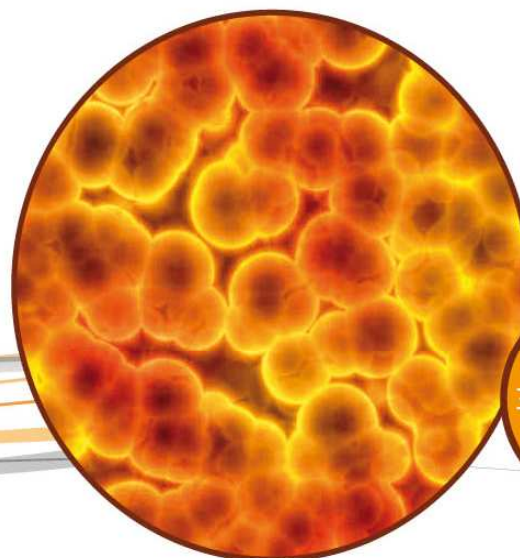


## Les rencontres scientifiques de l'Anses

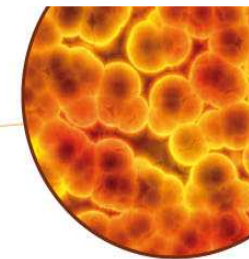
Restitution du programme national de  
recherche environnement santé travail

# De l'émergence à la résurgence des agents biologiques : caractérisation des facteurs de risque pour l'homme



Mercredi  
30 novembre  
2011

Maison internationale, Paris 14<sup>e</sup>



**Titre de la présentation:**

# **Maitrise de la dispersion des gènes de résistance aux antibiotiques en milieux naturels.**

- Pascal SIMONET

## Maitrise de la dispersion des gènes de résistance aux antibiotiques en milieux naturels. (AntiReSol)

- Dr Pascal SIMONET ([pascal.simonet@ec-lyon.fr](mailto:pascal.simonet@ec-lyon.fr)) (coordinateur) : Equipe "Génomique microbienne environnementale", UMR CNRS 5005, Laboratoire Ampère, Ecole Centrale de Lyon, 36 avenue Guy de Collongue, 69134 Ecully Cedex, France.
- Pr Dominique SCHNEIDER ([dominique.schneider@ujf-grenoble.fr](mailto:dominique.schneider@ujf-grenoble.fr)), Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, UMR CNRS 5163, Université Joseph Fourier Institut Jean Roget, Domaine de la Merci, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.
- Pr Amy SAPKOTA ([amy@amysapkota.com](mailto:amy@amysapkota.com)), Maryland Institute of Environmental Health, University of Maryland, College Park, College of Health and Human Performance, Maryland Institute of Environmental Health, Health and Human Performance Building, College Park, MD 20742-2611, USA.

## **Maitrise de la dispersion des gènes de résistance aux antibiotiques en milieux naturels. (AntiReSol)**

### Objectifs:

- Evaluer et analyser l'ensemble du potentiel génétique de résistance à des antibiotiques sélectionnés (fluoroquinolones, macrolides, beta-lactams) des bactéries du sol.
- Déterminer les possibilités de dissémination des gènes de résistance.
- Dresser une carte génomique des processus de résistance et des conditions favorisant leur dissémination.

## Environnements étudiés:

- Environnement contrôle:  
Sol (France) de prairie (bovins non traités aux antibiotiques)
- Environnements (peut-être) à risques :  
Sols (USA) de ferme (porcs traités aux antibiotiques)  
Sols (France) de champs (maïs conventionnels et OGM (événement Bt176)).
- *Legionella pneumophila*

# 1. Exploration des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes de l'environnement.

- Modèle bactérien: *L. pneumophila*
- Expériences d'évolution expérimentale
- Culture en présence de doses croissantes de moxifloxacine (fluoroquinolone) de 8 lignées de la même souche.

# Traitement de la Légionellose

- ❖ Les macrolides (l'érythromycine) et les nouveaux macrolides (azithromycine).
- ❖ Les fluoroquinolones +++: activité supérieure aux macrolides *in vitro* et dans les modèles animaux.
- ❖ La rifampicine.
- ❖ La durée du traitement: 21 jours en moyenne.

**MAIS:**

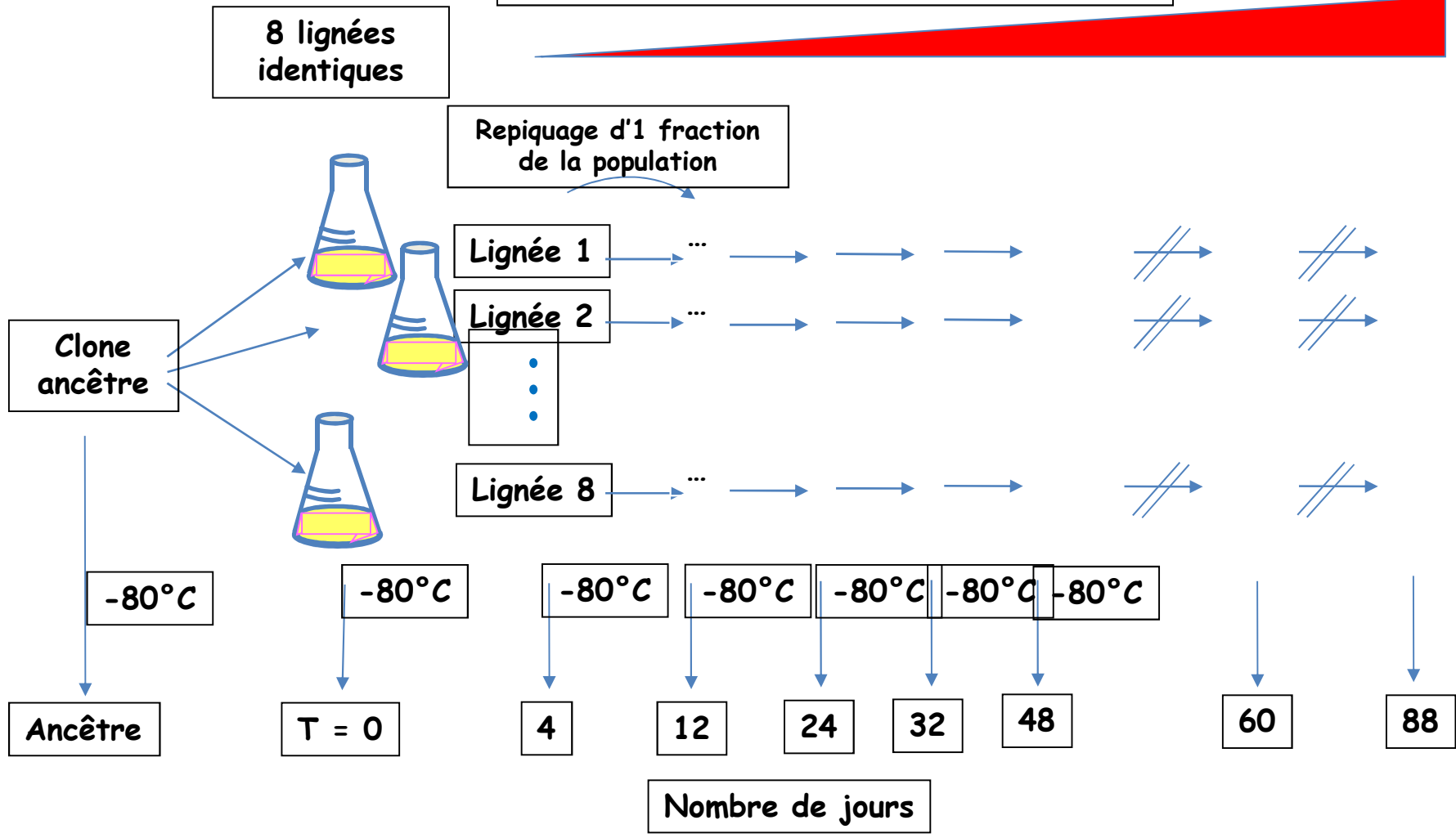
**Echecs et rechutes à l'arrêt de traitements**

