

Rôle de l'Interaction Bactéries-Amibes au sein des Biofilms dans l'Émergence de bactéries pathogènes et de l'antibiorésistance

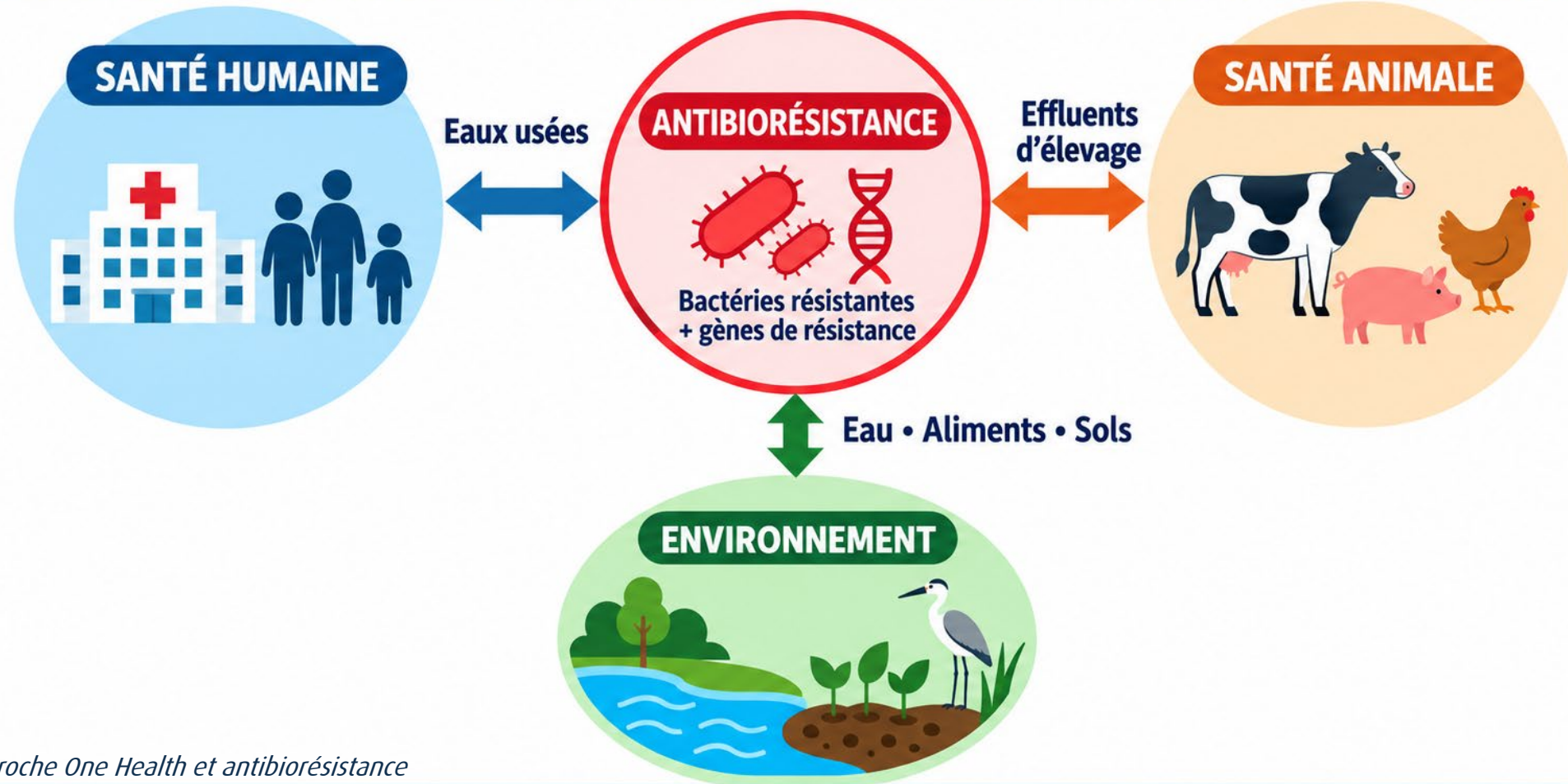
Meriem Souguir¹, Marion Guéganton², Benjamin Janvier², Marine Dumoutier², Erwann Guyomard², Sira Traoré³, Leia Daudin³, Marco Burnel³, Thierry Berthe², Sabine Favre Bonté¹, Elodie Guigon³

