



# Interprétation des données du séquençage de nouvelle génération et perspectives

Philippe Glaser

Unité EERA



# Le séquençage haut débit pour l'analyse des clones à dissémination mondiale

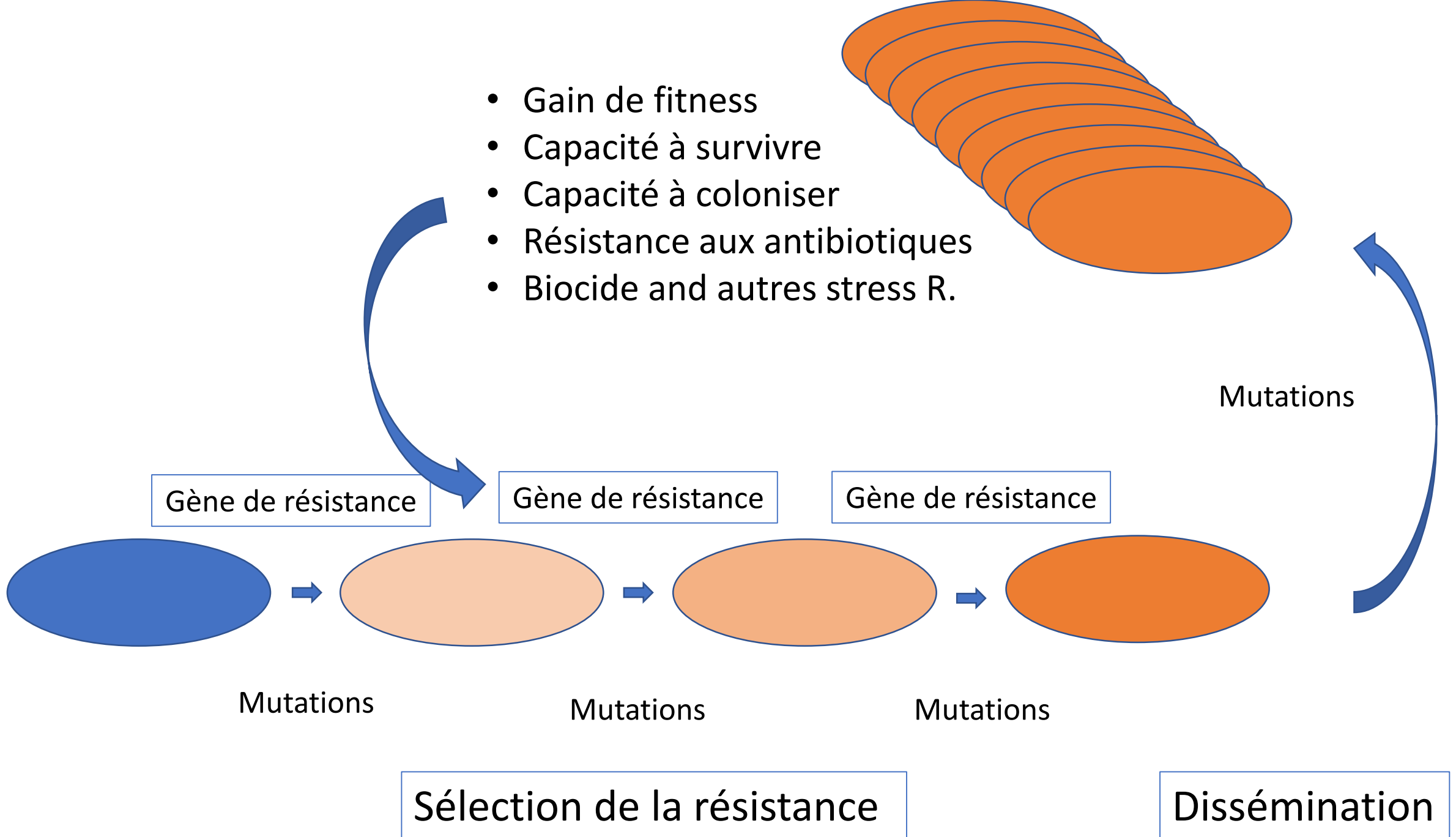
Philippe Glaser

Unité EERA

# Données NGS – applications en microbiologie clinique et pour la surveillance

- Analyse d'un isolat
  - Identification de l'espèce
  - Identification des gènes de résistance
  - Identification de facteurs de virulence
  - Typage moléculaire (identification du MLST type)
- Analyse d'une épidémie
  - Caractériser l'épidémie
  - Identification de la source
  - Caractériser la chaîne de transmission
- Epidémiologie moléculaire:
  - Diversité au sein d'une espèce
  - Identification de clones dominants
  - Caractériser les raisons de l'émergence d'un clone

- Gain de fitness
- Capacité à survivre
- Capacité à coloniser
- Résistance aux antibiotiques
- Biocide and autres stress R.

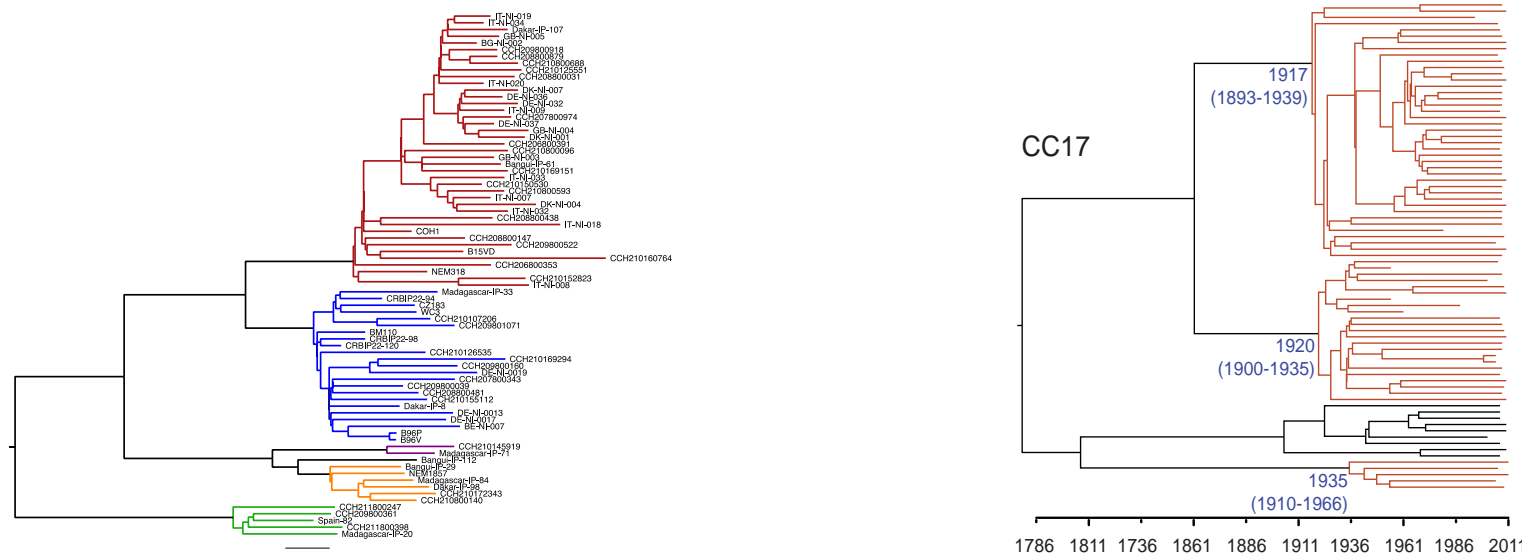


# Analyse de la dissémination d'un clone

- Epidémiologie moléculaire
  - Quantification (% d'échantillons positifs)
  - Typage moléculaire – Séquençage du génome complet (WGS)
  - Analyse dynamique dans le temps et dans l'espace
- Caractérisation des isolats et des clones
  - Phénotype – antibiogramme, fitness
  - Origine (infection ou portage)
  - Génotype – WGS
    - Gènes de résistance aux antibiotiques
    - Mutations (résistance and fitness)

# Méthodes d'analyse des données WGS

- Assemblage de novo du génome
- Mapping des lectures sur un génome de référence
- Identification de mutations
- Phylogénie – Maximum de vraisemblance et Bayessienne



⇒ Relation entre les isolats: reconstruction de la transmission

⇒ Prédiction des fonctions impliquées dans la sélection et la dissémination

# Clones bactériens pathogènes et résistance aux antibiotiques

- *Escherichia coli* ST131 : Résistant aux Fluoroquinolones, ESBL (CTX-M15)
  - *Klebsiella pneumoniae* CG258: carbapénèmase KPC
  - *Staphylococcus aureus* USA300: résistant à la méthicilline
  - *Clostridium difficile* 027: Résistant aux Fluoroquinolones
- ...

# Clones bactériens pathogènes et résistance aux antibiotiques

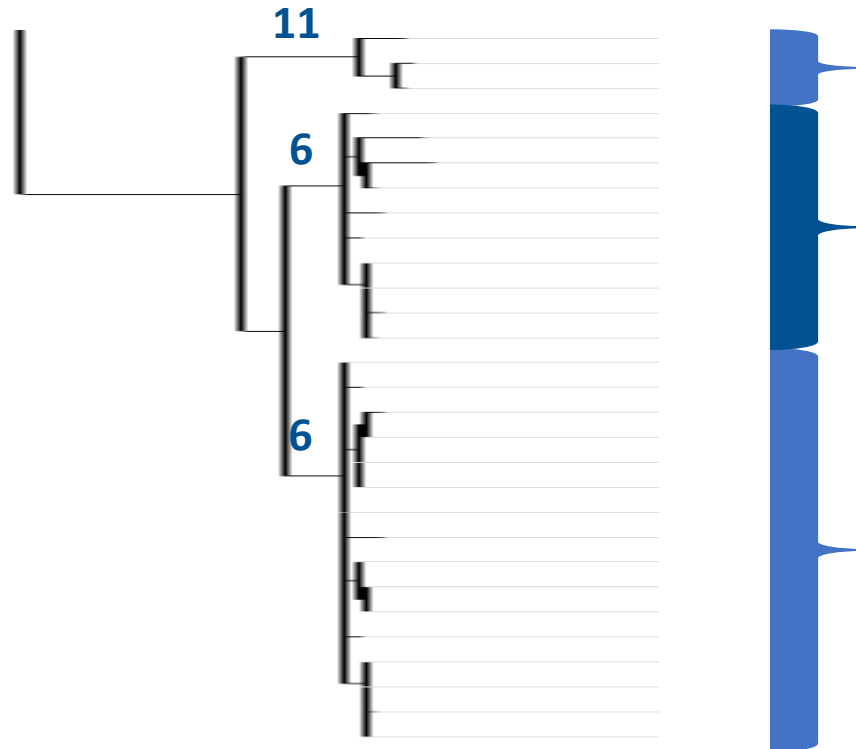
- *Escherichia coli* ST131 : Résistant aux Fluoroquinolones, ESBL (CTX-M15)
- *Klebsiella pneumoniae* CG258 : carbapénèmase KPC
- *Staphylococcus aureus* USA300 : résistant à la méthicilline
- *Clostridium difficile* 027: Résistant aux Fluoroquinolones
- Streptocoque du groupe B

...