**Développement de résistances?**

# Evolution de résistances accrues

Concentrations croissantes en antibiotique  
= MOXIFLOXACINE (fluoroquinolone)

x2048  
CMI  
initiale





## Résultats:

**Fort parallélisme phénotypique observé: Adaptation similaire des 8 lignées (croissance progressive de la résistance à la moxifloxacine.**

Lignée	Passages											
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
L1	0,0625	0,125	0,5	0,5	2	4	8	16	32			
L2	0,0625	0,25	0,5	0,5	2	2	4	4	32			
L3	0,0625	0,25	0,5	0,5	1	2	4	16	32			
L4	0,0625	0,125	0,5	0,5	0,5	1	1	2	4	16	16	32
L5	0,0625	0,125	0,5	0,5	1	2	4	4	16	32		
L6	0,0625	0,25	0,5	0,5	0,5	1	4	16	32			
L7	0,0625	0,25	0,5	0,5	1	2	4	16	16	32		
L8	0,0625	0,25	0,5	0,5	2	4	16	32				

Tableau 1: Concentration de moxifloxacine inhibant la croissance dans chaque lignée d'évolution pendant les différents passages.

## **Augmentation de la résistance aux fluoroquinolones:**

Mutations dans les gènes topoisomérases (codant les cibles des fluoroquinolones).

Mutations dans des gènes codant des pompes à efflux.

## Résultats:

**Fort parallélisme génétique observé dans les 8 lignées.**

Trois types mutations détectées :

Gènes *gyrA* et *gyrB* codant chacune des deux sous-unités de la gyrase

Gène *parC* codant une des deux sous-unités de la topoisomérase IV.

Deux mutations retrouvées dans les 8 lignées :

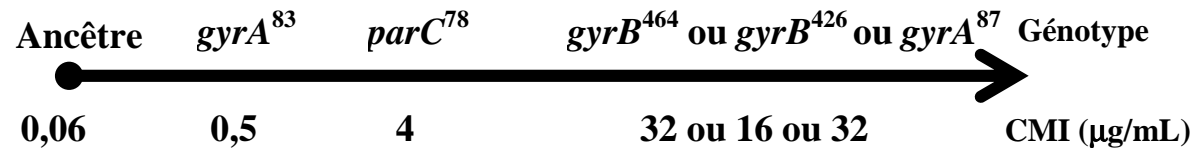
Mutations du codon 83 de *gyrA* et du codon 78 de *parC*.

Seconde mutation dans *gyrA* (moitié des cas).

Mutations dans *gyrB* (5 lignées).

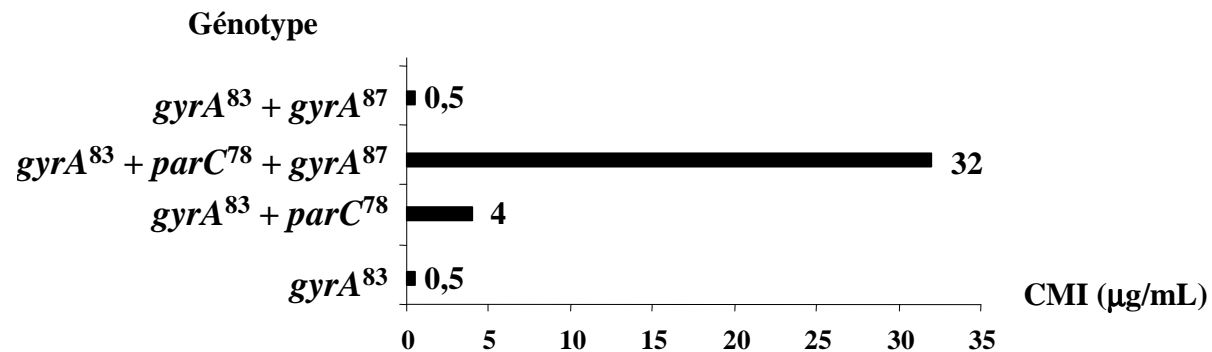
# Résultats:

## Ordre d'apparition des mutations (observation):



## Ordre d'apparition des mutations (expérimentation):

Mutations introduites dans le chromosome de l'ancêtre (recombinaison homologue).



## 2. Création et exploitation d'une banque d'ADN métagénomique du sol contrôle.

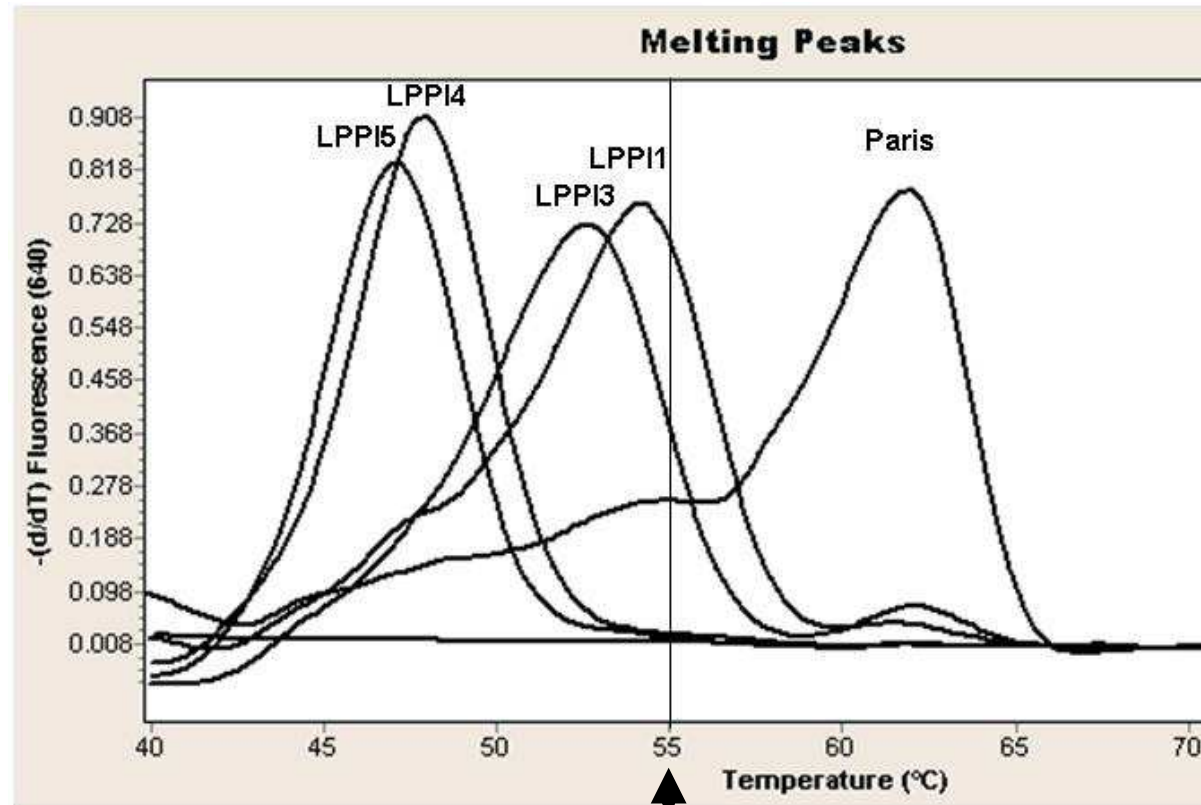
- Extraction de l'ADN métagénomique du sol contrôle.
- Clonage dans un fosmide et transformation d' *E. coli*.
- Obtention, manipulation et criblage moléculaire d'une banque d'ADN métagénomique (80 000 clones, inserts d'ADN : 40 kb).
- Criblage moléculaire.



