode de diffusion.
 Légendes : **AMP** = ampicilline, **AMC** = amoxicilline/acide clavulanique, **CIP** = ciprofloxacine, **ERY** = érythromycine, **GEN** = gentamicine, **TET** = tétracycline, % résistants - % sensibles.

Résistance à l'érythromycine pour *C. jejuni* et *C. coli* sur 6 ans



Quels mécanismes sont impliqués ?

- Mutations dans l'**ADNr 23S** en positions 2074, 2075 : **A2074G**, **A2074C**, **A2074T** et **A2075G** (Ladely S. *et al* 2009).
- Expressions de méthylase :
 - **erm(B)** : première fois décrite chez *C. coli* en Chine en 2014 (Qin S. *et al*).
 - **erm(N)** : première fois décrite chez *C. coli* au Canada en 2019 (Greninger A. *et al*) puis en Europe en France au CNRCH en **2016** (Jehanne Q. *et al* 2021).





Méthodologie

Analyse par Whole-Genome Sequencing (WGS)



Souche avec données
d'antibiogramme

Analyse par Whole-Genome Sequencing (WGS)



Souche avec données
d'antibiogramme



Extraction de l'ADN bactérien par le système
Magna Pure 96 (Roche)

Analyse par Whole-Genome Sequencing (WGS)



Souche avec données
d'antibiogramme

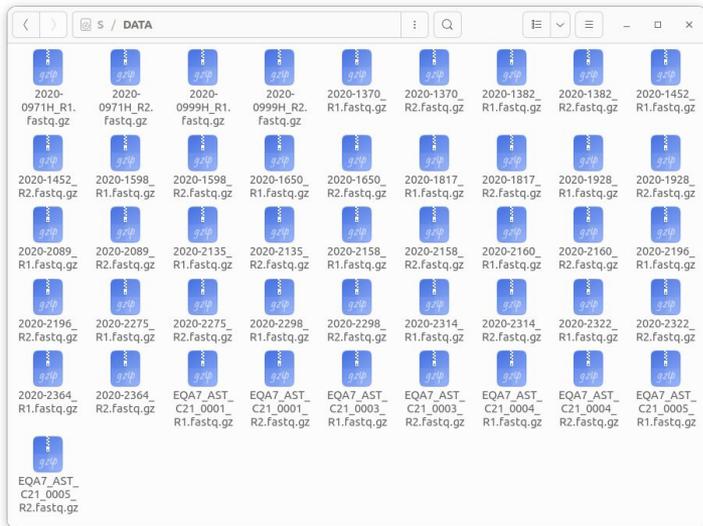


Extraction de l'ADN bactérien par le système
Magna Pure 96 (Roche)



Séquençage avec la
technologie Illumina

Analyse des données de séquençage



Données brutes de séquençage au format
.fastq.gz.

```
quentin@quentin-chu: ~/work/
ISOLATE [1/24] 10
04/07/23 15:02:37 Step 1 Data cleaning ...
04/07/23 15:02:39 Step 2 Genome assembly ...
04/07/23 15:03:33 Step 3 Resistance finding ...
04/07/23 15:07:14 Step 4 Species identification ...
04/07/23 15:07:33 Step 5 Molecular typing ...
04/07/23 15:07:34 Step 6 Source attribution ...
04/07/23 15:07:34 Step 7 Data statistics ...
04/07/23 15:09:11 Step 8 Generating results file ...
```

Pipeline d'analyses bio-informatiques du CNRCH
fonctionnant sous Linux.

