

**CARACTERISATION DE PLASMIDES DE *E. COLI* RESISTANTS AUX
CEPHALOSPORINES DE TROISIEME GENERATION
ISOLES DE POULETS DE CHAIR**

**Touzain Fabrice^{1,2}, Le Devendec Laetitia^{1,2}, de Boissésou Claire^{1,2}, Baron Sandrine^{1,2},
Jouy Eric^{1,2}, Perrin-Guyomard Agnès^{2,3}, Blanchard Yannick^{1,2} et Kempf Isabelle^{1,2}**

¹ANSES, Laboratoire de Ploufragan, 22440 Ploufragan, France

²Université Bretagne Loire, France

³ANSES, Laboratoire de Fougères, 35306 Fougères, France

Isabelle.kempf@anses.fr

RÉSUMÉ

La résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) est un problème de santé publique et vétérinaire. Cette résistance est le plus souvent liée à la présence de plasmides conjugatifs porteurs de gènes codant pour la production de bêta-lactamases à large spectre. Pour mieux comprendre l'épidémiologie de cette résistance, nous avons caractérisé par séquençage une collection d'une trentaine de plasmides préparés à partir de souches de *E. coli*, pathogènes ou non pathogènes, isolées de poulets de chair de différents types de production. Les données de séquençage permettent de décrire les caractéristiques des plasmides : il s'agit le plus souvent de plasmides de grande taille (supérieure à 100 kpb), contenant les gènes de résistance aux céphalosporines *bla*_{CTX-M-1} ou *bla*_{CMY-2}, à la tétracycline (*tetA*) et aux sulfamides (*sul2*), ainsi que parfois les gènes *bla*_{TEM-1b} (résistance aux pénicillines A), *dfrA1* ou *dfrA17* (résistance au triméthoprime) ou *aadA5* (résistance aux aminosides). Ils appartiennent majoritairement au réplicon de type IncI1 et au pMLST3 ou plus rarement aux réplicons Inc B/O/K/Z ou IncF. Globalement les séquences des plasmides sont proches de celles de plasmides isolées dans d'autres productions animales ou d'autres pays.

ABSTRACT

Characterization of plasmids conferring resistance to extended-spectrum cephalosporins in *E. coli* isolated from French broilers

Resistance to extended- spectrum cephalosporins (ESC) is a public and veterinary health concern. This resistance is most often linked to the presence of conjugative plasmids coding for extended- spectrum beta-lactamases. To better understand the epidemiology of this resistance, thirty-two plasmids prepared from pathogenic and commensal *E. coli* strains isolated from broilers of different production types were studied by sequencing. Sequences showed that plasmids were usually larger than 100 kbp, contained the resistance genes *bla*_{CTX-M-1} and/or *bla*_{CMY-2}, *tetA*, *sul2* or less often *bla*_{TEM-1b}, *dfrA1* or *dfrA17* or *aadA5*. They belonged mostly to the replicon type IncI1, pMLST3 or less often to replicon types IncB/O/K/Z or IncF. Their sequences are similar to those of plasmids from other animal productions or other countries.

INTRODUCTION

La résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) est un problème de santé publique et vétérinaire. Des souches de *E. coli* résistantes aux C3G peuvent être isolées lors de colibacilloses aviaires, ou détectées dans la flore commensale des oiseaux sains arrivant à l'abattoir. Ainsi, les bilans annuels du réseau RESAPATH montrent que le plus fort taux de souches de *E. coli* pathogènes résistantes aux C3G a été observé en 2010 et 2011 avec des niveaux dépassant 20%, mais ces taux ont diminué par la suite pour atteindre 5,1% en 2014 (1). La surveillance annuelle de la flore commensale des poulets de chair arrivant à l'abattoir a montré des pourcentages de 4% en 2010 (2) à 10,4% en 2012 (3) puis 6,2% en 2013 (4). Cette résistance aux C3G est le plus souvent liée à la présence de plasmides conjugatifs porteurs de gènes codant pour la production de bêta-lactamases à large spectre. Nous avons souhaité, dans le cadre d'un projet financé par l'Anses, pouvoir décrire plus finement les éléments génétiques hébergeant cette résistance afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cette résistance. Pour cela une trentaine de plasmides préparés à partir de souches de *E. coli* pathogènes ou non pathogènes, isolées de poulets de chair de différents types de production ont été caractérisés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Préparation des plasmides pour séquençage