¹Université Lyon 1, CNRS, INRAE, LEM, UMR 5557, UMR 1418 Villeurbanne, France

²UMR 6143, CNRS, M2C, Normandie Université, 76821 Rouen, France

³METIS, Sorbonne Université, CNRS, EPHE, PSL Université UMR 7619, 75005 Paris, France

ANTIBIORÉSISTANCE ET ENVIRONNEMENT : L'APPROCHE ONE HEALTH



Approche One Health et antibiorésistance

AGIR EN ONE HEALTH



Réduire l'usage



Surveiller



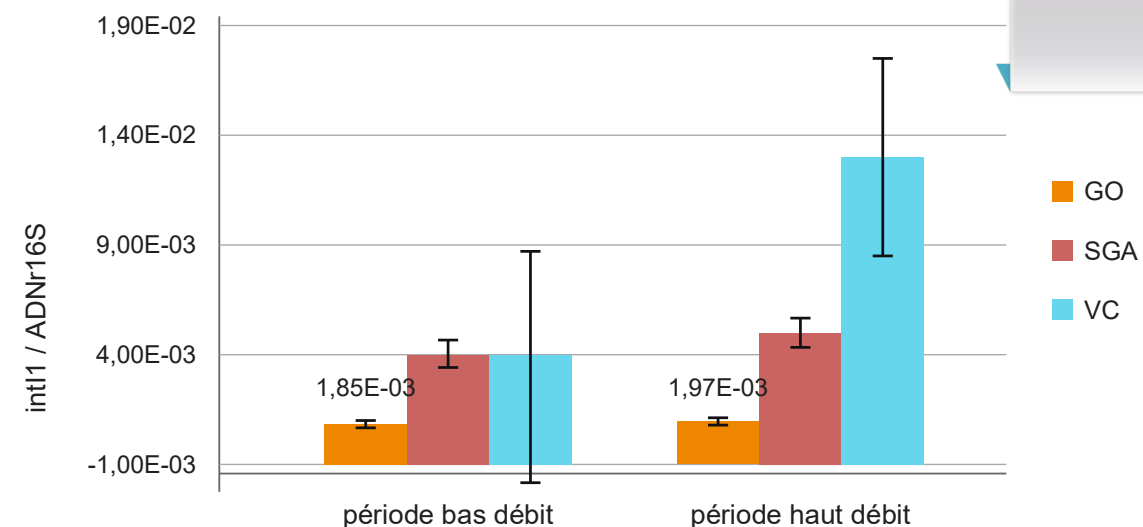
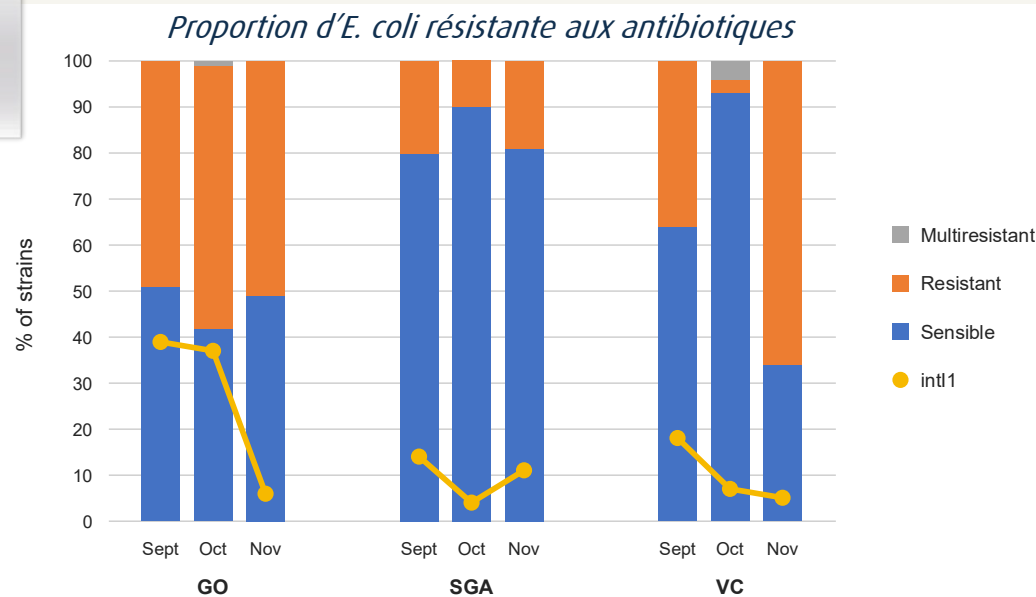
Prévenir