Rapport obtenu pour chaque souche séquencée



Informations patient		Informations sur le séquençage	
Nom	██████████	Numéro de l'échantillon	233063491601
Prénom	██████████		
Date de naissance	09/11/1980	Date de prélèvement	18/08/2023
Age	42	Nature	Selles
Sexe	Féminin		
		Nom du run	0025-INTEGRAGEN-2023-P2
		Génome n°	01560
		Projet	CAMPYLOBACTERS ERY-R
		Mois	NOVEMBRE
		Année	2023
Identification de l'espèce, typage moléculaire et attribution de la source de contamination			
Espèce identifiée par ANI (référence)	Complexé clonal (CC)	828	Source de contamination potentielle
CAMPYLOBACTER COLI (LMG6440)	Séquence type (ST)	828	VOLAILLE
	Core genome ST (cgST)	INCONNU (31,348%)	
Score ANI (significativité ≥ 95%)	aspA ; glnA ; pflA ; ppm ; tkt ; uncA		Score d'attribution (significativité ≥ 70%)
98.924 %	33 ; 39 ; 30 ; 82 ; 104 ; 43 ; 17		100.0 %
Détermination moléculaire de la résistance aux antibiotiques			
<p>21F Opa1 T861 Contig 1 - 99.9% IDT - 98.1% COV Positions [21809 ; 22162]</p> <p>25F emrB12_U9931_2 Contig 16 - 100.0% IDT - 100.0% COV Positions [450 ; 4187]</p> <p>28F tetA (TRONQUÉ) - Tétracycline Contig 20 - 99.9% IDT - 42.1% COV Positions [1 ; 80]</p> <p>27F ANT(II)-Ia-actI Contig 14 - 100.0% IDT - 100.0% COV Positions [248 ; 1112]</p>	<p>29C ANT(II)-Ic-actII Contig 16 - 99.9% IDT - 100.0% COV Positions [5880 ; 6656]</p>		
Statistiques sur les données de séquençage et le génome assemblé			
Reads bruts (R1)	1,256,271	Taille mappant sur la référence	1,593,137 pb
Reads bruts (R2)	1,256,271	Taille de la référence	1,912,816 pb
Taille totale (R1)	186,440,650 pb	Génome couvert a	83.286 %
Taille totale (R2)	186,440,650 pb	Profondeur moyenne	83.917
Reads nettoyyés (R1)	1,221,639	Taille du génome assemblé	1,587,633 pb
Reads nettoyyés (R2)	1,221,639	Nombre total de contigs	39
Taille nettoyyée (R1)	180,342,072 pb	Taille moyenne des contigs	51,137 pb
Taille nettoyyée (R2)	176,648,828 pb	GC %	31.42 %
		Nombre de CDS	1,721

Rapport généré par le Centre National de Référence des Campylobacters & Helicobacters à Bordeaux le 20/01/2024 à 16:26:54

Rapport obtenu pour chaque souche séquencée



**CENTRE
HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE
BORDEAUX**

Centre National de Référence des Campylobacters & Hélicobacters
Laboratoire de Bactériologie
CHU Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33076 Bordeaux cedex

Tél: +33 (0)5 56 79 59 77
Fax: +33 (0)5 57 82 19 77



Informations patient

Nom ██████████ Numéro 
Prénom ██████████ de l'échantillon
Date de naissance 09/11/1980 231083491601
Age 42 Date de prélèvement 18/08/2023
Sexe Féminin Nature Selles

Informations sur le séquençage

Nom du run 0025-INTEGRAGEN-2023-P2
Génome n° 01560
Projet CAMPYLOBACTERS ERY-R
Mois NOVEMBRE
Année 2023

Identification de l'espèce, typage moléculaire et attribution de la source de contamination

Espèce identifiée par ANI (référence)
CAMPYLOBACTER COLI LMG6440

Complexe clonal (CC) 828
Sequence type (ST) 828
Core genome ST (cgST) INCONNU (31.348%)

Source de contamination potentielle
VOLAILLE

Score ANI (significativité ≥ 95%)
98.924 %

aspA ; glnA ; gltA ; glyA ; pgm ; tkt ; uncA
33 ; 39 ; 30 ; 82 ; 104 ; 43 ; 17

Score d'attribution (significativité ≥ 70%)
100.0 %



Rapport généré par le Centre National de Référence des Campylobacters & Hélicobacters à Bordeaux le 20231024 à 16:26:54

Analyse systématique du résistome et du virulome



CENTRE
HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE
BORDEAUX

Centre National de Référence des Campylobacters & Helicobacters
Laboratoire de Biologie
300p Pasteur
Place Armand Trousseau
33075 Bordeaux cedex
Tel : +33 (0)5 56 79 59 77
Fax : +33 (0)5 57 52 59 77



Informations patient		Informations sur le séquençage	
Nom	██████████	Numéro de l'échantillon	233003491601
Prénom	██████████	Nom du run	0025-INTEGRAGEN-2023-P2
Date de naissance	09/11/1980	Géome n°	01560
Age	42	Projet	CAMPYLOBACTERS ERY-R
Sexe	Féminin	Mois	NOVEMBRE
	Nature	Année	2023