## 3. Séquençage « shotgun » de l'ADN métagénomique.

# Méthodologie

## Distinction par LEGgyrA-rtPCR des mutants / souche sauvage Paris



55°C

- ➔ Différents pics correspondant à la présence des différentes mutations *gyrA*
- ➔ Utilisation future sur des isolats naturels et des prélèvements de patients.

# Résultats

## (Sol contrôle)

- Gènes *bla*: fortement représentés dans la communauté bactérienne du sol.
- Gène *ermB*: nombre de copies beaucoup plus faible.
- Gène *aadA*: très peu répandu.

## 4. Analyse des sols (USA) d'élevage (traitements antibiotiques).

Travaux poursuivis dans le cadre:

du projet AFSSET/ANSES « Gestions biologique et sociale de la dispersion des résistances aux antibiotiques (N° EST-2007-1) ».

du projet ADEME "Générique" « Etude de la situation naturelle ou après amendement par des molécules antibiotiques des bactéries telluriques, de leur prévalence dans le sol et de leurs potentialités de transfert horizontal ; Etudes en microcosmes. »

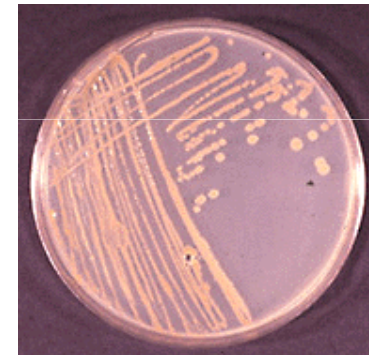
*Convention* : N° 0975C0007: ADEME, ECL et IPL SEDE



## **5. Impact des plantes OGM sur la charge en gènes de résistance à des antibiotiques chez les bactéries du sol.**

# IS ACQUISITION OF TRANSGENIC PLANT DNA BY BACTERIA POSSIBLE ?

*In vitro*



*Acinetobacter* BD413

**YES / Horizontal Gene Transfer**

**Gebhard, F. and K. Smalla.** 1998. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1550-1554.

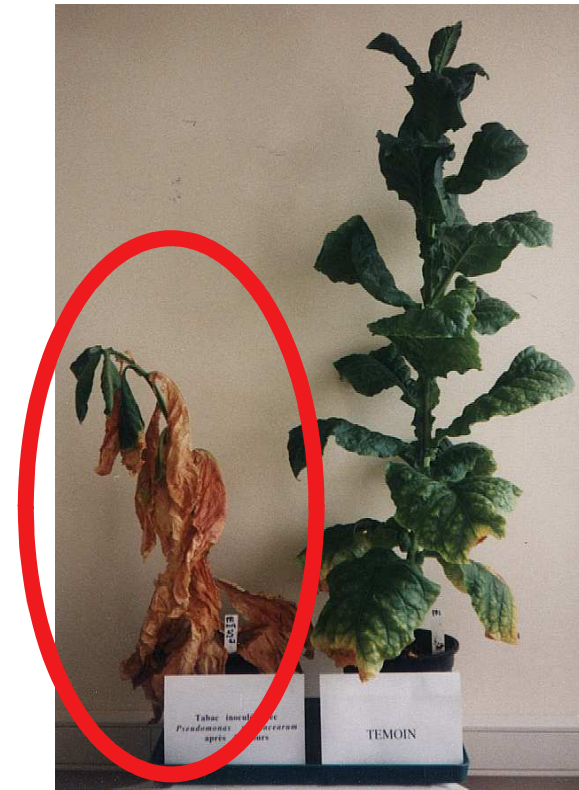
## HGT *in planta*: the pathosphere

*Ralstonia solanacearum*: Plant pathogen

*Acinetobacter* BD413 : soil bacteria opportunist  
colonizator



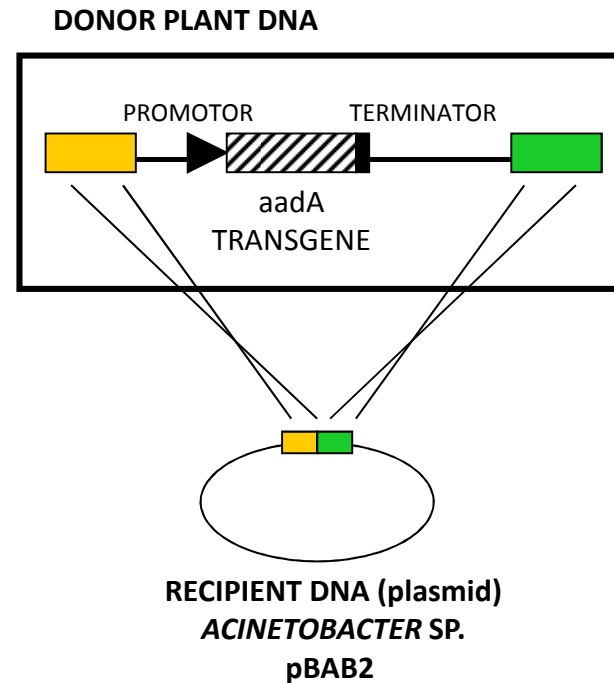
**Transformants *in planta***



Kay et al., 2002. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 68:3345-3351.