L'OMS classe l'antibiorésistance parmi l'une des 10 principales menaces pour la santé publique

- En 2023 - 5 millions de décès par an dans le monde
- Entre 2018 et 2023 la résistance aux antibiotiques a augmenté dans plus de 40% des associations agents pathogènes-antibiotiques
 - 30 à 50 millions de décès par an en 2050

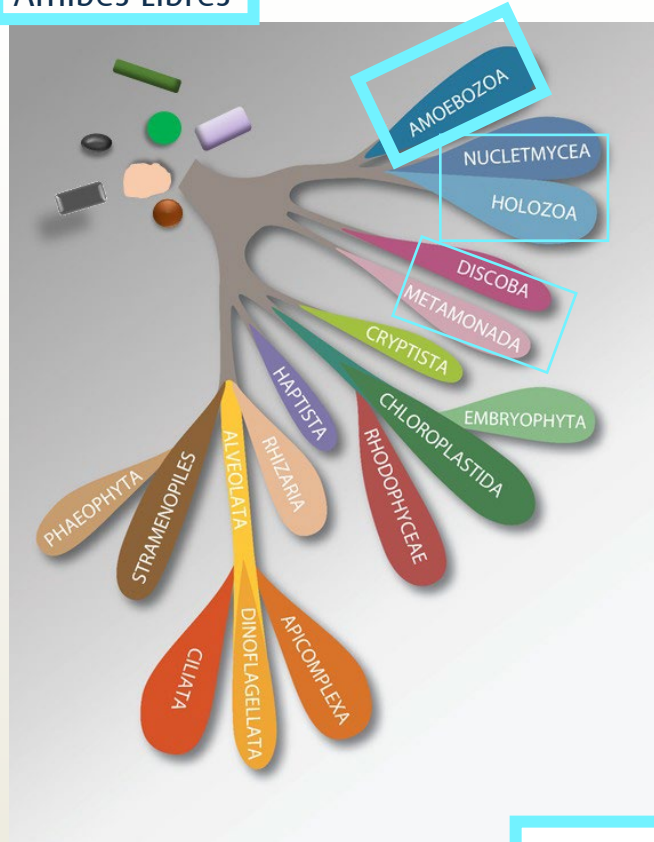
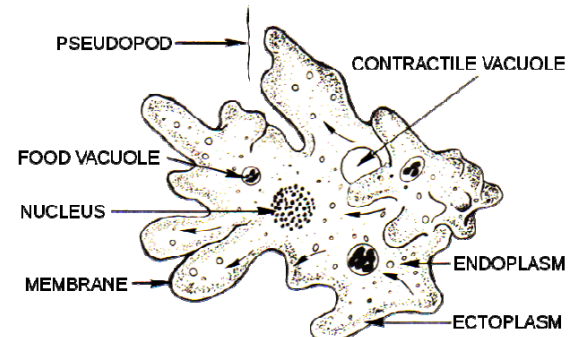


- Étude récente sur le rôle du périphyton dans la dissémination de l'antibiorésistance dans le cadre du PIREN Seine (phase 8)



Quantification moléculaire des intégrons cliniques de classe I dans les ADNs extraits de sédiments superficiels le long d'un transect amont-aval de l'Orge

Amibes Libres

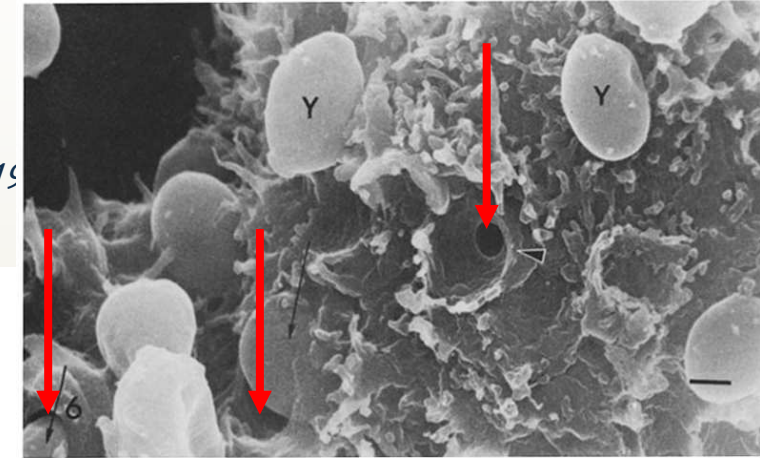
*Adl et al., 2019**Périphyton aquatique**Céline Coulon, thèse*