Seize souches commensales provenant des échantillons collectés en abattoirs de poulets de chair de 2010 à 2012 dans le cadre des plans de surveillance annuels de l'antibiorésistance de différents abattoirs ont été incluses. Elles provenaient de poulets âgés de 32 à 90 jours appartenant à différents types de production. Seize souches isolées de cas de colibacilloses aviaires isolées dans la même période ont également été incluses. Les souches incluses contenaient soit le gène *bla_{CTX-M}* soit le gène *bla_{CMY-2}*, gènes de résistance aux C3G le plus souvent détectés, (tableau 1).

Les plasmides ont été préparés selon le protocole de Takahashi et Nagano (5) et utilisés pour transformer la souche *E. coli* DH5alpha. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu Mueller Hinton contenant du cefotaxime (4, 8 et 16 mg/l) et/ou de la céfoxitine (8 et 16 mg/l). La sensibilité des souches parentales et des transformants a été étudiée par détermination des concentrations minimales inhibitrices en micro-dilution (6) et les résultats ont été interprétés selon les cut-offs épidémiologiques EUCAST. Les plasmides ont ensuite été purifiés à partir des transformants comme précédemment et utilisés pour le séquençage.

1.2. Séquençage et analyses bioinformatiques

Les échantillons d'ADN plasmidique ont été fragmentés par sonication à l'aide d'un appareil Bioruptor® Plus (Diagenode). Les bibliothèques ont été construites en utilisant les kits « NEBNext Ultra DNA library Prep Kit for Illumina » et « NEBNext Multiplex Oligos for Illumina » (index primers Set 1 et Set 2) suivant les instructions du fabricant (New England Biolabs). Les étapes de purification ont été réalisées à l'aide des billes magnétiques Agencourt AMP pure XP (Beckman-Coulter).

Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur Illumina Mi-seq (séquences paires de 2x250 nucléotides). Les séquences ont été nettoyées avec Trimmomatic 0.32 (7). Deux alignements bowtie2 (8) des lectures nettoyées ont été réalisés (options -non-deterministic -very-sensitive), l'un sur le gène *bla_{CTX-M-1}* (DQ915955) pour évaluer la profondeur de couverture du séquençage, l'autre sur *phiX174*. Ce second alignement visait à éliminer les lectures correspondant à la séquence *phiX174* qui est utilisée en séquençage Illumina dans le cas d'échantillons très redondants pour en augmenter la diversité. Les lectures non alignées ont été sous-échantillonnées pour atteindre une profondeur de couverture globale de 80. Ces lectures ont été fournies à l'assembleur *de novo* Spades 3.1.1 (9). Les contigs redondants ou peu couverts de l'assemblage obtenu ont été éliminés.

Les séquences ont ensuite été analysées à l'aide des sites ResFinder (10) pour identifier les gènes de résistance, PlasmidFinder et pMLST webtool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services> (11)) pour les types de réplicons, ainsi qu'à l'aide de RASTA-Bacteria program version 2.12 (<http://genoweb1.irisa.fr/duals/RASTA-Bacteria/>) (12) pour identifier les systèmes toxine-anti-toxine.

Les séquences des principaux gènes de virulence des *E. coli* pathogènes pour les volailles (APEC) (*sitA-D*, *iucA-D*, *iutA*, *hlyF*, *ompT*, *etsA-C*, *iss*, *iroB-E*, *iroN*, *cvaA-C*, *cvi*, *tsh* et *eitA-D* (13)) ont également été recherchées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 présente les principales caractéristiques des transformants obtenus et des plasmides séquencés. A titre d'exemple, la figure 1 montre la carte d'un des plasmides obtenus à partir d'une souche commensale.