# *Staphylococcus aureus* USA300 - analyse d'une épidémie dans un centre de soin

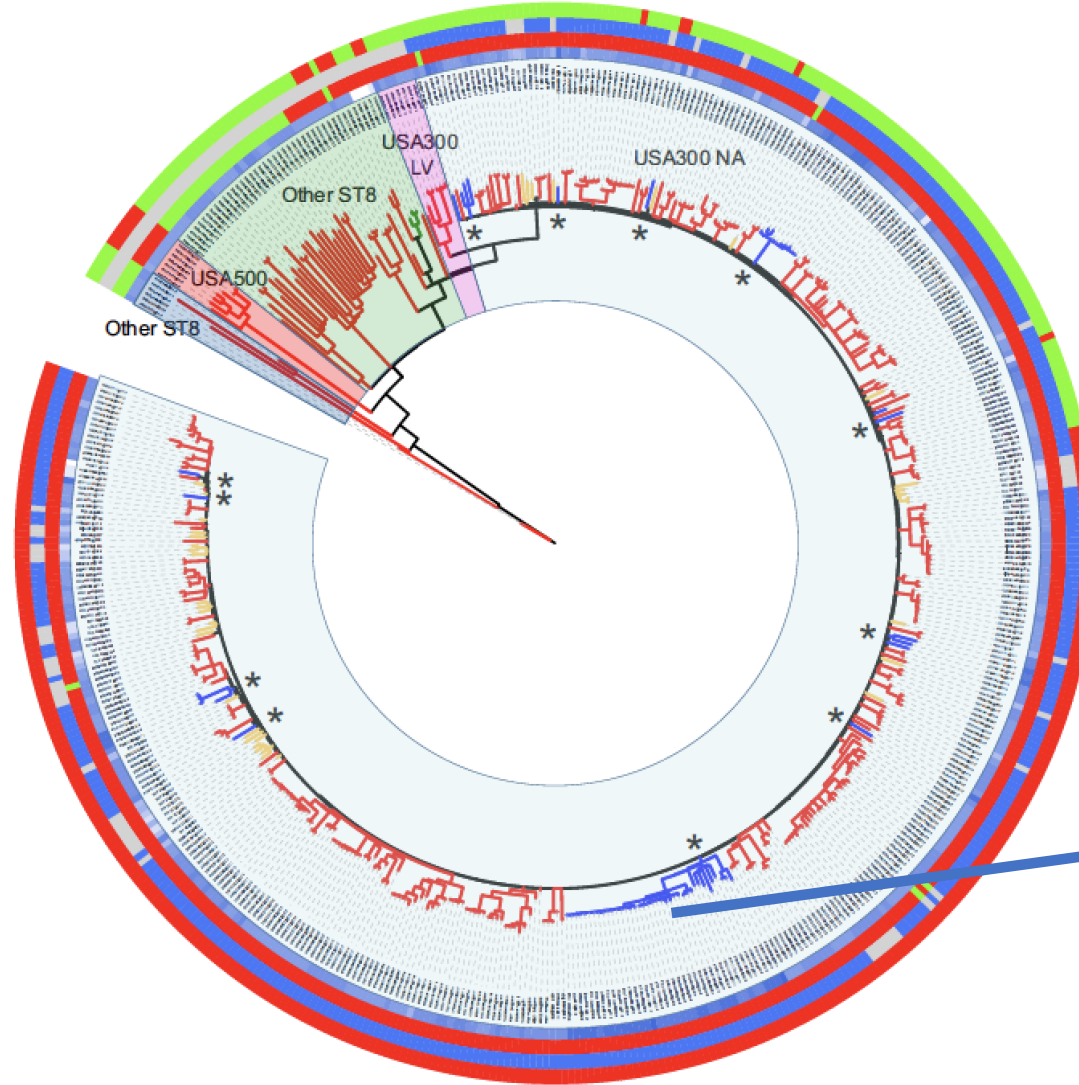
- Les SARM constitue une menace en communautaire et à l'hôpital
- Le clone USA300 du lignage ST8 représente 90% des SARM communautaires aux US
- Epidémie à SARM USA300 dans un hôpital parisien
- Epidémie communautaire lié à une crèche au Puy en Velay
- Séquence de 28 souches de l'hôpital parisien, 10 souches du Puy en Velay et 27 souches non reliées.

# Phylogénie des souches du centre de soin

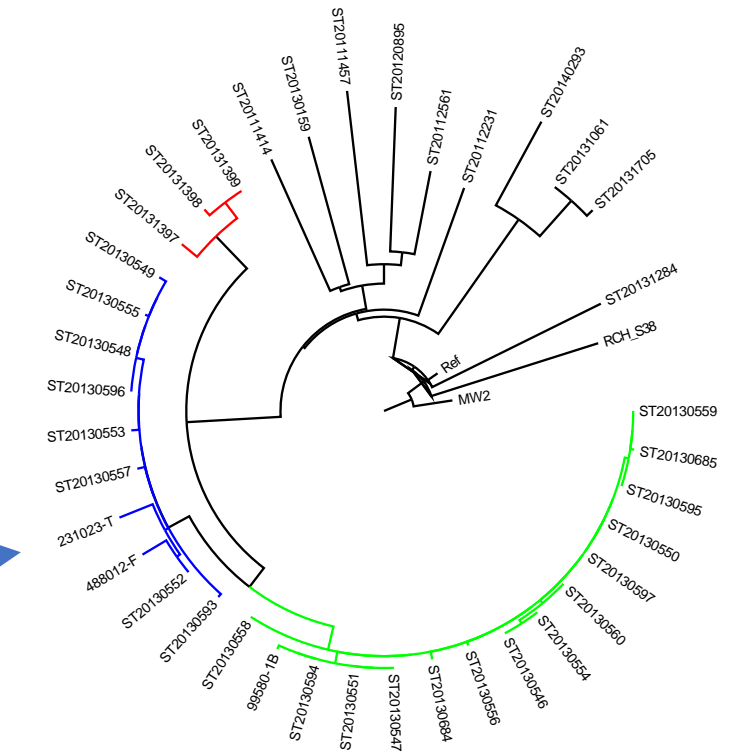


- ⇒ Diversité au cours de l'épidémie sans lien avec le moment d'isolement
- ⇒ Une seule ou plusieurs importations d'une souche USA300 dans le centre de soin?