# Is there any requirement for transgene transfer?

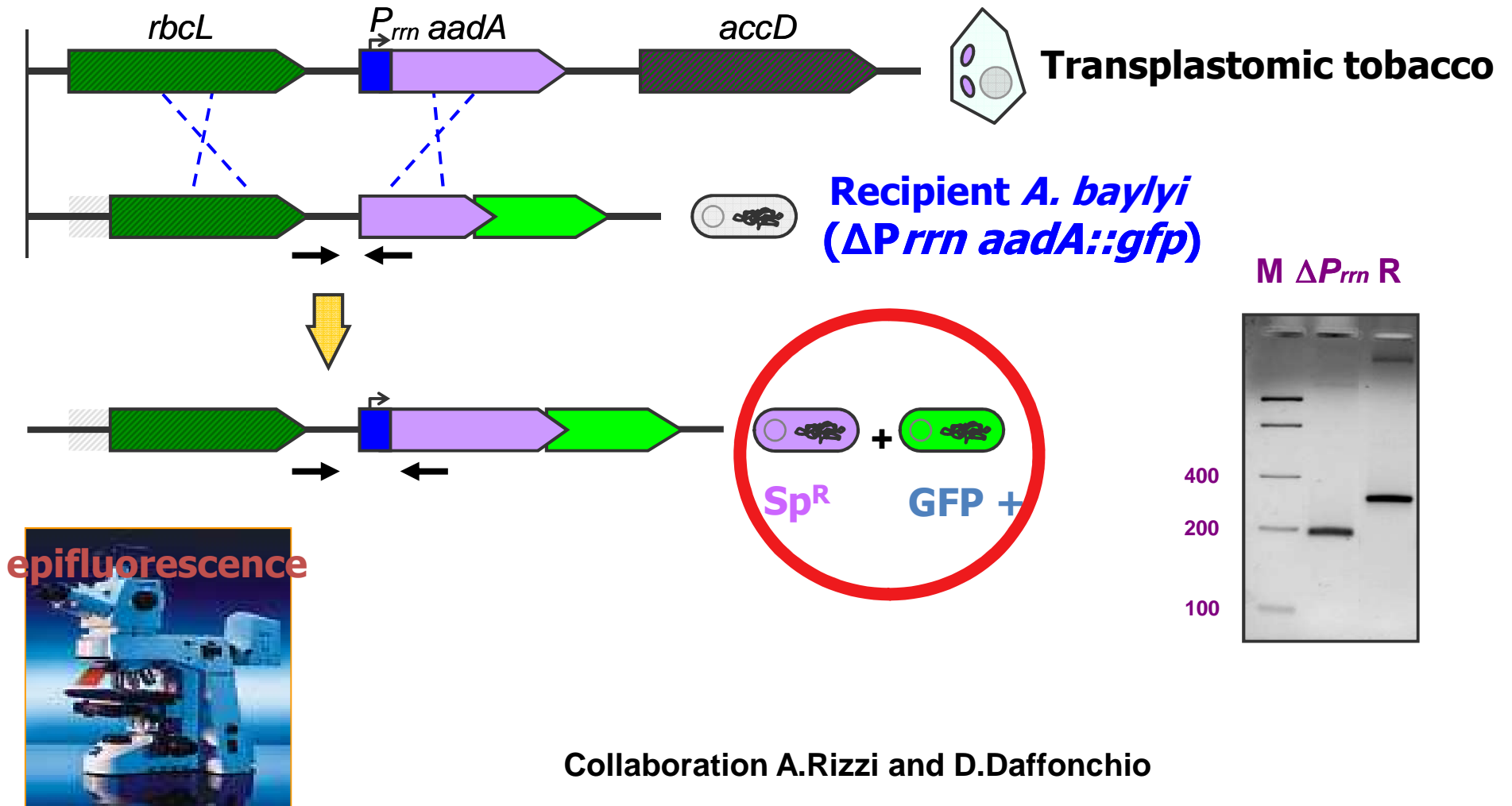
**YES**



- **Transgene origin (Prokaryote)**
- **Sequence homology between the bacterium and the transgene**

# VISUALIZATION OF HGT IN PLANTA

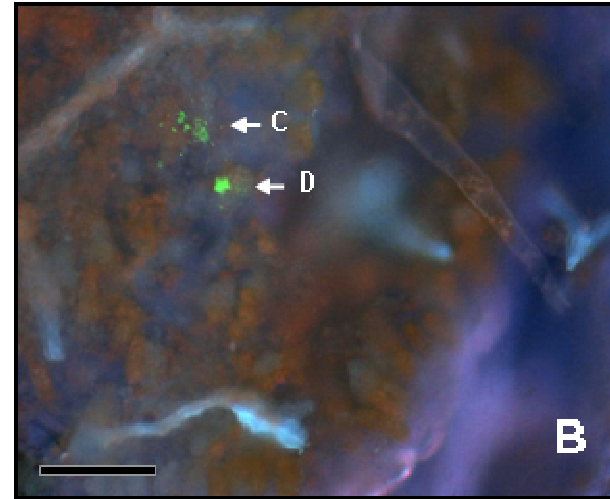
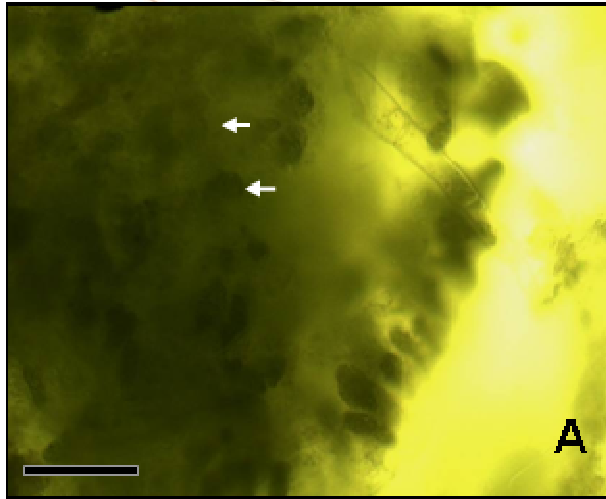
## Construction of a "bioreporter" *A. baylyi* BD413 strain



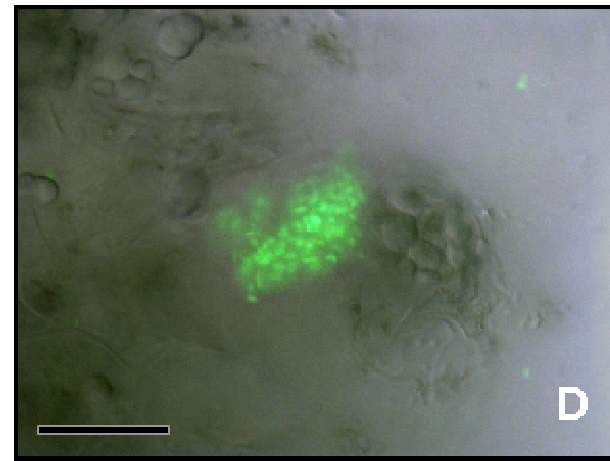
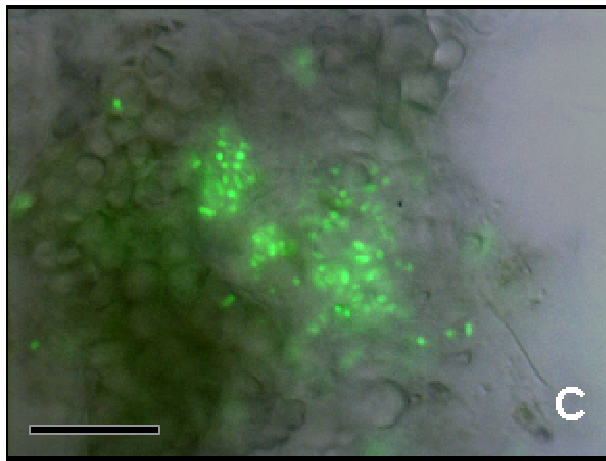
# Visualization of transformants in the residuesphere

Les rencontres  
scientifiques de l'Anses  
Restitution du programme national de  
recherche environnement santé travail

(A)  
Bright-field image,  
arrows point at the  
localization of  
transformants. (A,  
B: bars = 50  $\mu\text{m}$ ).



(B)  
Epifluorescence  
micrograph showing  
transformants (green)  
chloroplasts (red) and  
veins (cyan).

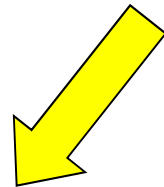


(C, D) Details showing cell clusters of *A. baylyi* transformants expressing the GFP after restoration of the promoter activity through horizontal gene transfer between the plant and the bacteria. (A, B: bars = 50  $\mu\text{m}$ ; C, D: bars = 20  $\mu\text{m}$ ).

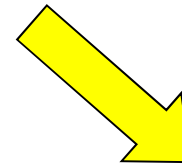
**A. Pontiroli, A. Rizzi, P. Simonet, D. Daffonchio, T.M. Vogel and J.-M. Monier.** Visual evidence of horizontal gene transfer between plant and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* (submitted)

## TRANSGENIC PLANT IMPACT ON SOIL BACTERIA ?

*Antibiotic resistance genes*



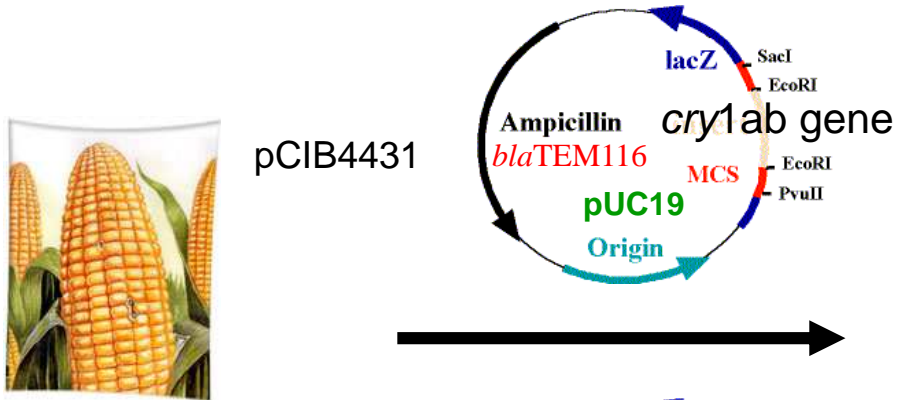
***Cultivable approach***



***Metagenomic approach***

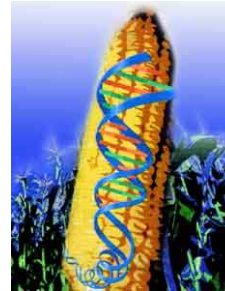
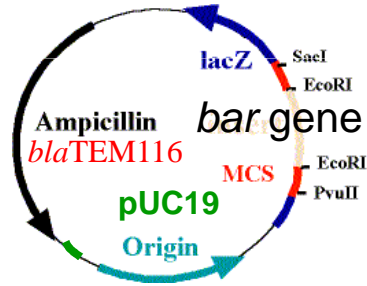


# ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA IN A TRANSGENIC PLANT FIELD



*Zea mays* L.

pCIB3064



Event Bt176

*bla* under a prokaryotic promoter

~About 10 copies

Field samples

Field with transgenic Bt 176 corn (*bla*TEM-116) 10-years culture

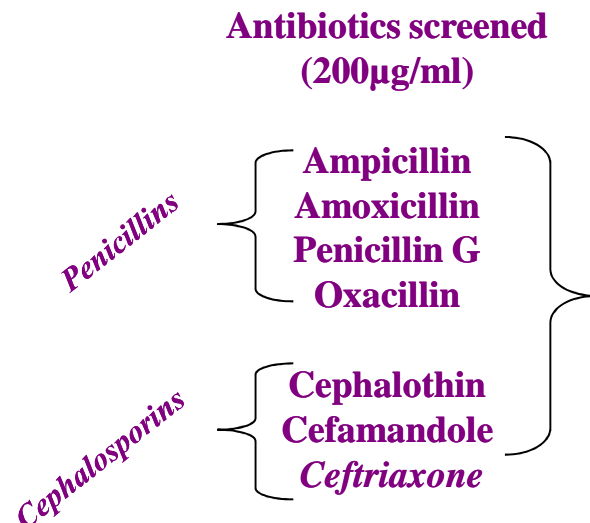




# Ampicillin resistance in soil bacterial isolates

576 ampicillin-resistant strains were isolated from soil samples (96 isolates per soil sample).

Soil sample	Amp-resistant bacteria (% of total bacteria)
Transgenic field 1	6.5
Transgenic field 2	0.4
Control field 1	8.0
Control field 2	5.5
Prairie 1	69.6
Prairie 2	54.4



99% of ampicillin-resistant strains were resistant to these antibiotics

## Presence of *bla* genes in ampicillin-resistant isolates

Soil sample	Presence of <i>bla</i> gene (% of Amp-R bact.)
Trangenic field 1	89
Transgenic field 2	96
Control field 1	100
Control field 2	73
Prairie 1	100
Prairie 2	90

***bla* genes were present in almost all  
resistant isolates in the 3 soils, including the  
*blaTEM116* gene**

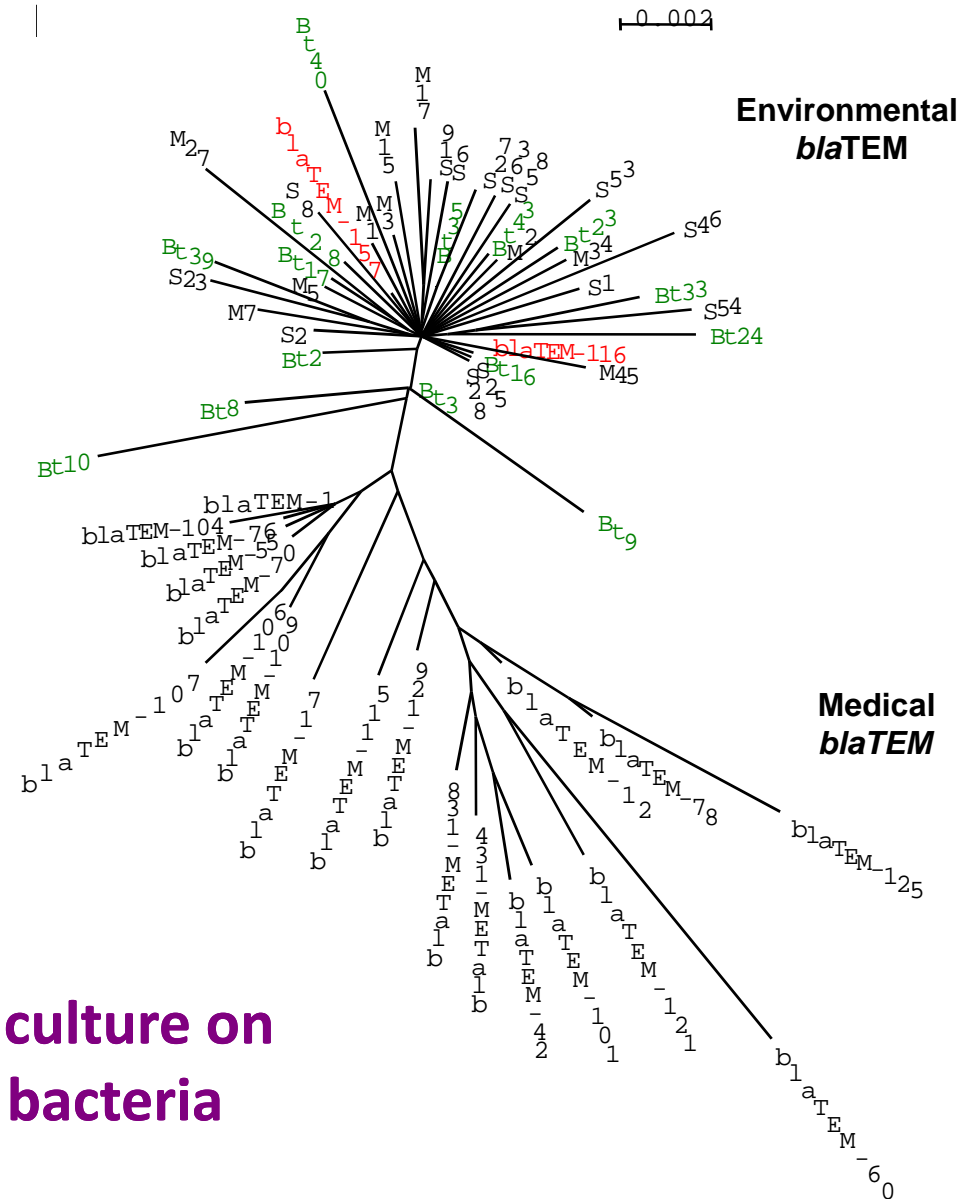
# Diversity of *bla*TEM genes in soils

Metagenomic approach  
=  
DNA extracted from soil

153 different *bla*TEM sequences were found  
in the PCR-amplified bacterial DNA.

10 sequences from transgenic and  
prairie soil were the *bla*TEM116 gene,  
confirming its natural occurrence in  
environmental bacteria.