Détermination moléculaire de la résistance aux antibiotiques

CIF	CyrA T86I Contig 1 - 99.9% IDT - 98.1% COV Positions [219096 : 221612]	SPC	ANT(9)-Ic-aad9 Contig 16 - 99.9% IDT - 100.0% COV Positions [5880 : 6656]		
ERY	erm(B)₁₂ U18931_2 Contig 16 - 100.0% IDT - 100.0% COV Positions [3450 : 4187]				
TET	tetO (TRONQUÉ) - Tetracycline Contig 20 - 99.9% IDT - 42.1% COV Positions [1 : 809]				
STR	ANT(6)-If-aadE Contig 16 - 100.0% IDT - 100.0% COV Positions [246 : 1112]				

Détection moléculaire
de la résistance

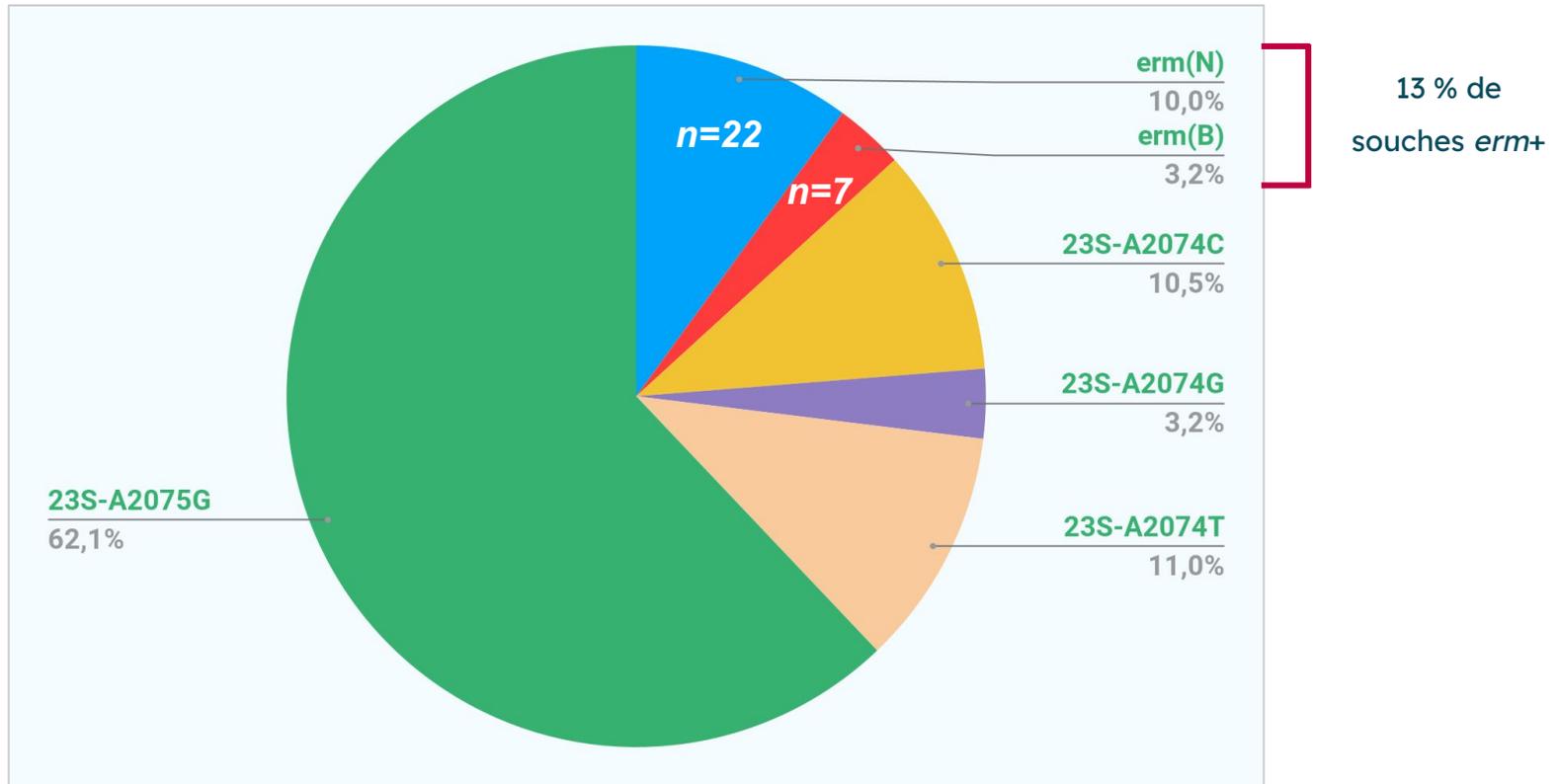
Métrique (R1)	Valeur (R1)	Métrique (R2)	Valeur (R2)
Taille totale (R1)	188,440,690 pb	Profondeur moyenne	83,817
Reads nettoyés (R1)	1,221,639	Taille du génome assemblé	1,687,833 pb
Reads nettoyés (R2)	1,221,639	Nombre total de contigs	39
Taille nettoyée (R1)	180,342,072 pb	Taille moyenne des contigs	51,137 pb
Taille nettoyée (R2)	176,648,828 pb	GC %	31,42 %
		Nombre de CDS	1,721