# Phylogénie Globale du clone USA300



Fluroquinolone resistant ■

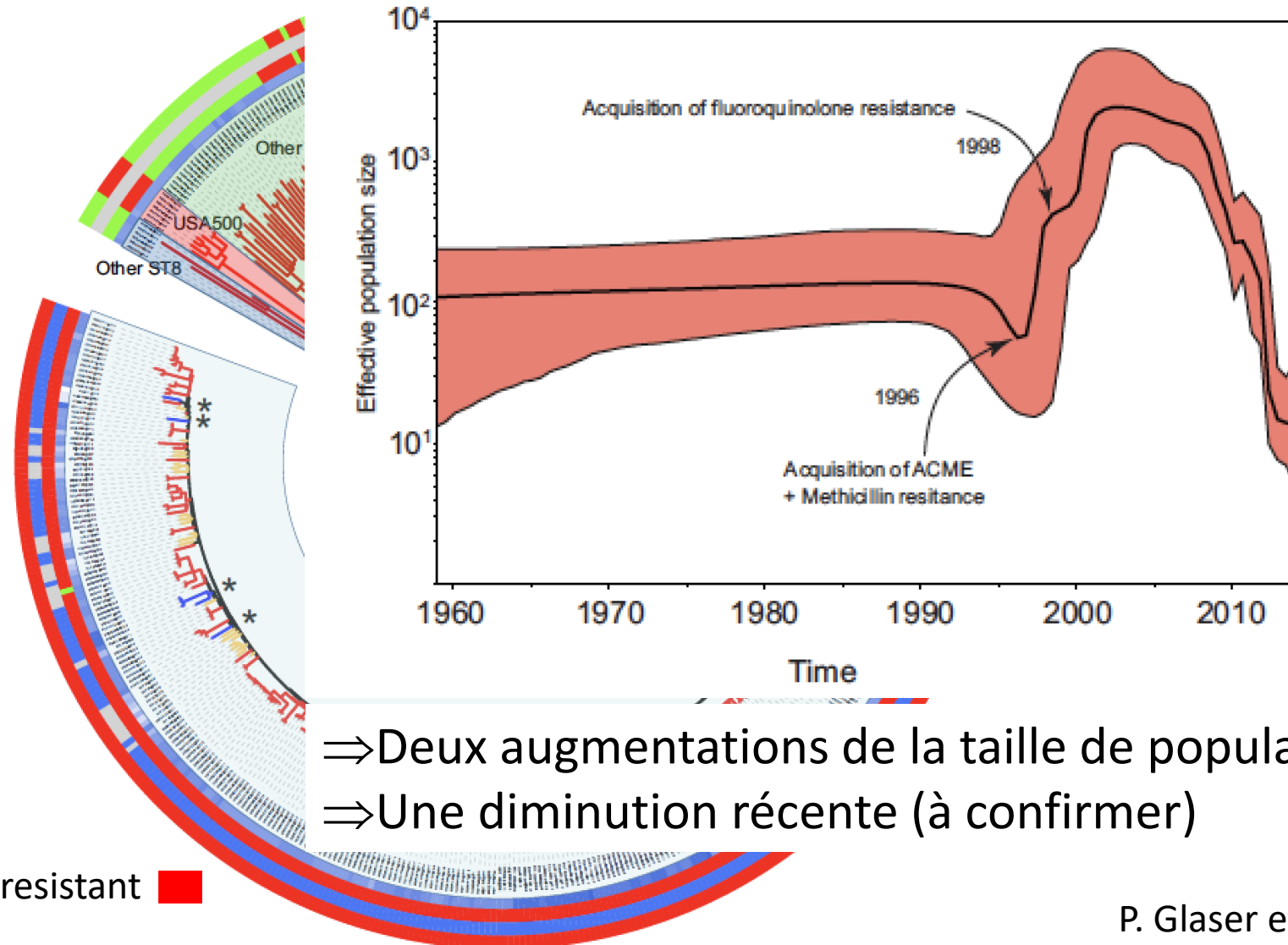


⇒ Importations multiples de souches USA300 en France

⇒ Pas de signe d'expansion

# Démographie du clone USA300

## Importance de la sélection par les antibiotiques



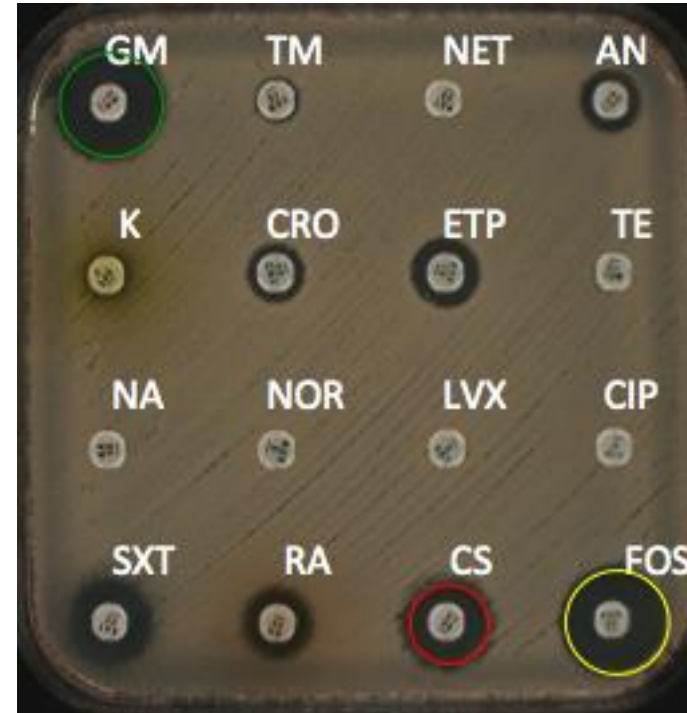
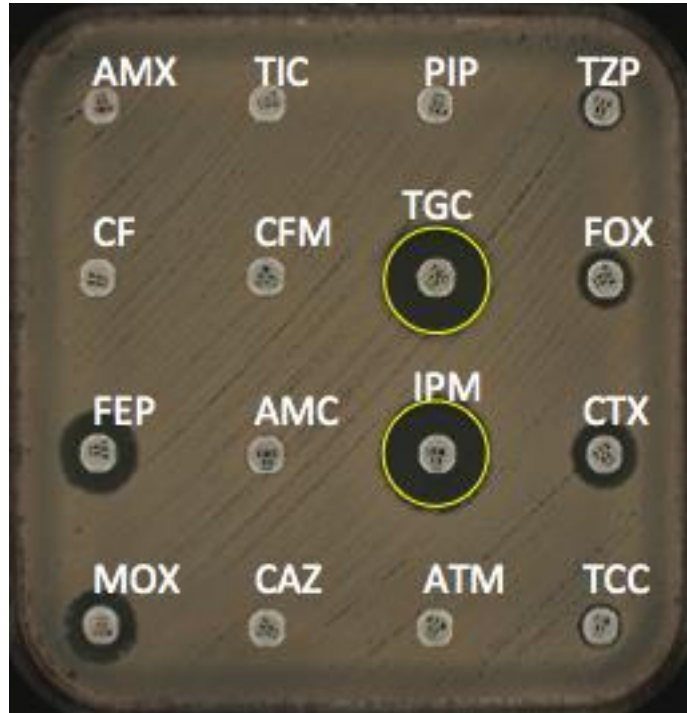
*Klebsiella pneumoniae*: le groupe clonal 258:  
des souches multi résistantes adaptées à l'hôpital

## 4,5 années d'évolution d'une souche *K. pneumoniae* ST258 chez un patient

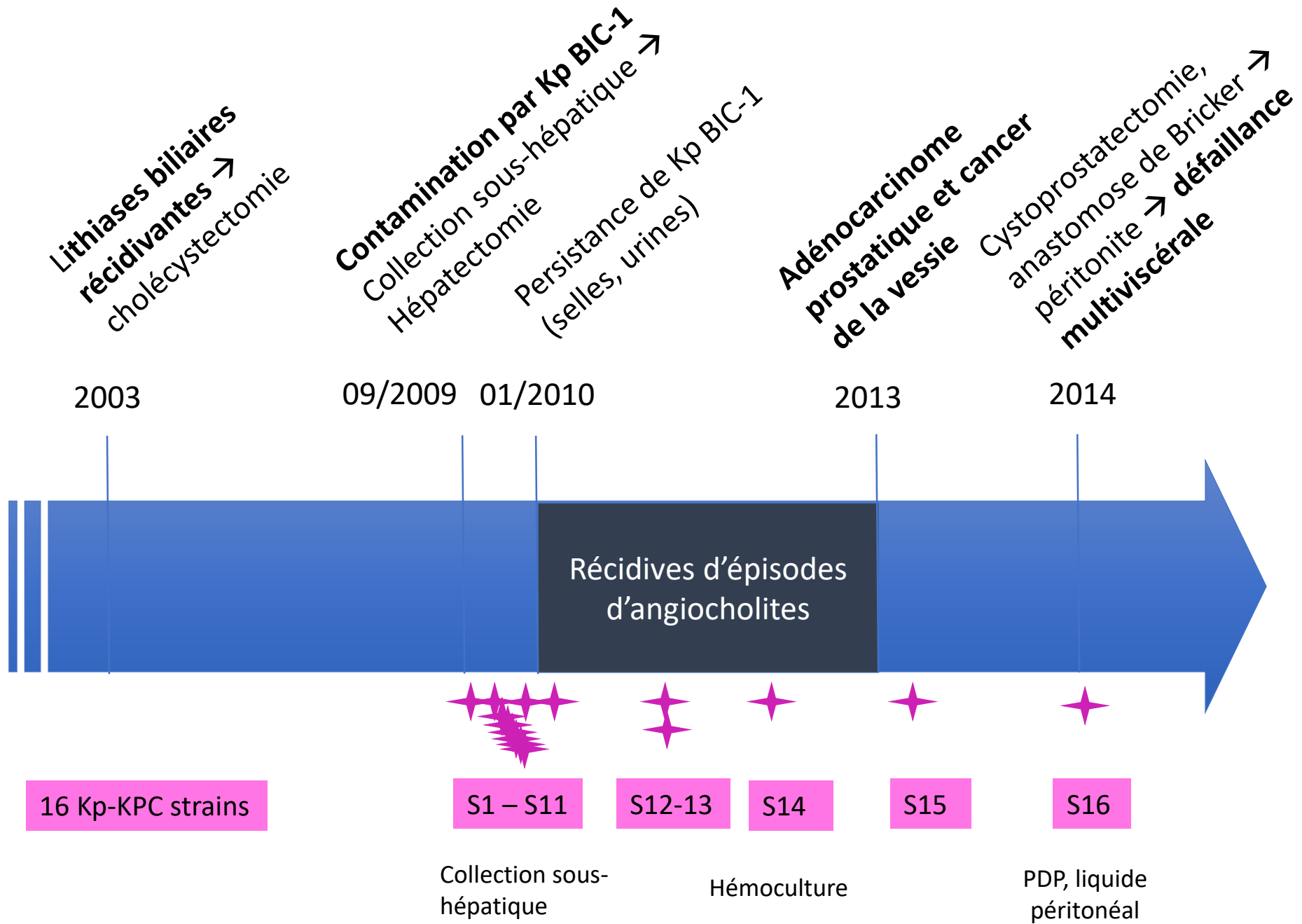
- Un endoscope contaminé par une souche de *K. pneumoniae* exprimant la carbapenemase KPC
- 17 gastroscopies avec cet endoscope
- 13 patients porteurs de *Kp*-KPC et 4 infectés
- Un patient (S) avec 4,5 années de portage et d'infection



# La souche *K. pneumoniae* KPC BIC-1 de l'endoscope



- Résistante à la colistine sensible à la gentamicine  
ST-258

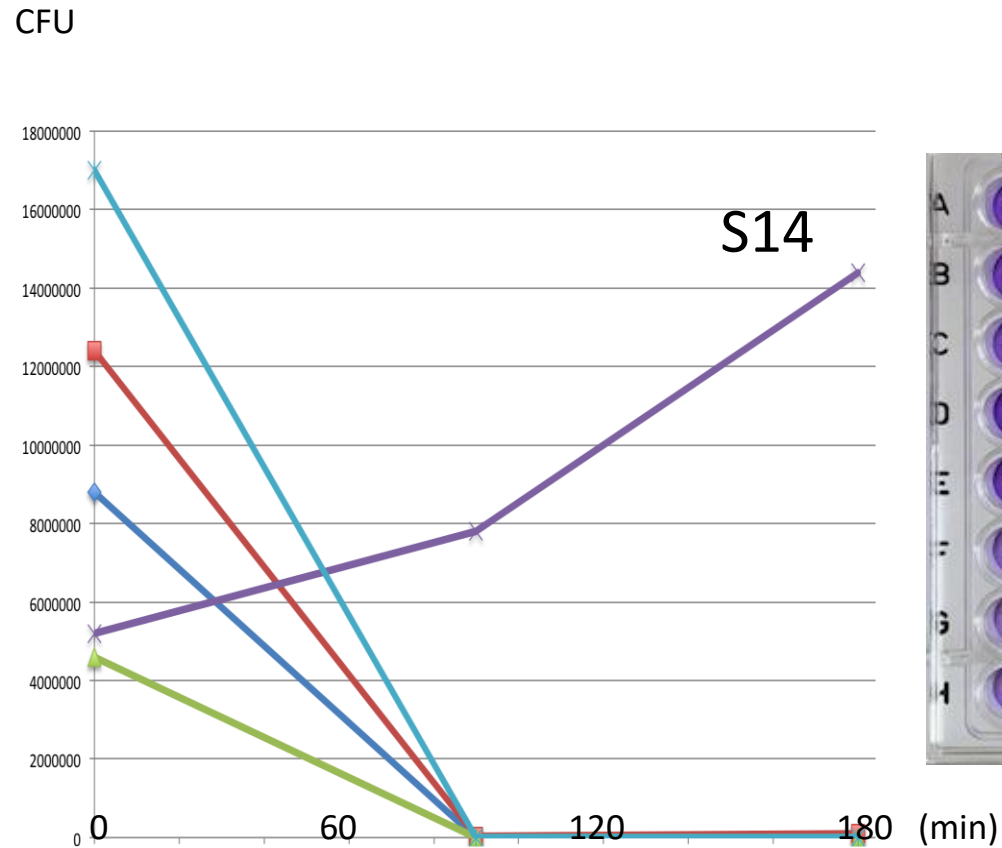


# Evolution de la résistance aux antibiotiques au cours du portage

		Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Colistin	Gentamicin
S1	2009-09-29	24	2	8	128	1,5
S2	2009-10-12	12	1,5	4	64	1,5
S3	2009-10-13	16	1,5	6	64	2
S4	2009-10-14	12	1,5	4	64	1,5
S5	2009-10-16	12	1,5	4	32	1,5
S6	2009-11-03	12	1,5	4	64	8
S7	2009-11-11	12	0,75	3	64	12
S8	2009-11-16	12	1	4	64	12
S9	2009-11-21	12	1	4	64	12
S10	2009-11-23	12	1	4	64	8
S11	2010-01-15	16	1	4	64	2
S12	2011-07-29	>32	3	8	0,5	1,5
S13	2011-07-29	24	2	8	0,5	1,5
S14	2012-08-23	8	1	3	0,25	12
S15	2013-06-04	32	2	12	0,5	1,5
S16	2014-04-29	12	1,5	6	0,5	1,5