Pour une des seize souches commensales, il n'a pas été possible d'obtenir de transformant, malgré plusieurs tentatives, ce qui suggère que le gène *bla_{CTX-M}* de cette souche est probablement chromosomique. Pour les six souches commensales, pour lesquelles l'assemblage nettoyé permettait d'obtenir un unique contig, la taille des plasmides était comprise entre 107 834 et 115 593 pb et ils contenaient 143 à 153 ORF. Treize des seize plasmides étaient de type IncII, pMLST3 et contenaient le gène *bla_{CTX-M-1}*. Les gènes de résistance *tetA* et *sul2* ainsi que le système toxine-

anti-toxine ParE-RelB étaient fréquemment trouvés dans ces plasmides. La présence de gènes de résistance vis-à-vis d'antibiotiques fréquemment utilisés en médecine vétérinaire (tétracyclines et sulfamides) constitue un risque de co-sélection de la résistance aux C3G.

Une des seize souches pathogènes a donné deux transformants, l'un contenant *bla*_{CTX-M-1} et l'autre contenant *bla*_{CMY-2}. Pour les huit souches pathogènes, pour lesquelles l'assemblage nettoyé a permis d'obtenir un seul contig, la taille des plasmides était comprise entre 105 870 et 110 588 pb et ils contenaient 146 à 151 ORF. Comme pour les souches commensales, un grand nombre de plasmides (quinze sur dix-sept) étaient de type IncI1, pMLST3 et contenaient le gène *bla*_{CTX-M-1}. Les gènes de résistance *tetA* et *sul2* ainsi que le système toxine-anti-toxine gène ParE-RelB étaient également fréquemment trouvés.

Tous les plasmides de souches commensales ou pathogènes de type IncI1 possédaient les gènes de transfert *Pil-T*, *pilV*, *traA-C*, *traE-F*, *traH*, *traJ-X*, une DNA primase et une endonucléase. Ils avaient également les gènes impliqués dans la maintenance et

la stabilité plasmidique. A l'exception d'un des plasmides d'une souche pathogène, les principaux gènes de virulence décrits chez les *E. coli* pathogènes pour les volailles n'ont pas été détectés, suggérant soit leur absence, soit une localisation chromosomique ou sur un autre plasmide.

CONCLUSION

Les données de séquençage montrent que la diversité des plasmides est relativement faible, puisque 28 des 32 plasmides sont de type IncI1, pMLST3 et que les gènes de résistance présents sont majoritairement *bla*_{CTX-M-1}, *tetA* et *sul2*. Un seul des plasmides contenait des gènes de virulence des APEC.

Remerciements : Les auteurs remercient les laboratoires d'analyses vétérinaires adhérent au Résapath, le Conseil Départemental des Côtes d'Armor, ainsi que Biogenouest Génomique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Jarrige N, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec JY.** 2013. RESAPATH réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries animales, bilan 2012. Maisons-Alfort.
2. **EFSA-ECDC.** 2012. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010 (<http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/2598>). EFSA Journal 2012;10(3):2598 **10**:2598 [2233 pp.].
3. **EFSA-ECDC.** 2014. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. EFSA Journal **12**:3590 [3336 pp.].
4. **EFSA-ECDC.** 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal **13**:4036 [4178 pp.].
5. **Takahashi S, Nagano Y.** 1984. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. J Clin Microbiol **20**:608-613.
6. **CLSI.** 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, approved standard-fourth edition.
7. **Bolger AM, Lohse M, Usadel B.** 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics **30**:2114-2120.
8. **Langmead B, Salzberg SL.** 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods **9**:357-359.
9. **Yang X, Charlebois P, Gnerre S, Coole MG, Lennon NJ, Levin JZ, Qu J, Ryan EM, Zody MC, Henn MR.** 2012. De novo assembly of highly diverse viral populations. BMC genomics **13**:475.
10. **Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV.** 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother **67**:2640-2644.
11. **Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H.** 2014. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **58**:3895-3903.
12. **Sevin EW, Barloy-Hubler F.** 2007. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. Genome Biol **8**:R155.
13. **Johnson TJ, Johnson SJ, Nolan LK.** 2006. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic Escherichia coli suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. J Bacteriol **188**:5975-5983.