Rapport généré par le Centre National de Référence des Campylobacters & Helicobacters à Bordeaux le 202310204 à 16:26:54



Résultats

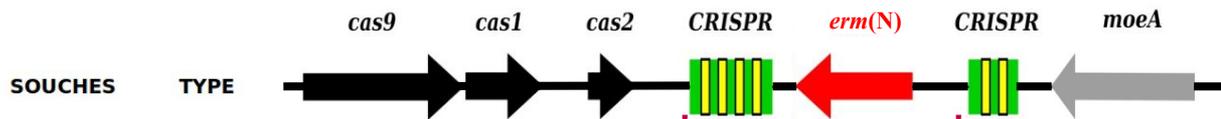
Mécanismes identifiés sur environ 200 souches résistantes à l'ERY séquencées



Proportion des mécanismes sur 6 ans : *erm*(N) ou *erm*(B) en augmentation



erm(N)



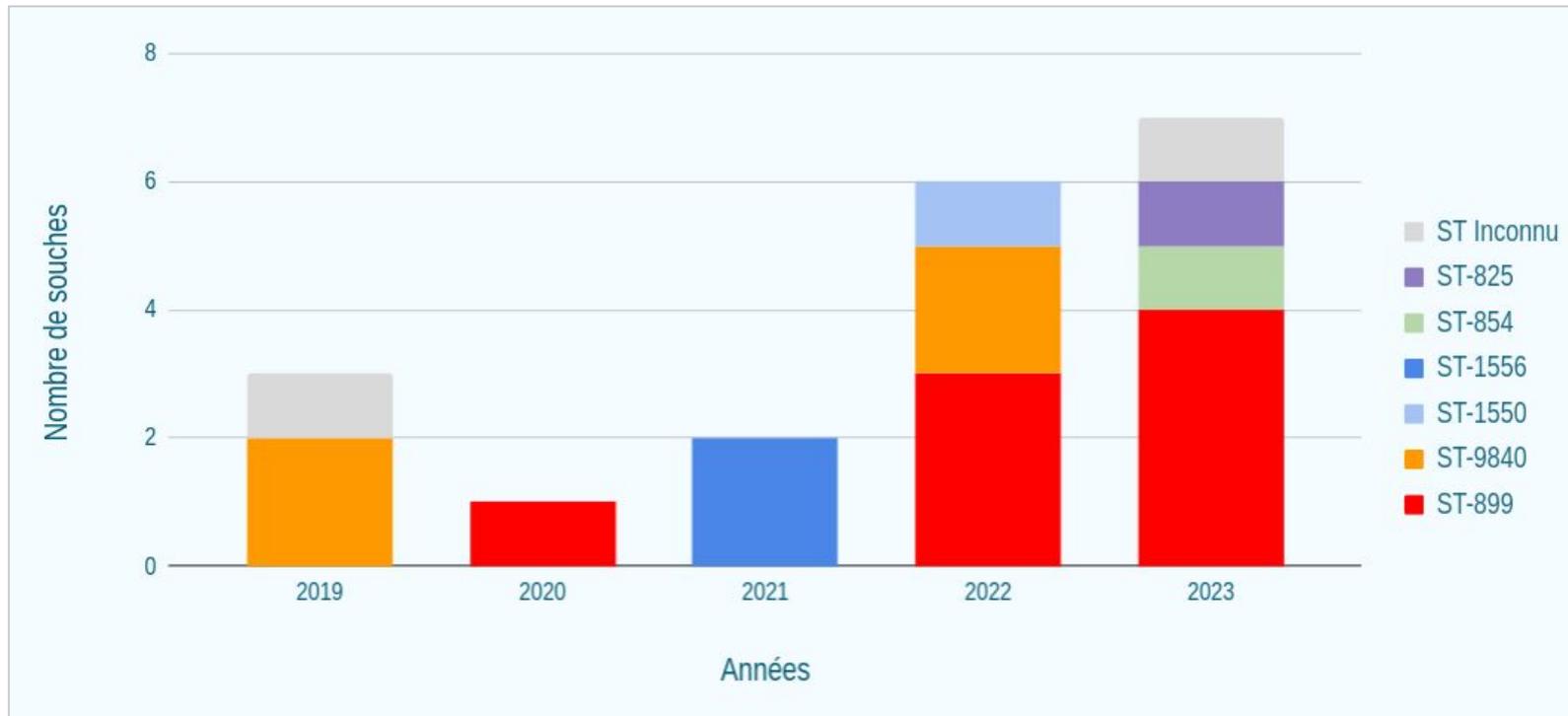
* Séquences d'ADN d'origine exogène

1	CCTATTGCAACCCCTTGTTTCAGACTATAA
2	TTGCAAGATAGTGATTAAAGAGATGCTTT
3	AAGTTTGAACAAGAGTGTATTATGATTA
4	CACCCTTCCAAAAGGGTGGAGAAGGTTTA
5	GTTTTATTGTGGTTATAAAAATAAAAAG
6	TTCATAGCATCTTGCAGCTTTTAAAGGCA
7	TTGCAAGATAGTATTAAAGAGATGCTTT