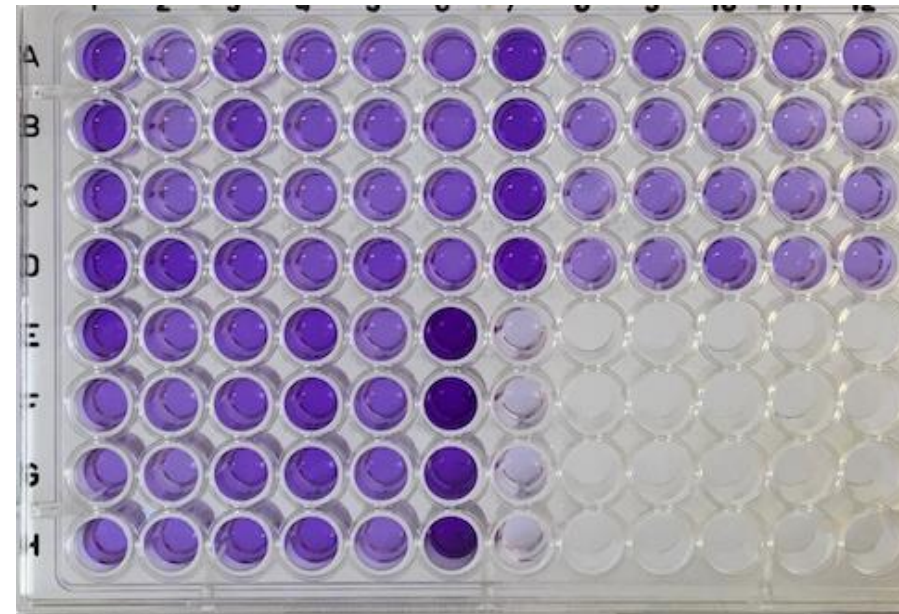
# Diversification phénotypique

## Survie dans le sérum humain

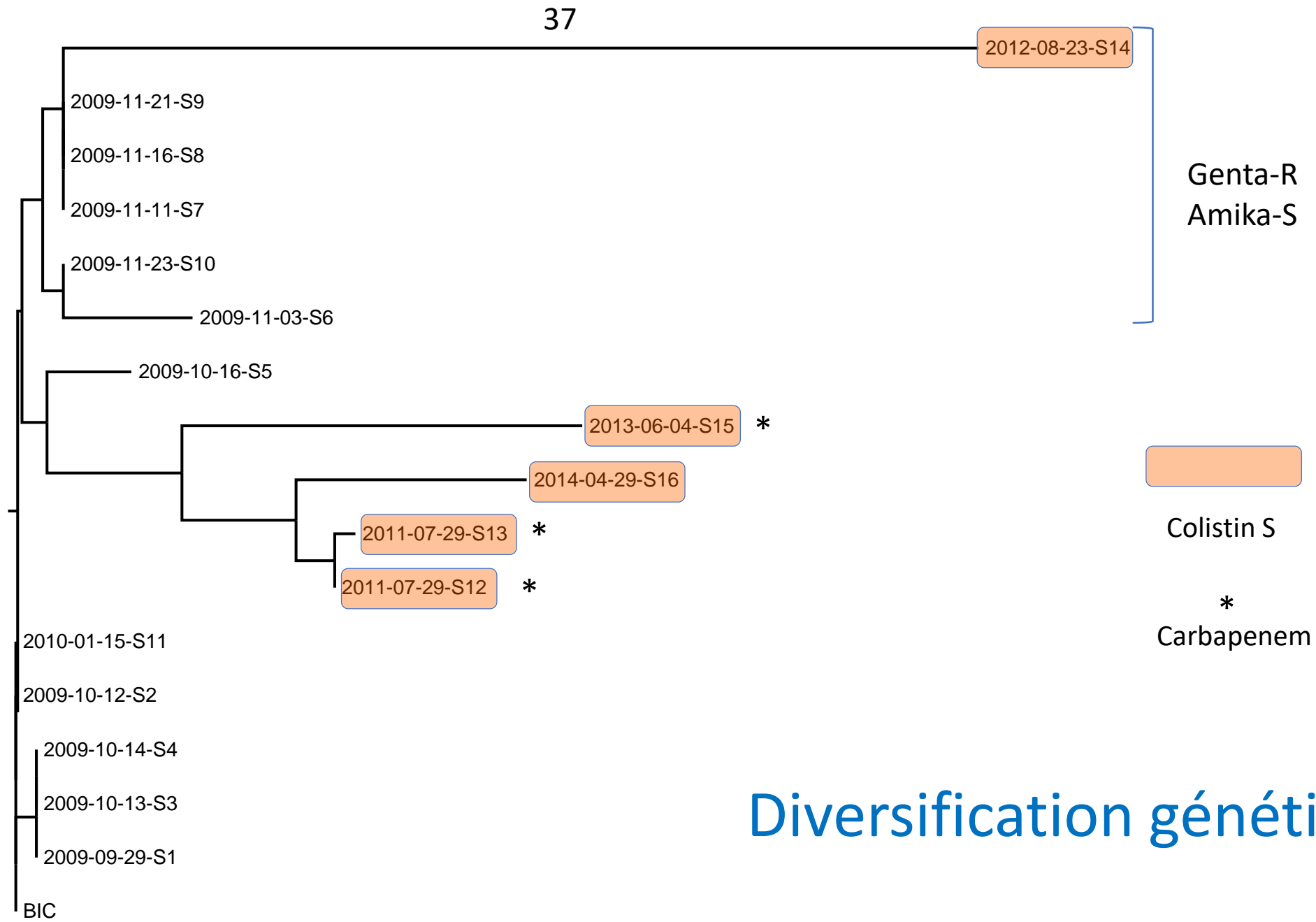


## Production de biofilm

S6R



K+



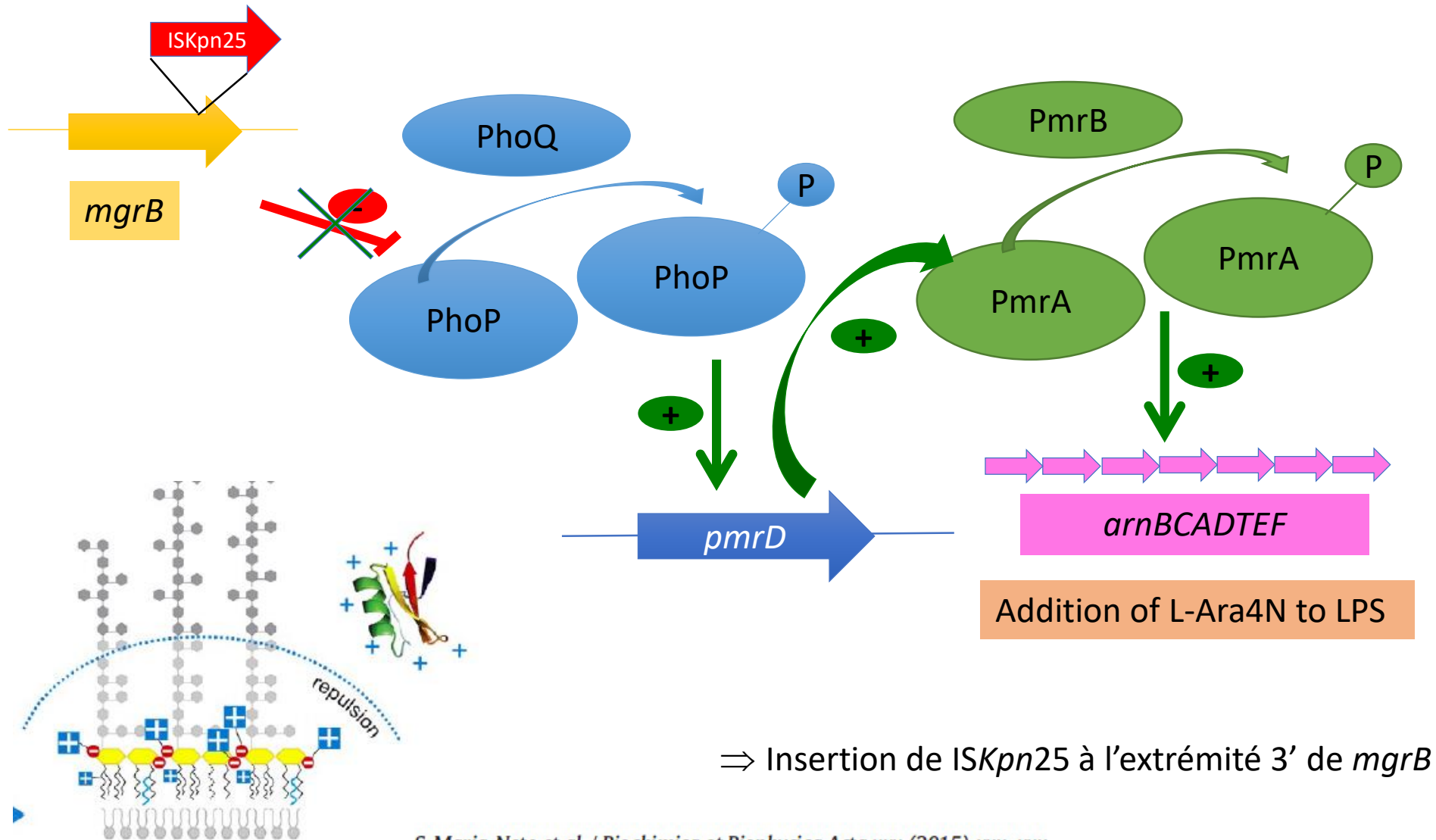
# Diversification génétique

# Evolution Gentamicine R => Amikacine S

- Aminoglycoside N(6')-acetyltransferase type 1
    - Leu 119 : Genta-S et Amika-R
    - Ser 119 : Genta-R et Amika-S
- ⇒ Clonage des deux versions du gène chez *E. coli*
- Même phénotype que chez Kp