**No effect of transgenic plant culture on  
antibiotic resistance in soil bacteria**

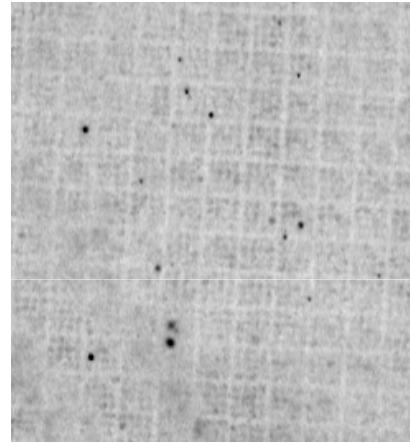




# Metagenomic bioexploration

**Metagenomic prairie soil DNA library**  
**77 000 clones (35-40 kb inserts)**  
(Libragen, Toulouse, France)

**Colony hybridization on high density membrane**



**Target genes:**

(PCR-<sup>33</sup>P)

*aadA*

*accD*

*rbcL*

*bar*

*bla*

*cry*

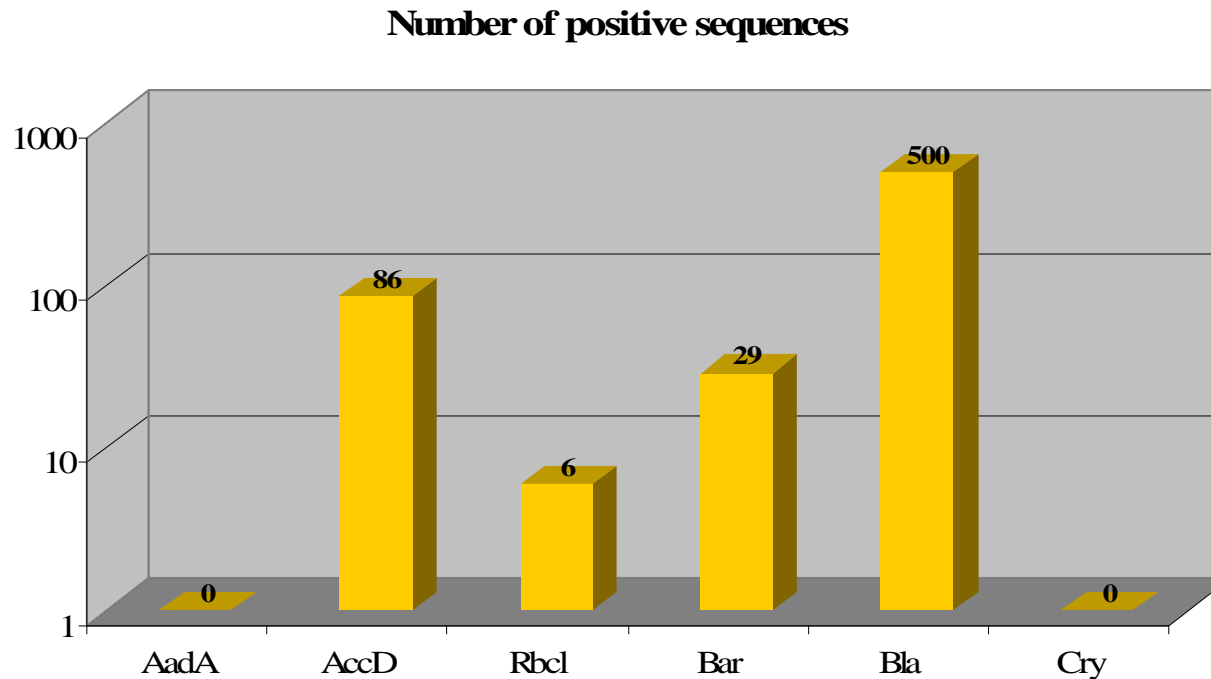
**Positive clones selection**

**Pyrosequencing of pooled clones**

(GATC Biotech, Constanz Germany)

**Targeted Meta-data**

## Natural presence of transgenic sequence in soil DNA



➔ **Bacterial sequences similar to chloroplastic DNA are naturally present in soils (*accD*, *rbcL*)**

➔ **The *bla* and *bar* genes are naturally present in soil bacteria, whereas the *aadA* and *cry* genes were not detected in this soil**

## CONCLUSIONS (1)

√ Indigenous bacteria possess a wide diversity of genes

√ Soil **IS** a reservoir of genetic determinants that could allow bacteria to adapt rapidly to present and future environmental conditions!

**This risk has to be neglected not because these genes cannot be transferred but because the plethora of genes already present in soil bacteria and the constant evolution to which they are subjected.**

## CONCLUSIONS (2)

### Transgenic plant DNA Transfer to bacteria:

Occurrence ?

Probable

Evidenced *in vitro* and *in planta*

Not easy to detect in Fields

« Transgene » specific

Impact ? Depending on genes

Natural biodiversity

# Metagenomics DNA

- Cloning efficiency.
- Robots available.
  - Handling of clones, screening, DNA extraction
- Sequencing technologies
  - Sanger, pyrosequencing
  - FLX ( $10^8$  bases per run, 500 bp),
  - Solexa-Illumina ( $10^9$  bases per run, 36 bp),
  - Solid, Helicos etc.
  - » [omics](#) [Pushing Toward a \\$1,000 Genome](#)
- Informatics, bio-informatics.
  - RAST Metagenomic server (Seed) etc. 0



## Publications scientifiques issues du projet

- Demanèche S, Sanguin H, Poté J, Navarro E, Bernillon D, Mavingui P, Wildi W, Vogel TM and Simonet P. 2008 Antibiotic resistant soil bacteria in transgenic plant fields. Proc Natl Acad. Sci. USA 105: 3957-3962.
- Demanèche S, David M, Navarro E, Simonet P and Vogel TM . 2009. Evaluation of functional gene enrichment in a soil metagenomic clone library. J. Microbiol. Methods 76: 105-07.
- Demanèche S, Philippot L, David M, Navarro E, Vogel TM and Simonet P. 2009. Soil Bacteria Denitrification Gene Cluster Characterization via a Metagenomic Approach. Appl. Environ. Microbiol.75 : 534-537.

## 1. Présentation des travaux dans des congrès nationaux et internationaux

### ➤ **Nine<sup>th</sup> international congrès "BAGECO" (Bacterial Genetics Ecology).**

23–27 juin 2007, Wernigerode, Allemagne

Poster:

Antibiotic Resistance in Soil Bacteria related to Transgenic Plants Impact: a Field Study (Demanèche, Poté, Sanguin, Bernillon, Mavingui, Wildi, Vogel, Simonet)

### ➤ **Troisième colloque AFEM d'Ecologie Microbienne.**

15-18 octobre 2007, La Grande Motte, France.

Poster

Résistances bactériennes aux antibiotiques dans les sols. (Demanèche, Poté, Sanguin, Bernillon, Mavingui, Wildi, Vogel, Simonet).

### ➤ **Second symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE).**

17- 19 décembre 2007, Tours, France.

Communication orale (30 min anglais)

The Metagenomic Search for Antibiotic Resistance in Soil (Sapkota, Demanèche, Navarro, Simonet, Vogel)

Poster:

Antibiotic Resistance Soil Bacteria in Transgenic Plant Field (Demanèche, Sanguin, Poté, Navarro, Bernillon, Mavingui, Wildi, Vogel, Simonet).

### ➤ **Séminaire de l'AFIS (Association française pour l'Information Scientifique) intitulé : Biotechnologies et Agriculture Durable : Un post-Grenelle de l'environnement.**

17 janvier 2008, Palais du Luxembourg, Sénat, Paris.

Conférence orale invitée (20 min anglais):

« Résistance aux antibiotiques dans les bactéries du sol. Impact des plantes transgéniques (maïs Bt176). » (Pascal Simonet)

### ➤ **Twelve<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology (ISME 12).**

18 août-22 août 2008, Cairns, Australie

Poster:

Functional Gene Enrichment from Hybridized Clones from Metagenomic Clone Libraries. (S. Demanèche, L. Philippot, El. Navarro, M. David, A. Faugier, P. Simonet, and T. M. Vogel).



**Les rencontres  
scientifiques de l'Anses**

Restitution du programme national de  
recherche environnement santé travail



## Traitement de la Légionellose

- ❖ Les macrolides (l'érythromycine) et les nouveaux macrolides (azithromycine).
- ❖ Les fluoroquinolones +++: activité supérieure aux macrolides *in vitro* et dans les modèles animaux.
- ❖ La rifampicine.
- ❖ La durée du traitement: 21 jours en moyenne.

### MAIS:

échecs et rechutes à l'arrêt de traitements

développements de résistances?