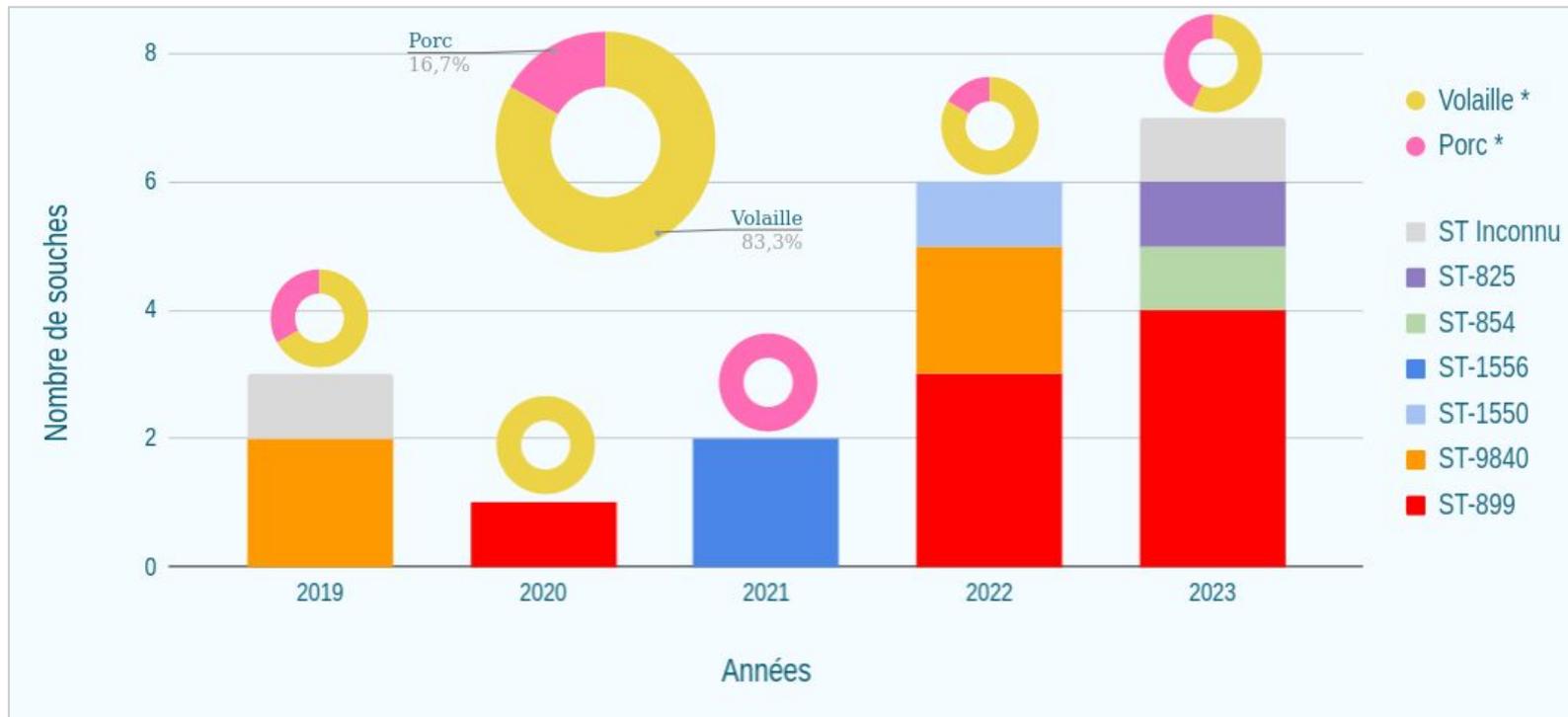
SOUCHES	TYPE	<i>cas9</i>	<i>cas1</i>	<i>cas2</i>	CRISPR	<i>erm(N)</i>	CRISPR	<i>moeA</i>
2016-01	I	100	100	100	1 2 3 4 5	100	7 3 4 5 6	100
2016-02	I	100	100	100	1 2 3 4 5	100	7 3 4 5 6	100
2016-03	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2019-01	III	100	100	100	1 3 4 5	100	7 3 4 5 6	99.832
2019-02	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2019-03	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2020-01	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2021-01	II	99.39	99.887	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	97.397
2021-02	II	99.39	99.887	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	97.397
2022-01	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2022-02	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2022-03	II	100	99.887	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	98.825