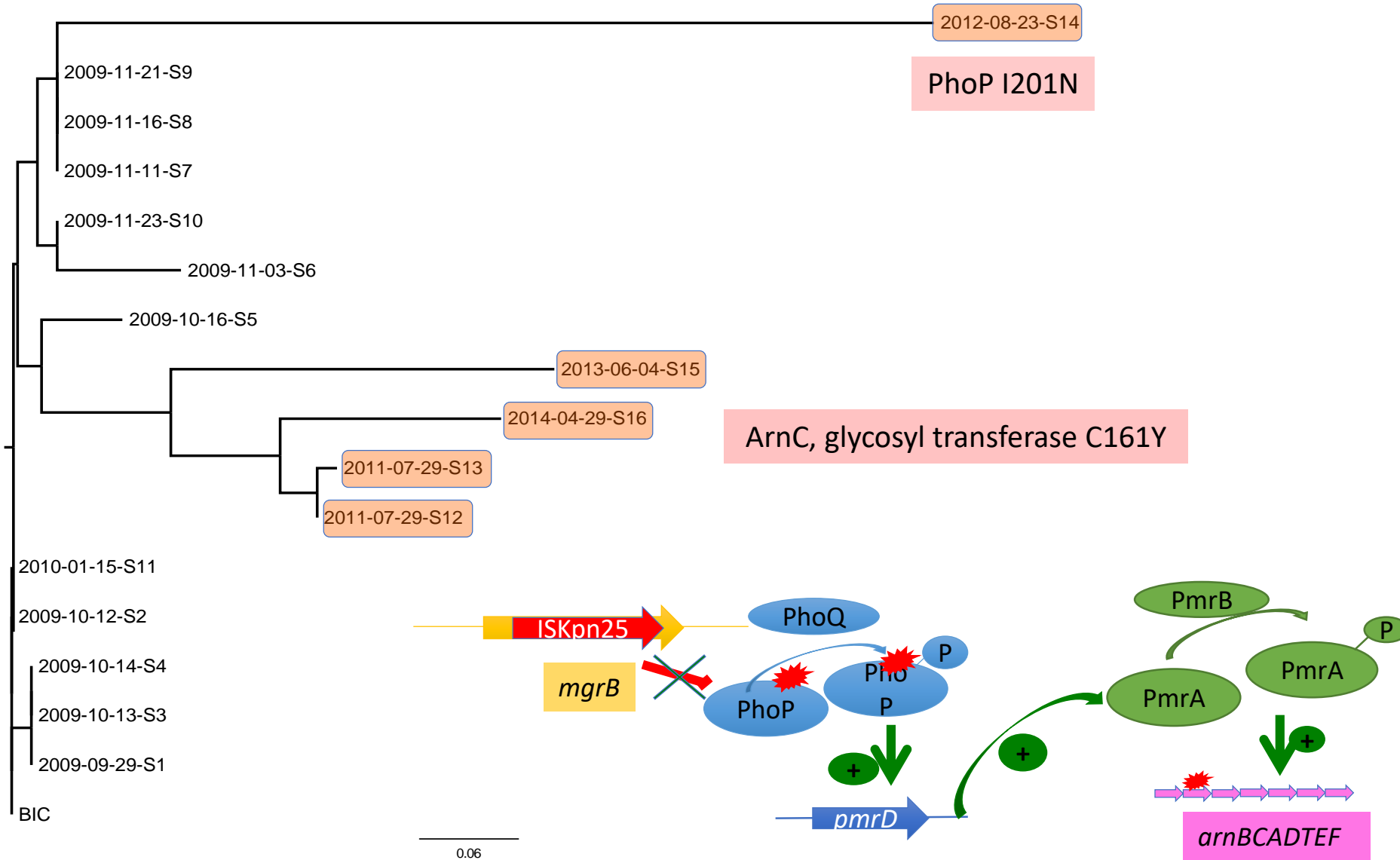
A spontaneous point mutation in the *aac(6')-Ib'* gene results in altered substrate specificity of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of a *Pseudomonas fluorescens* strain 🔒

# Résistance à la colistine: voie de signalisation



⇒ Insertion de *ISKpn25* à l'extrémité 3' de *mgrB*

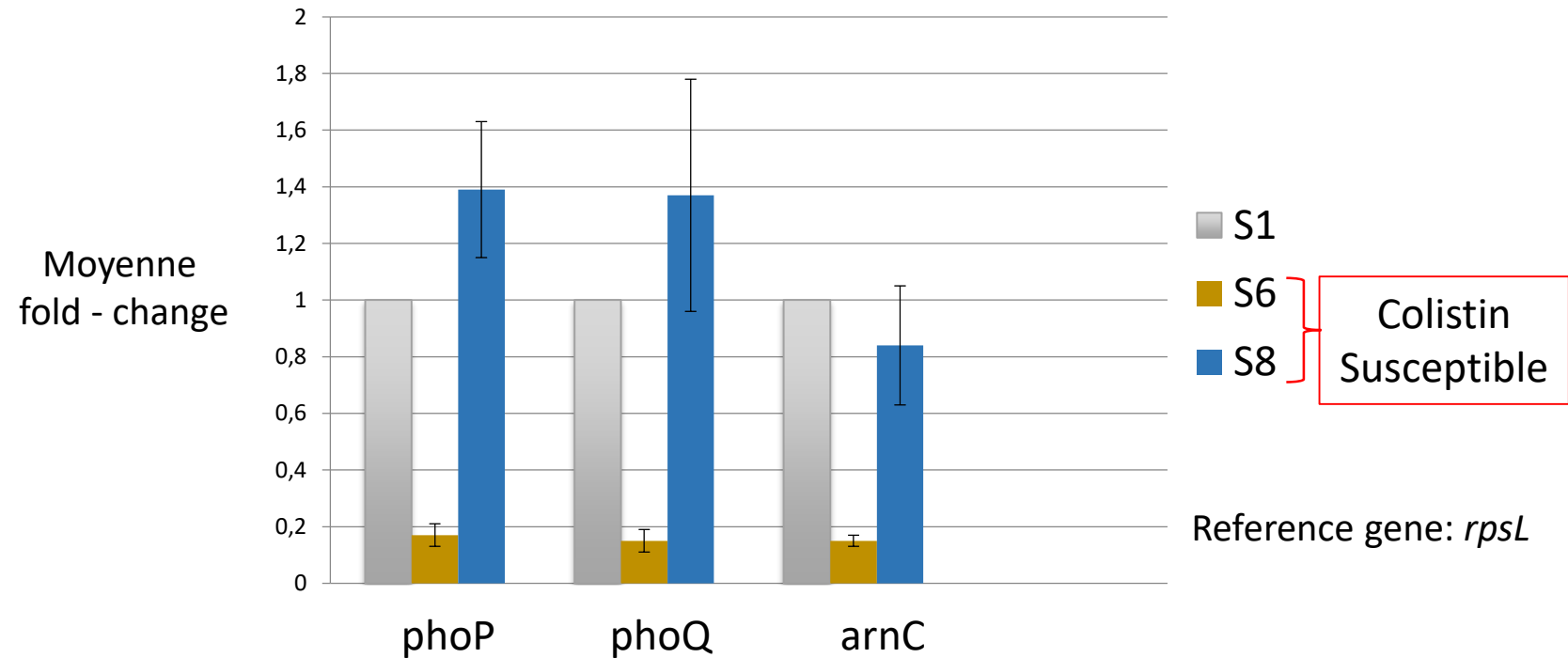
# Réversion de la résistance à la colistine



# Impact des mutations sur les cibles de PhoP-PhoQ

→ qRT-PCR on *phoP*, *phoQ*, *arnC* on strains:

- S1 *mgrB*::ISKpn25 (reference)
- S6 *mgrB*::ISKpn25 - PhoP I201N
- S8 *mgrB*::ISKpn25 – ArnC C161Y



Souche S6 : diminution de 7 fois de l'expression de *phoP*, *phoQ* et *arnC*

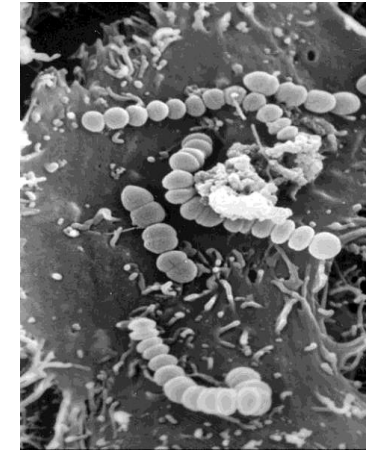
# Conclusions

- Cas le plus long décrit d'une colonisation par une souche de *K. pneumoniae*
- Après 2 ans, la souche évolue de manière significative et se diversifie. Le séquençage de plusieurs isolats est nécessaire.
- La résistance à la colistine et sa réversion récapitulent la régulation de la modification du lipide A
- Cette réversion réduit le coût de l'hyper-modification du lipide A.

# Emergence des infections néonatales à streptocoque du groupe B

# *S. agalactiae* ou streptocoque du groupe B (GBS)

- Pathogène opportuniste
- Homme
  - Commensal des tractus digestif et urogénital
  - Cause principale d'infections néonatales
  - Emergent au cours des années 1960s–1970s
  - Risque pour les personnes âgées et immuno affaiblies



- Spectre d'hôte large chez l'animal
  - Infections de la mamelle (bovins)
  - Infections invasives dans des élevages de poissons (épidémies)

# *S. agalactiae* ou streptocoque du groupe B (GBS)

- Pathogène opportuniste
- Homme
  - Commensal des tractus digestif et urogénital
  - Cause principale d'infections néonatales
  - **Emergent au cours des années 1960s–1970s**
  - Risque pour les personnes âgées et immuno affaiblies



- Spectre d'hôte large chez l'animal
  - Infections de la mamelle (bovins)
  - Infections invasives dans des élevages de poissons (épidémies)

# Etudes des populations de SGB

Study	Origin	Nb of isolates	CC1 (ST1)	CC8-10	CC17	CC19 (ST19, 28)	CC23	CC26	other
Jones	World	152	16% 14%	18%	30%	17% 13 - 2%	12%	2%	4%
Luan	Sweden	158	15% 9%	13%	24%	29% 20%	14%	0	4%
Manning	USA	338	29% 25%	18%	8%	17% 14%	25%	0,3%	2%
Bohnsack	Canada	899	16% 10%	9%	10%	17% 12%	40%	0	4%
Sadowi	Poland	112	18% 13%	18%	14%	13% 9 - 2%	37%	0	0
Huber	Kenya	169	12% 9%	17%	21%	13% 5%	27%	2%	7
Brochet	Dakar Bangui	163	20% 9%	6%	12%	28% 4% - 15%	17%	15%	2