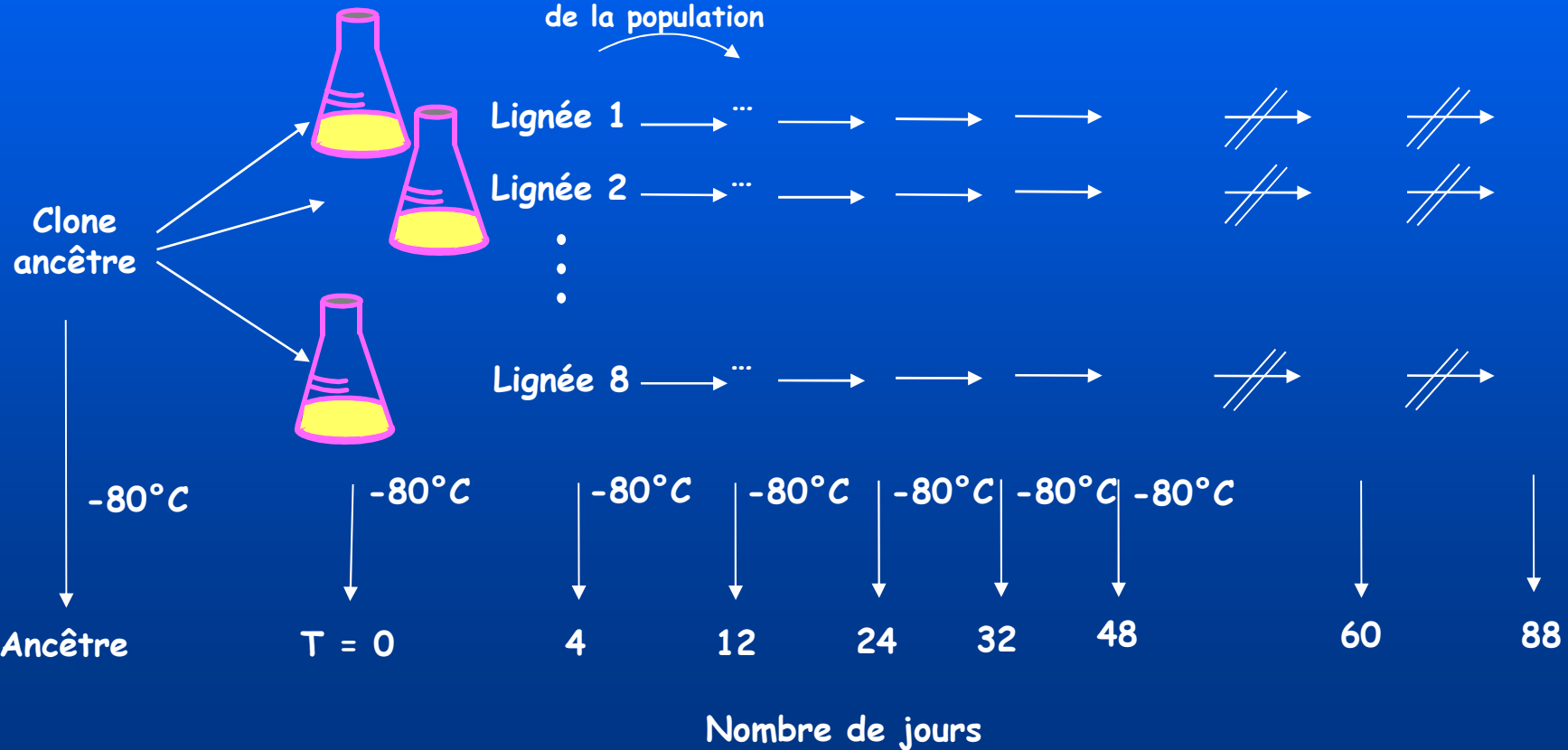
# Evolution de résistances accrues

Concentrations croissantes en antibiotique  
= MOXIFLOXACINE (fluoroquinolone)

x2048  
CMI  
initiale

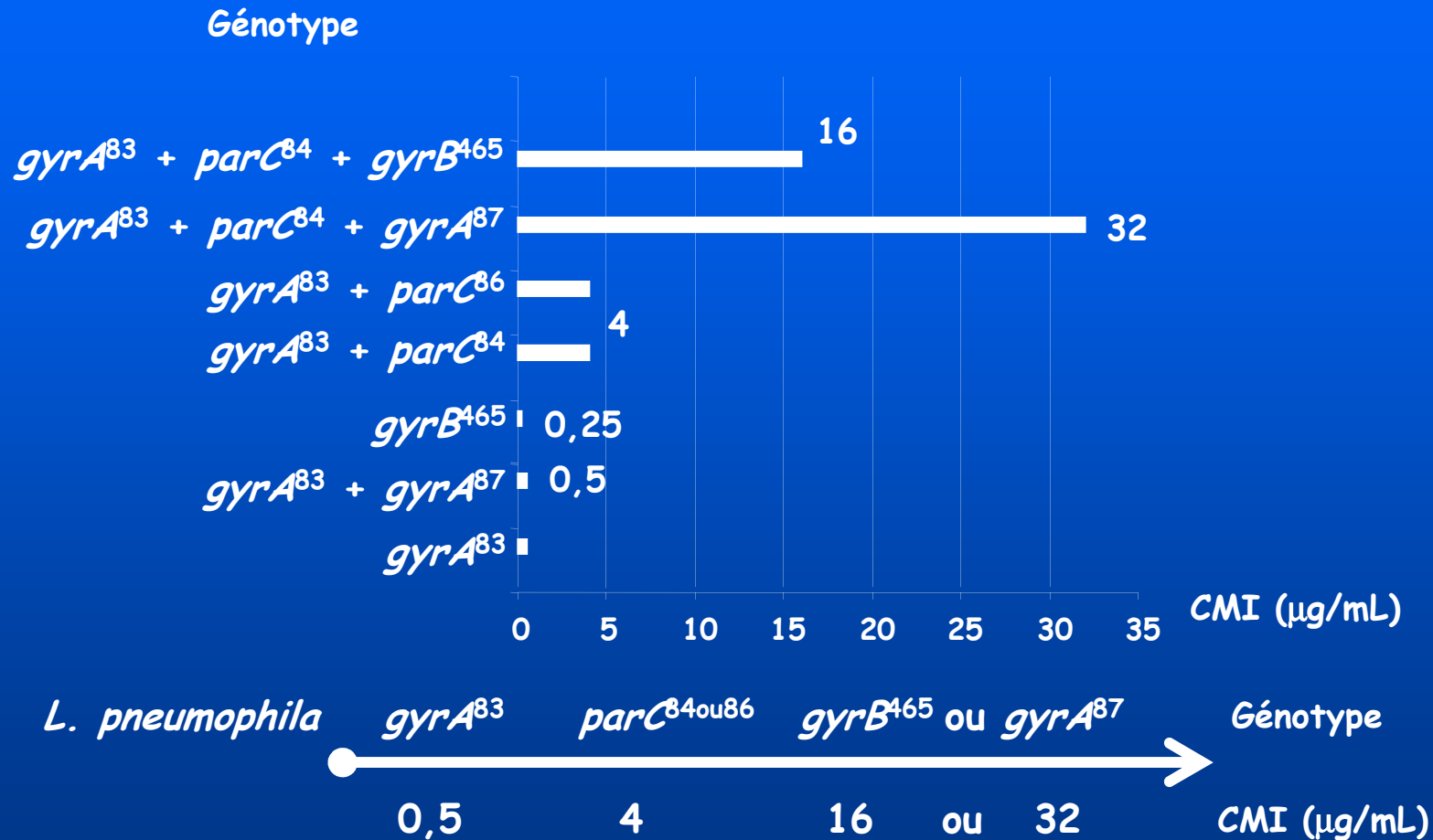
8 lignées  
identiques

Repiquage d'1 fraction  
de la population



## Evolution de résistances accrues

Reconstruction des mutations dans le contexte génétique de la souche *Legionella pneumophila* de départ, sensible aux antibiotiques.  
 CMI (souche de départ) = 0,06 µg/mL.