2022-04	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2022-05	II	100	99.887	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2022-06	IV	100	100	100	1 2 4 5	100	4 5 6	100
2023-01	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2023-02	V	100	100	100	2 3 4 5	100	4 5 6	100
2023-03	II	100	100	100	1 2 3 4 5	99.889	4 5 6	100
2023-04	II	99.966	99.887	100	1 2 3 4 5	99.889	4 5 6	97.733
2023-05	II	98.678	98.584	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2023-06	II	100	100	100	1 2 3 4 5	100	4 5 6	100
2023-07	V	100	100	100	2 3 4 5	100	4 5 6	100

Environnement génomique des **22** souches cliniques de *C. coli* positives à *erm(N)*

Évolution des Sequence Types des 22 souches *erm(N)*

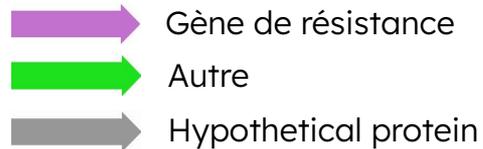
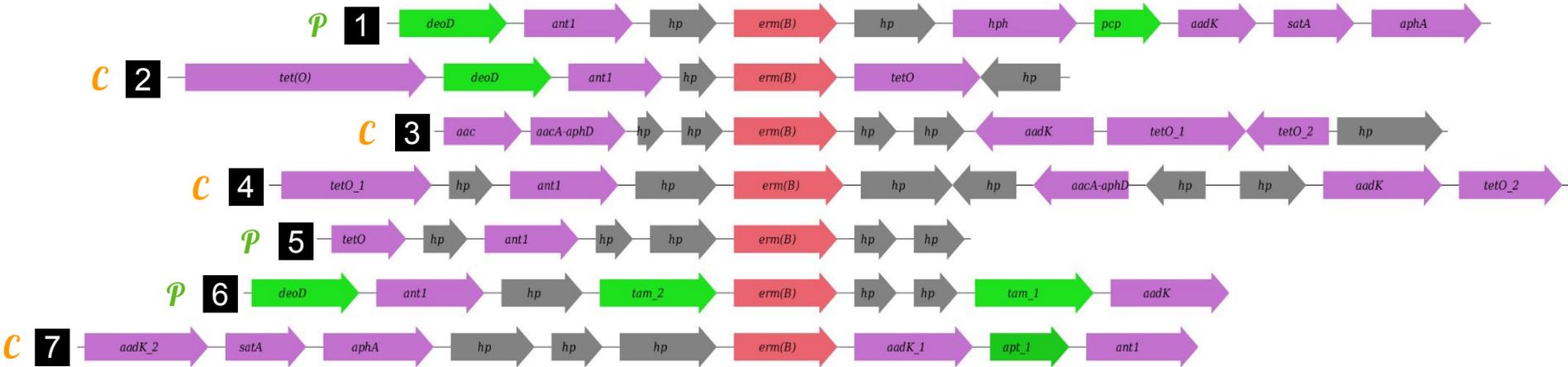