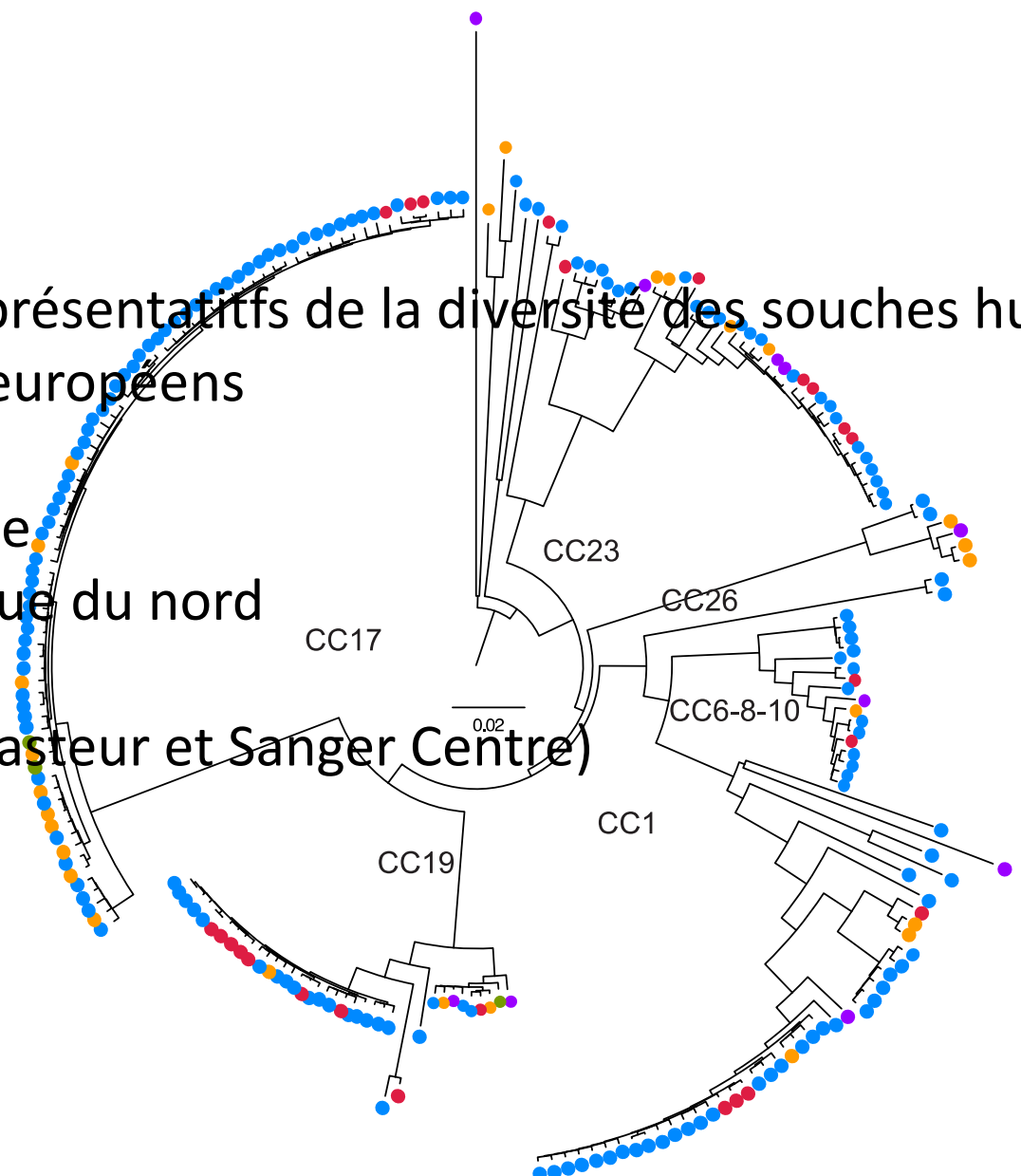
# Relations phylogénétiques entre les 230 Isolats

Isolats représentatifs de la diversité des souches humaines

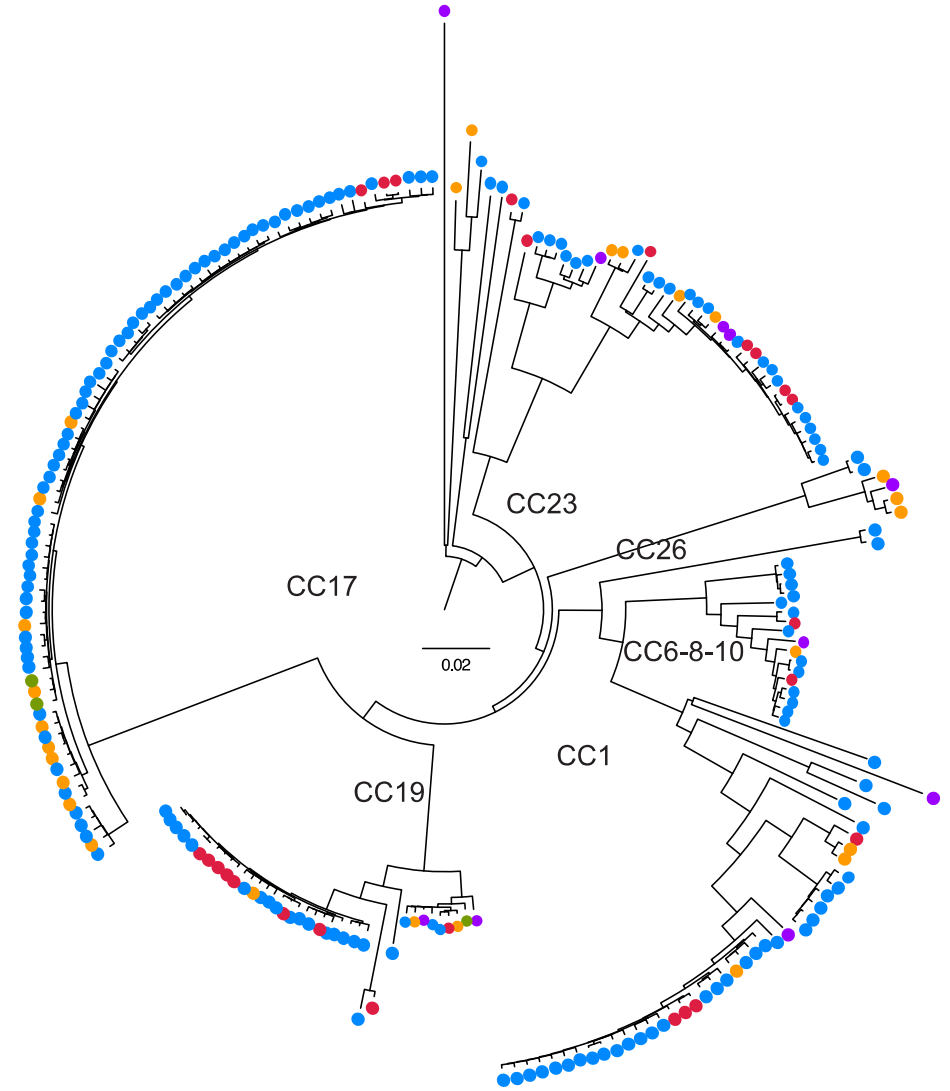
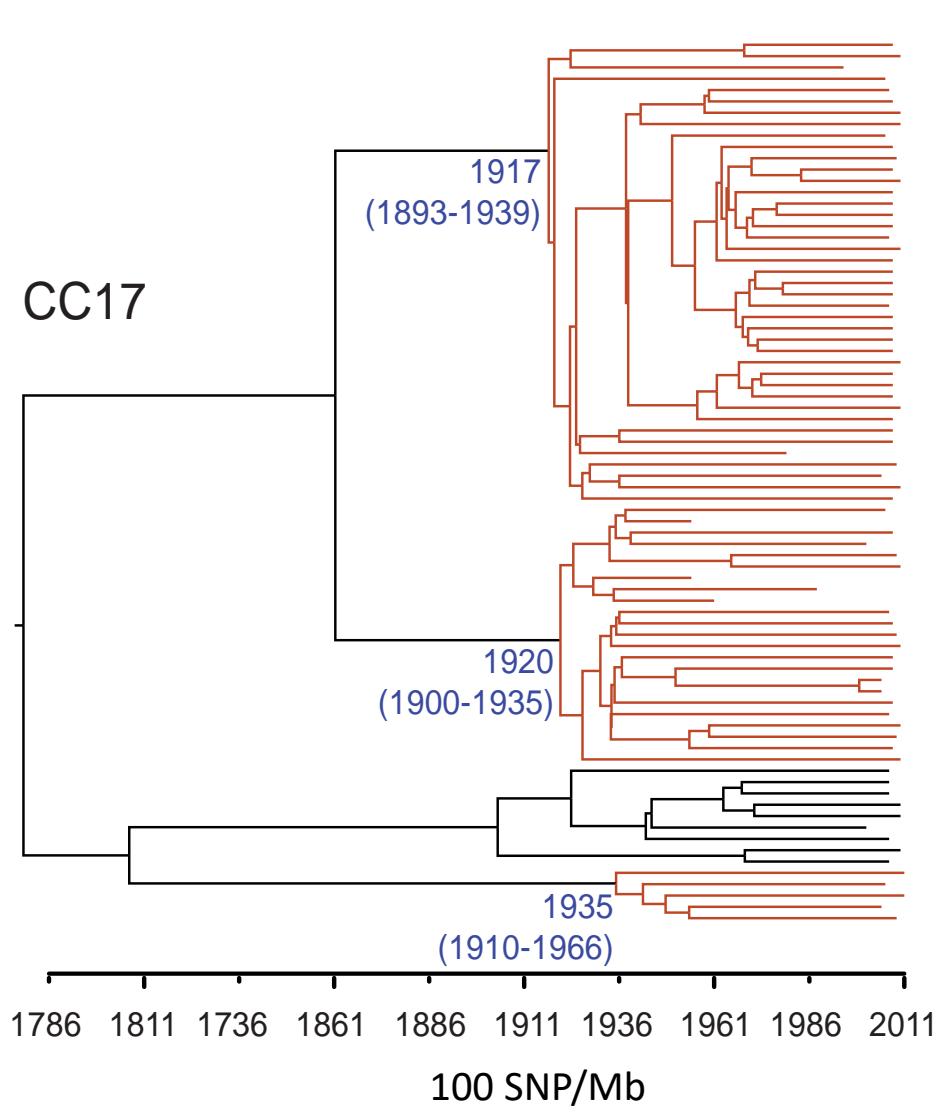
- 8 pays européens
- Afrique
- Australie
- Amérique du nord

(Institut Pasteur et Sanger Centre)