Importance de l'ordre des mutations: l'addition de *gyrA*<sup>87</sup> n'augmente pas La CMI dans toutes les souches.



**Les rencontres  
scientifiques de l'Anses**

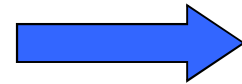
Restitution du programme national de  
recherche environnement santé travail



## Développement d'une technique de PCR en temps réel permettant la détection de mutants *gyrA* chez *L. pneumophila*

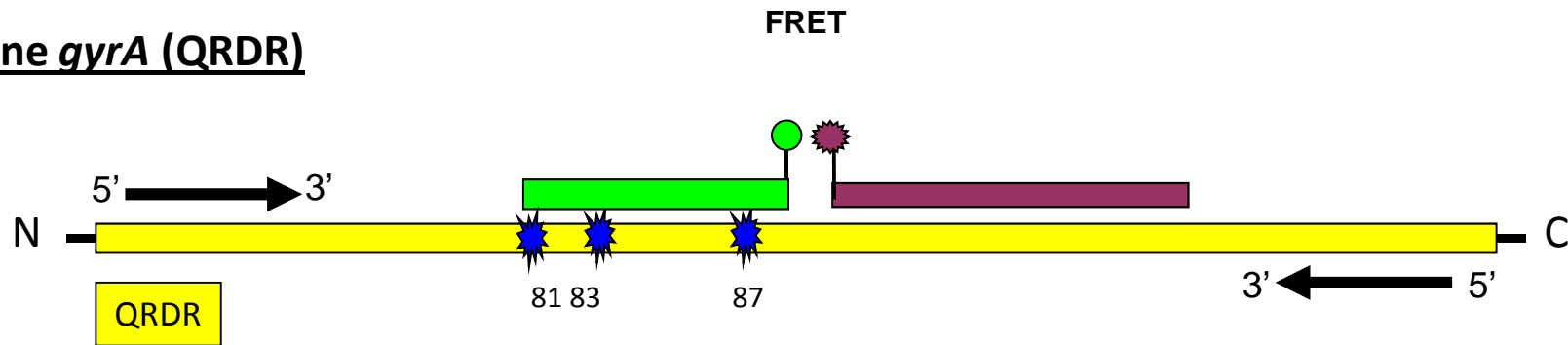
### Nécessité d'une technique :

- Sans culture
- Rapide
- Sensible et spécifique



PCR en temps réel  
(LEG*gyrA*-rtPCR)

### Gène *gyrA* (QRDR)



### position des codons 81 83 87 97

<b>Paris</b>	GGG	GAT	ACA	GCT	GTT	TAT	GAC	ACC	ATT	GTT	CGT	ATG	GCC	CAA	CCT	TTT	TCC
<b>Corby</b>	GGG	GAT	ACA	GCT	GTT	TAT	GAC	ACT	ATT	GTC	CGT	ATG	GCC	CAA	CCT	TTT	TCC
<b>Lorraine</b>	GGG	GAT	ACA	GCT	GTT	TAT	GAC	ACT	ATT	GTT	CGT	ATG	GCT	CAA	CCT	TTT	TCC
<b>Lens</b>	GGG	GAT	ACA	GCT	GTT	TAT	GAC	ACT	ATT	GTT	CGT	ATG	GCT	CAG	CCC	TTT	TCC
<b>Philadelphia</b>	GGG	GAT	ACA	GCT	GTT	TAT	GAC	ACT	ATT	GTT	CGT	ATG	GCT	CAG	CCC	TTT	TCC

Sonde capteur

Sonde d'ancrage

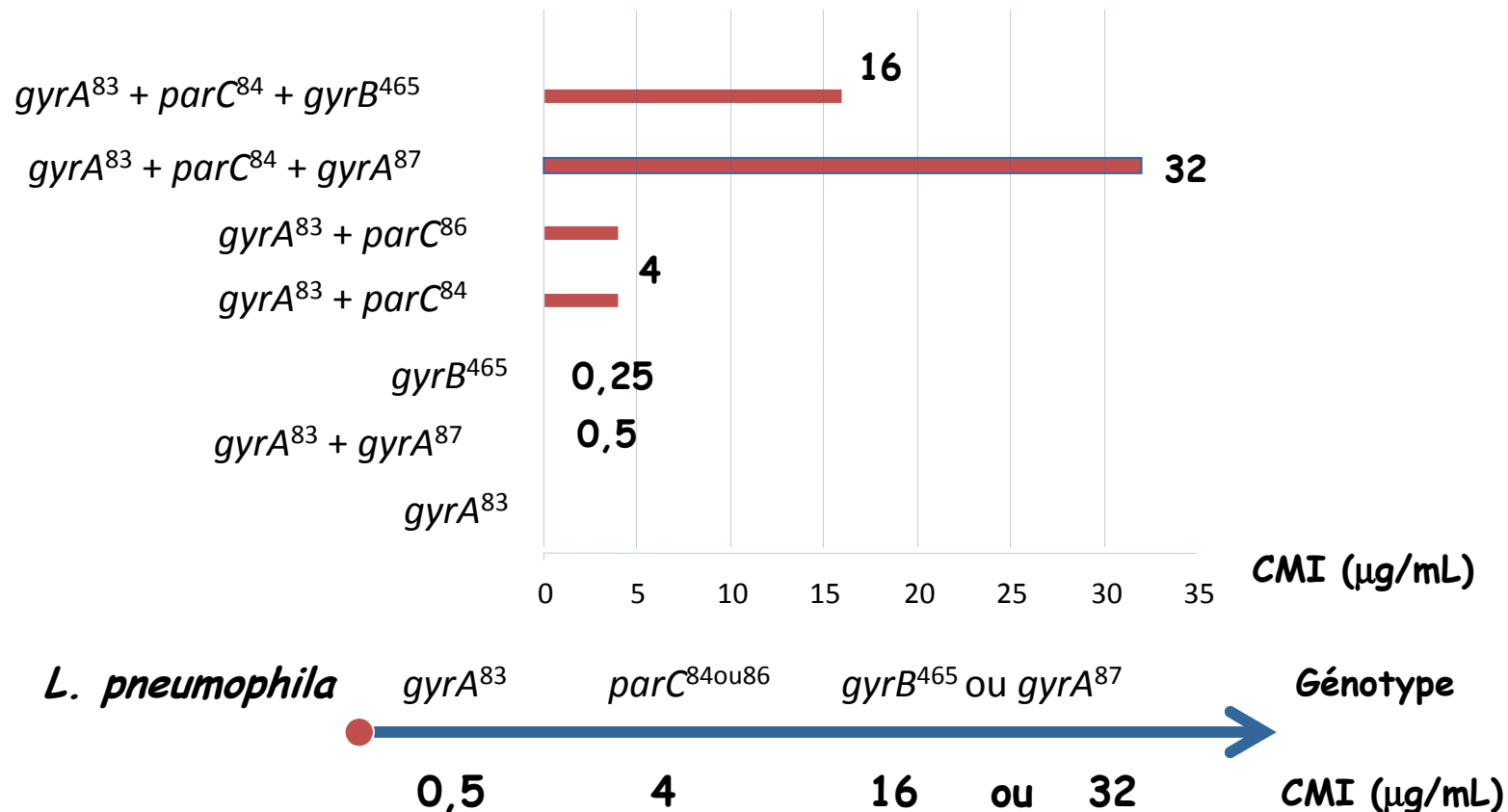


## Evolution de résistances accrues

Les rencontres scientifiques de l'Anses  
Restitution du programme national de recherche environnement santé travail

Reconstruction des mutations dans le contexte génétique de la souche *Legionella pneumophila* de départ, sensible aux antibiotiques. CMI (souche de départ) = 0,06 µg/mL.

### Génotype



Importance de l'ordre des mutations: l'addition de *gyrA*<sup>87</sup> n'augmente pas La CMI dans toutes les souches.