Évolution des sources de contamination



*Jehanne Q. et al 2020

Environnement génomique des 7 souches cliniques positives à *erm(B)*



C Chromosome
P Plasmide

Conclusion

- Le taux de résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter* reste stable, pour l'instant.
- Cependant, **les souches exprimant des méthylases comme *erm(B)* ou *erm(N)* prennent du terrain sur les souches mutées au niveau du 23S.**
- La résistance à l'ERY doit continuer d'être testée au niveau national, chez les souches vétérinaires et cliniques !



Conclusion

- Le taux de résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter* reste stable, pour l'instant.
- Cependant, **les souches exprimant des méthylases comme *erm(B)* ou *erm(N)* prennent du terrain sur les souches mutées au niveau du 23S.**
- La résistance à l'ERY doit continuer d'être testée au niveau national, chez les souches vétérinaires et cliniques !
- **Merci de continuer d'envoyer vos souches au CNRCH !**



Merci pour votre attention

(**Directeur**) Pr Philippe Lehours

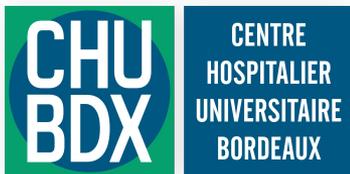
(**Biologistes**) Dr Emilie Bessède, Dr Marine Jauvain

(**Ingénieurs**) Lucie Bruhl, Léo Gillet, Dr Quentin Jehanne

(**Techniciennes**) Johanna Aptel, Astrid Ducournau

Marie Taymont

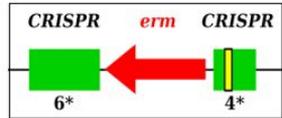
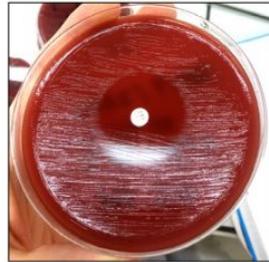
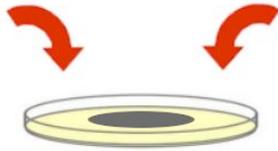
(**Secrétaire**) Erick Keisler



Transmission horizontale de *erm*(N)

Conjugaison

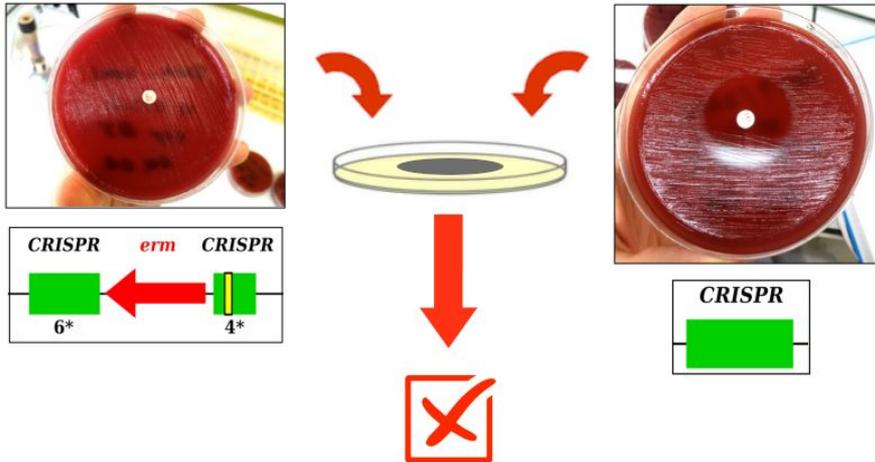
C. coli vs *C. coli*



Transmission horizontale de *erm*(N)