- Africa
- America
- Europe
- Oceania
- Unknown



# Analyse temporelle de l'évolution des clones



Bayesian analysis

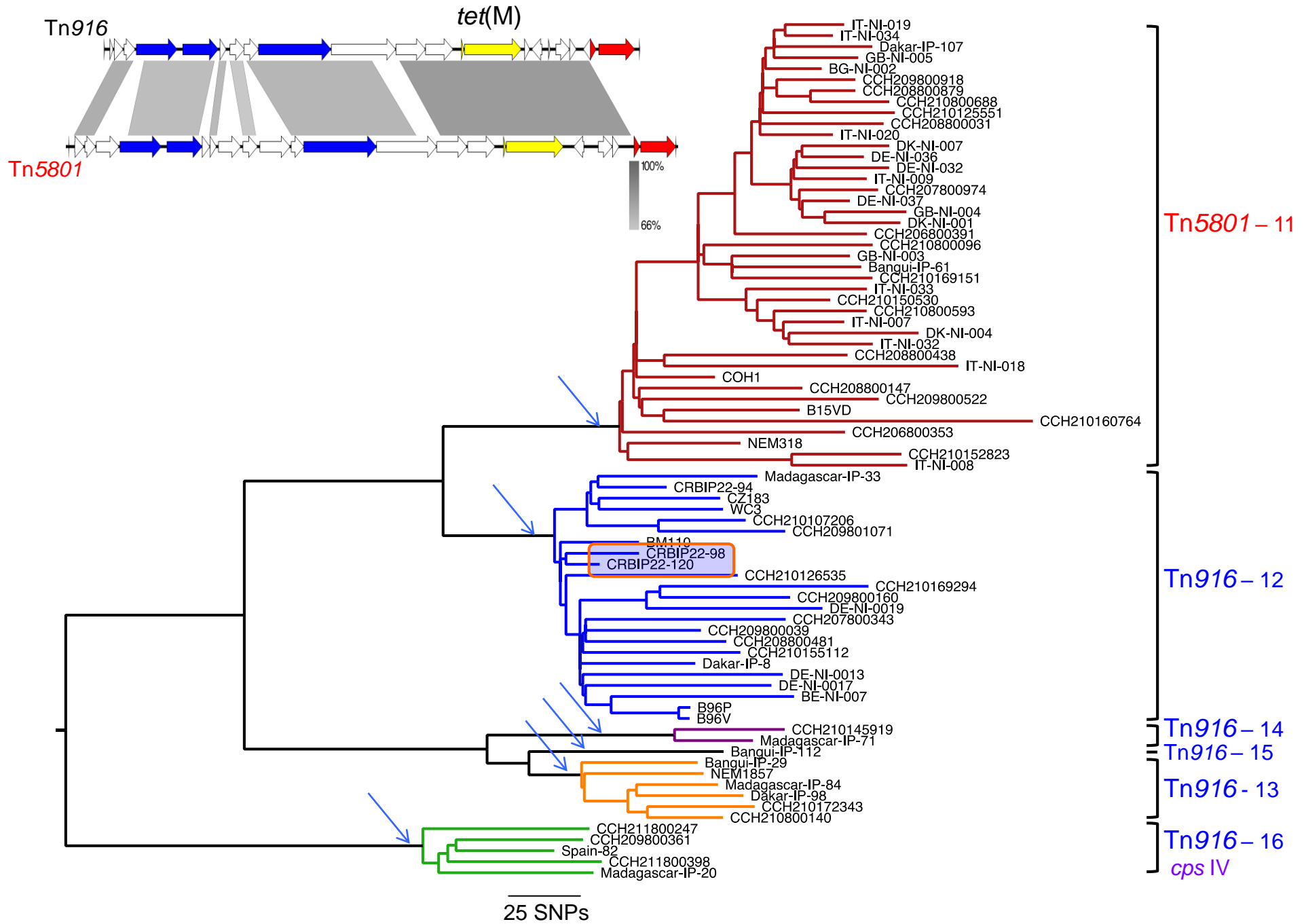
# La résistance aux antibiotiques chez les streptocoques du groupe B

Toutes les études chez l'homme

- Plus de 80% des isolats sont résistants à la tétracycline

Parmi les 230 génomes analysés

- 190 isolats expriment le gène *tet(M)* gene et 11 le gène *tet(O)*



## Quelques faits

- La tétracycline est un antibiotique à large spectre, massivement utilisé à partir des années 50s
- La haute fréquence de résistance à la tétracycline est spécifique aux souches humaines comparées aux souches bovines
- La tétracycline est rarement utilisé depuis 20 ans, mais le taux de résistance reste inchangé

# Scénario proposé pour l'émergence des infections néonatale à *SGB*

**Avant 1950:** Une population diverse de *S. agalactiae* sensible à la tétracycline (population « disparue »)

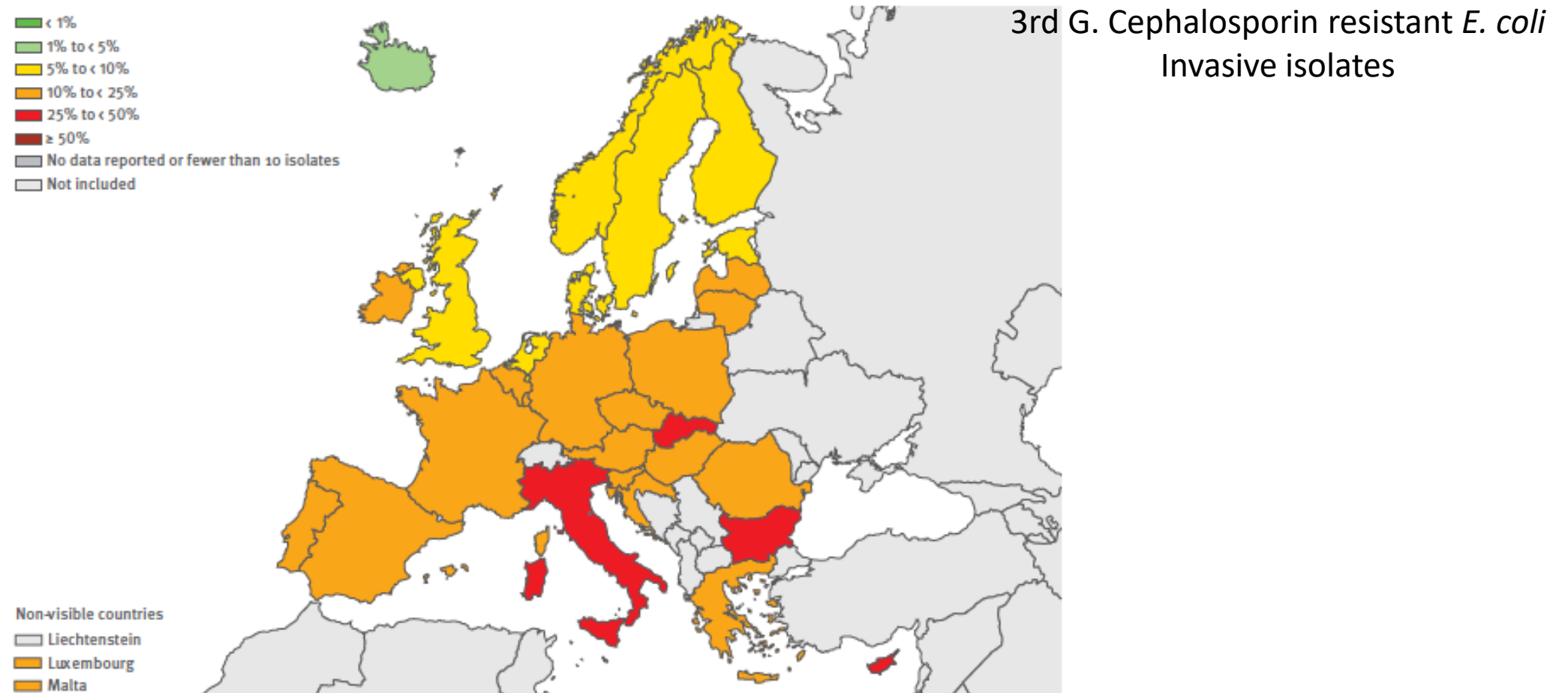
**1950:** Usage massif de la tétracycline

1. Sélection d'isolats TcR par gain d'éléments génétique mobiles
2. Création d'une niche en éliminant les souches sensibles et en modifiant le microbiote digestif
3. Parmi les clones TcR, sélection de ceux présentant les capacité de colonisation et de dissémination les meilleures
4. Dissémination mondiales de quelques clones TcR qui ont un potentiel de virulence élevé.

*Escherichia coli* ST131

# Surveillance – ECDC data

Figure 3.3. *Escherichia coli*. Percentage (%) of invasive isolates with resistance to third-generation cephalosporins, by country, EU/EEA countries, 2016



⇒ Surveillance of resistance but not of resistant clones and mechanisms

## Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15

Marie-Hélène Nicolas-Chanoine<sup>1,2\*</sup>, Jorge Blanco<sup>3</sup>, Véronique Leflon-Guibout<sup>1</sup>, Raphael Demarty<sup>1</sup>,  
Maria Pilar Alonso<sup>4</sup>, Maria Manuela Caniça<sup>5</sup>, Yeon-Joon Park<sup>6</sup>, Jean-Philippe Lavigne<sup>7</sup>,  
Johann Pitout<sup>8</sup> and James R. Johnson<sup>9</sup>

### The Pandemic *H30* Subclone of Sequence Type 131 (ST131) as the Leading Cause of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Infections in the United States (2011–2012)

James R. Johnson,<sup>1,2</sup> Stephen Porter,<sup>1,2</sup> Paul Thuras,<sup>1,2</sup> and Mariana Castanheira<sup>3</sup>

#### REVIEW

### *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination [version 1; referees: 2 approved]

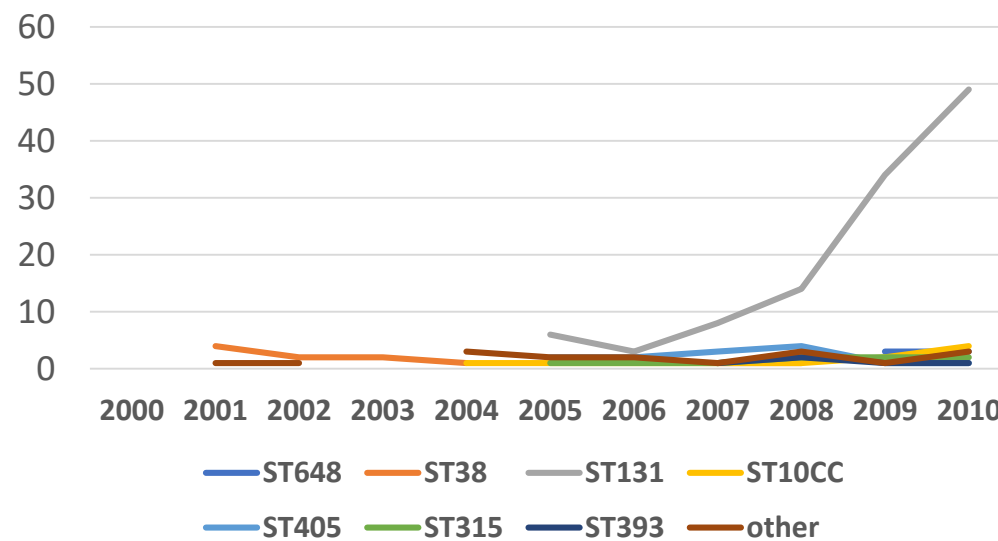
Johann D.D. Pitout  <sup>1-4</sup>, Rebekah DeVinney<sup>1</sup>