Tableau 1. Principales caractéristiques des plasmides

Origine	Caractéristiques	Résistances des souches parentales ^a	Profils de résistance des transformants*	Gènes de résistance sur les transformants*	Type de réplicon	Système toxine – antitoxine
Plans de surveillance à l'abattoir : 16 souches commensales	11 Poulets standard, 4 exports, 1 bio 8 couvoirs 9 départements d'élevages 7 abattoirs Poulets âgés de 32 à 90 jours 0 à 3 traitements antibiotiques recensés	C3G : 16 ^a SMX : 13 TET : 12 TMP : 8 FQ : 7 STR : 7 GEN : 1	C3G – SMX-TET : 8 ^b C3G – SMX-TMP : 4 C3G : 2 C3G-SMX : 1	<i>bla</i> _{CTX-M-1} : 13 ^b <i>bla</i> _{CMY-2} : 2 <i>bla</i> _{TEM-1b} : 1 <i>tetA</i> : 8 <i>sul2</i> : 13 <i>dfrA1</i> ou <i>dfrA17</i> : 4 <i>aadA5</i> : 3	Incl1, ST3 : 13 (tous contenant <i>bla</i> _{CTX-M-1}) Inc B/O/K/Z : 2 (tous contenant <i>bla</i> _{CMY-2})	ParE-RelB : 11 (tous dans plasmides Incl1, ST3) RelE-StbD : 1 plasmide IncB/O/K/Z
		C3G : 16 ^a SMX : 16 TET : 16 FQ : 11 TMP : 7 STR : 5 KAN : 2	C3G – SMX-TET : 14 ^b C3G – SMX-TMP : 1 C3G-TET : 1 C3G : 1	<i>bla</i> _{CTX-M-1} : 16 ^b <i>bla</i> _{CMY-2} : 1 <i>tetA</i> : 14 <i>sul2</i> : 14 <i>dfrA1</i> ou <i>dfrA17</i> : 1 <i>aadA5</i> : 1	Incl1, ST3 : 15 (tous les plasmides contenant <i>bla</i> _{CTX-M-1} (sauf un) ^c) IncFIA/FIB/FIC/FII : 1 (contenant <i>bla</i> _{CMY-2})	ParE-RelB : 11 (tous dans plasmides Incl1, ST3) CcdA-CcdB/COG5302 : 1 plasmide (contenant aussi parE-RelB) VagC / SpoVT_AbrB / MazE-VapC / PIN : 1 plasmide (IncFIA/FIB/FIC/FII)
RESAPATH : 16 souches isolées lors de colibacillose aviaire	Informations non disponibles					

SMX : sulfamide ; TMP : Triméthoprim ; TET : Tétracycline ; FQ : Fluoroquinolones ; STR : Streptomycine ; GEN : Gentamicine KAN : Kanamycine

*pas de transformant obtenu pour une souche commensale ; deux transformants obtenus pour une souche pathogène (l'un contenant *bla*_{CTX-M-1} et l'autre contenant *bla*_{CMY-2})

^anombre de souches parentales présentant cette résistance

^bnombre de transformants présentant ce profil de résistance ou possédant ce gène de résistance

^cpour un plasmide, un des gènes (*ardA*) nécessaire au typage pMLST n'est pas trouvé, les autres gènes correspondent au pMLST3

Figure 1 : carte du plasmide pCOV4