Conjugaison

C. coli vs *C. coli*

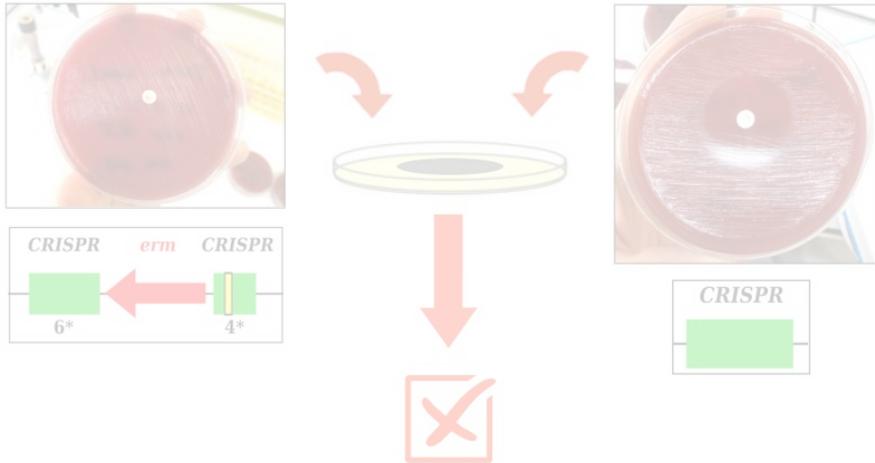


Jehanne Q. *et al* 2021

Transmission horizontale de *erm*(N)

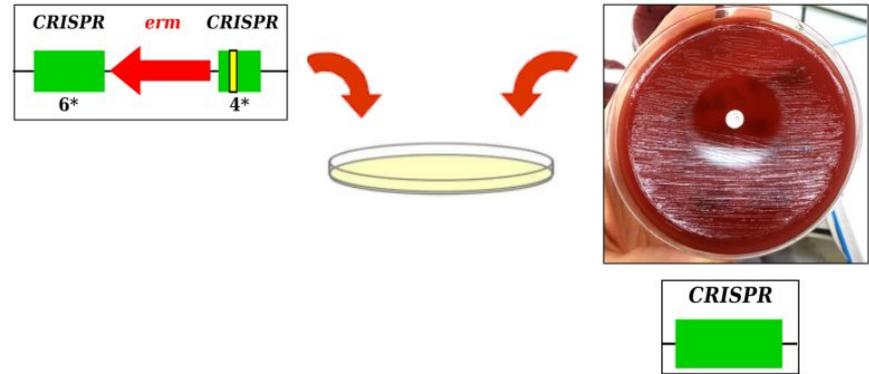
Conjugaison

C. coli vs *C. coli*



Transformation

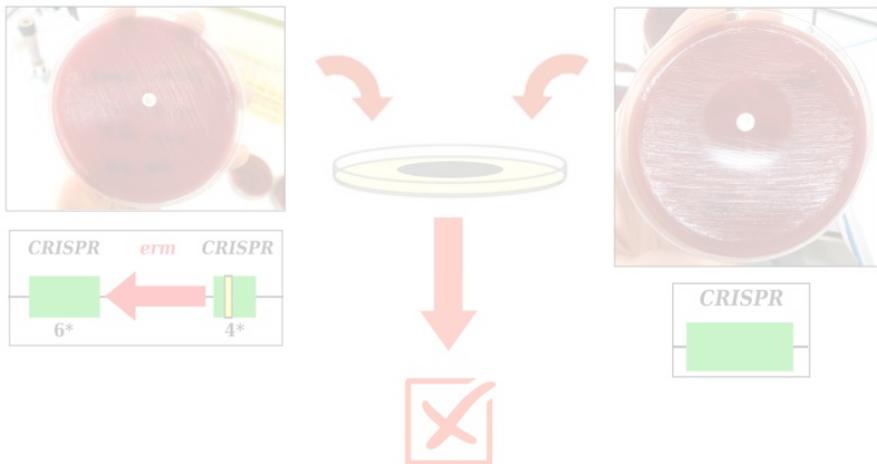
Produit de PCR vs *C. coli*



Transmission horizontale de *erm*(N)

Conjugaison

C. coli vs *C. coli*



Transformation

Produit de PCR vs *C. coli*