F1000Research 2017, 6(F1000 Faculty Rev):195 Last updated: 28 FEB 2017

**ABSTRACT** The global spread of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* (ESBL-*E. coli*) has largely been driven by the pandemic sequence type 131 (ST131). This study aimed to determine the molecular epidemiology of their

# Epidémiologie moléculaire des E. coli BLSE

	Blood infection	carriers
Phylogroup A	12,5	22,1
ST10	2,5	7,4
Phylogroup B1	1	13,67
Phylogroup B2	52,7	25,3
ST131	44,6	16,8
H30RX	28,1	6,3
Phylogroup D	32,2	39
ST38	7,3	10,5
ST405	5,3	4,2
ST648	7,5	2,1
ST69	2,2	3,2
Other	8,7	35,7

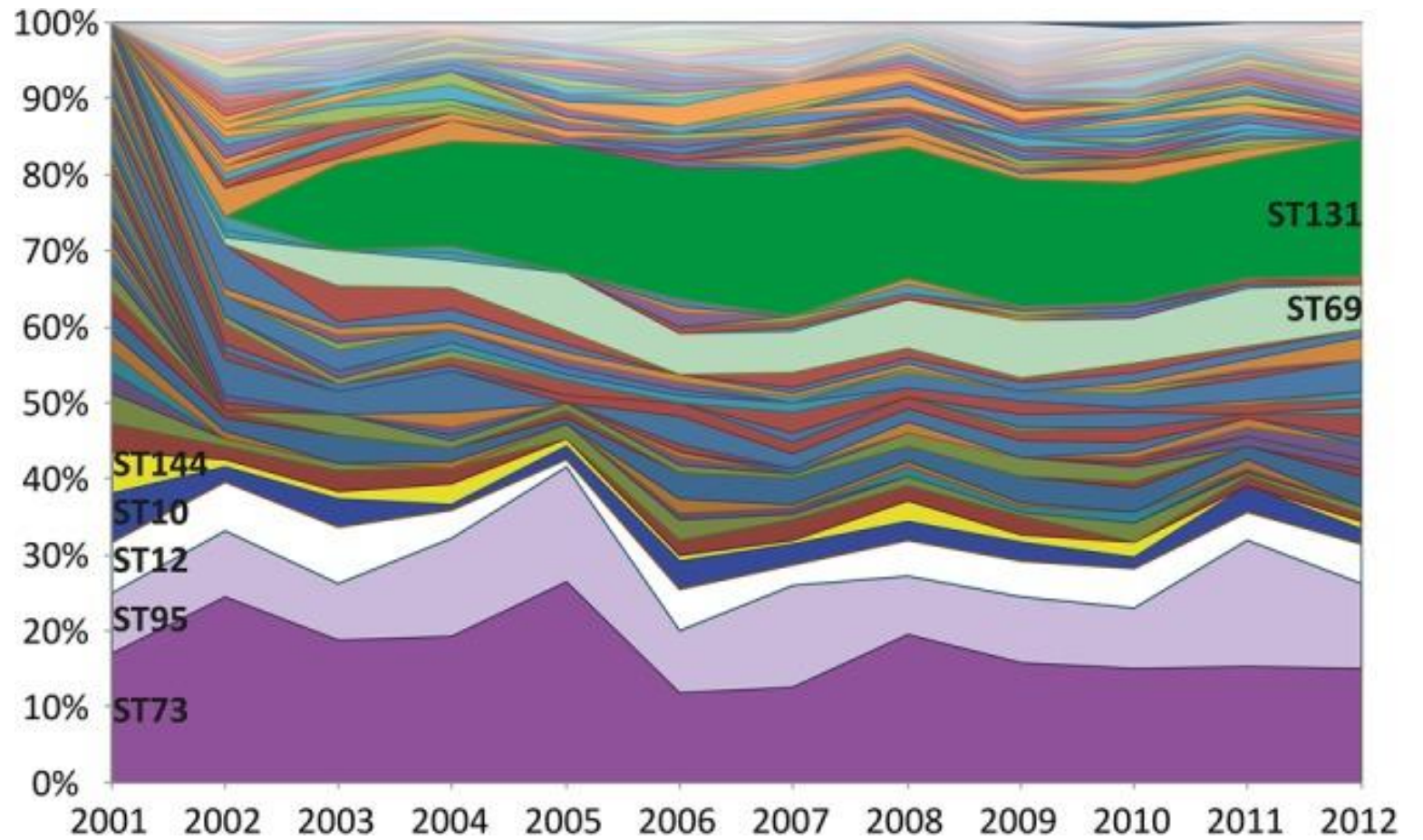


ESBL *E. coli* in Central Canada

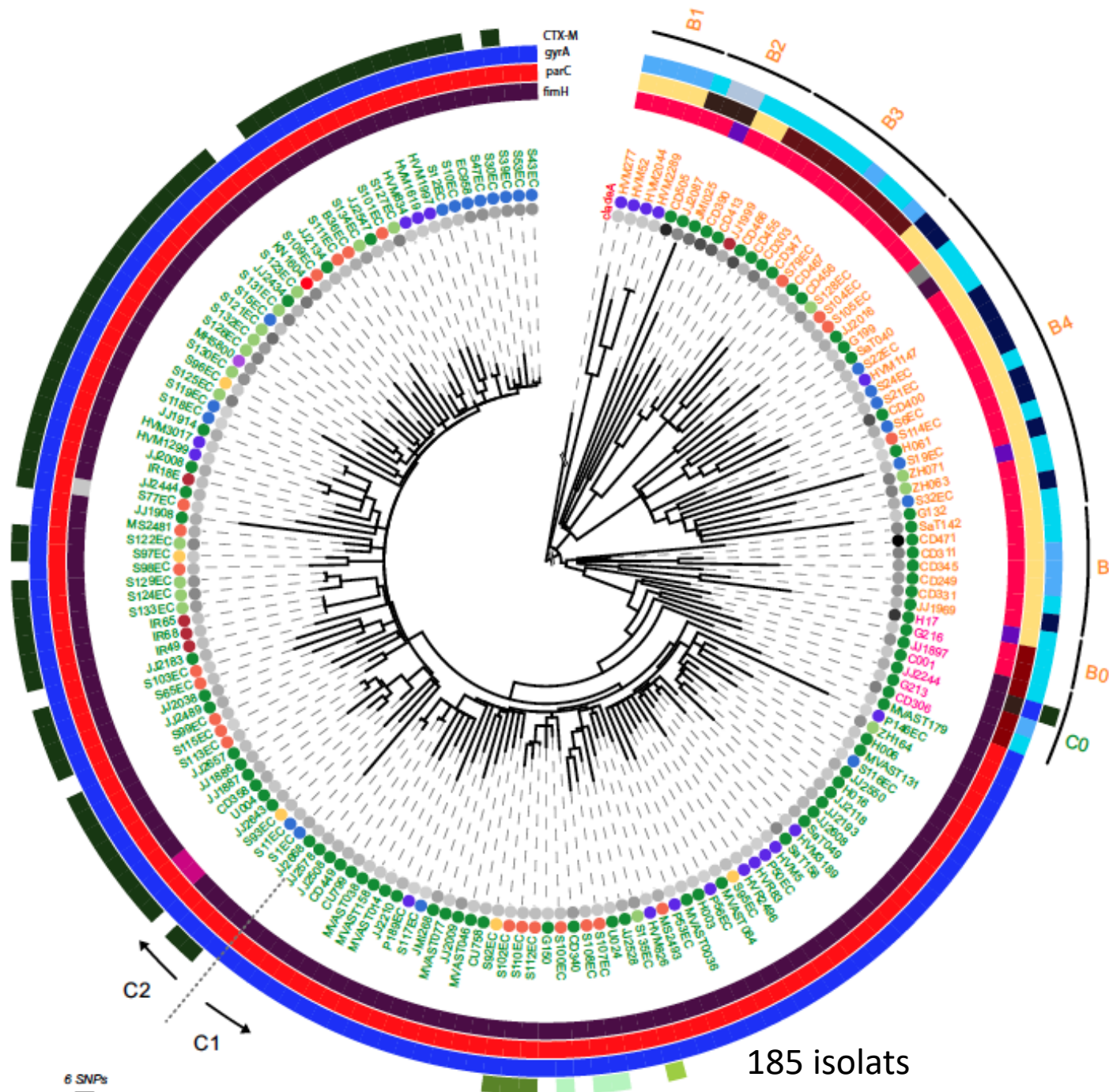
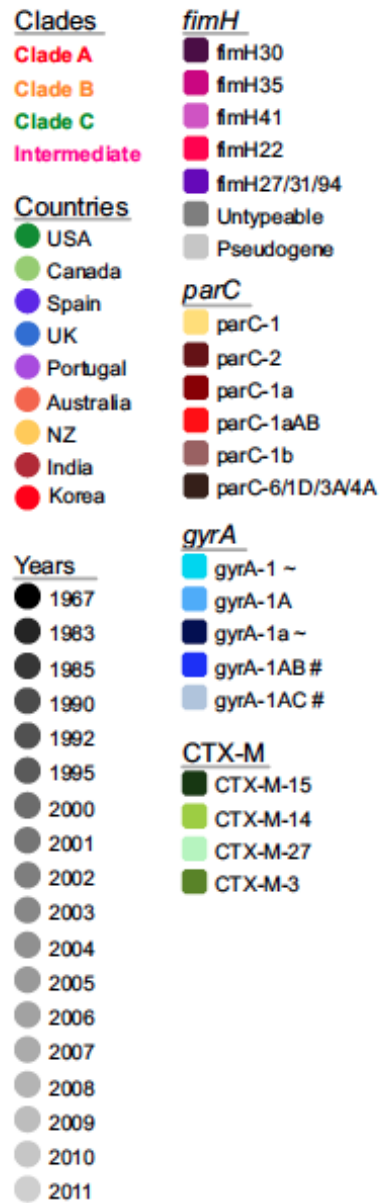
# Epidémiologie d'*E. coli*

## 1509 *Escherichia coli*

- 10 premiers isolats responsable de bactériémie chaque année de 11 hôpitaux anglais.
- 1 isolat sur 3 conservé à l'hôpital de Cambridge de 2006 à 2012







185 isolats

Ben Zakour et al. Mbio 2017

# Remerciements

## Unité EERA - Pasteur

- Rafael Patino Navarrete
- Isabelle Rosinski-Chupin
- Nicolas Cabanel
- Adriana Chiarelli
- Alexandre Almeida
- Violetta Da Cunha
- Adrien Villain

## Biomics Pole - Pasteur

- Laurence Ma
- Christiane Bouchier
  
- Didier Guillemot

## Unité EERA – Bicêtre (CNR)

- Thierry Naas
- Agnès Jousset
- Lauraine Gauthier

## Sanger Centre

- Matthieu Holden
- Mark Davies

## CNR Streptocoques

- Claire Poyart
- Pasteur
- Patrick Trieu-Cuot

## CNR Staphylococcus

- François Vandenesch

## MNHN

- Thierry Wirth