Les amibes libres : microorganismes eucaryotes

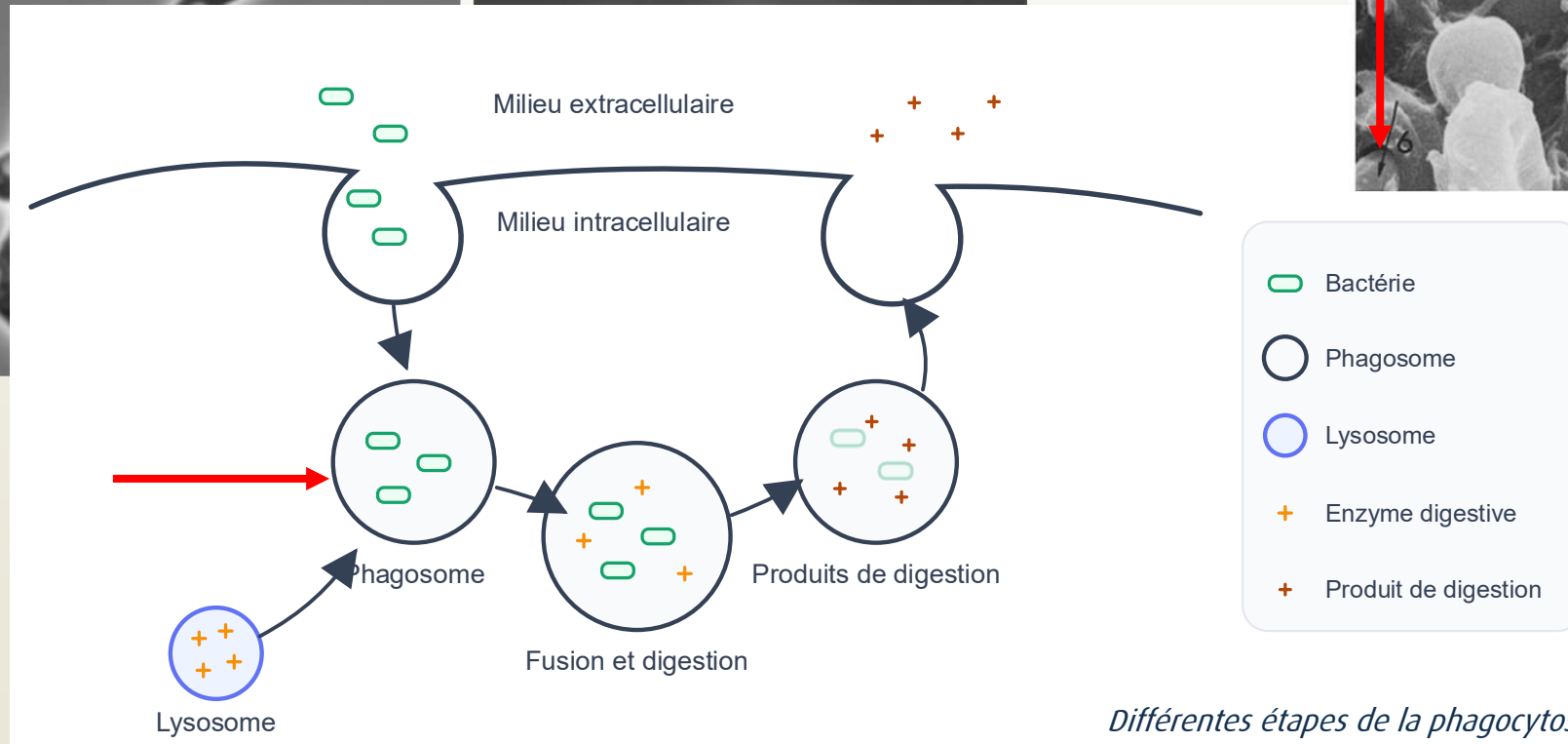
- ❖ Protozoaires mobiles et ubiquistes
- ❖ Classification / critères morphologiques revue via l'essor de la biologie moléculaire
- ❖ Deux formes : trophozoïtes et kystes
- ❖ Des prédateurs de microorganismes
- ❖ Régulation des populations microbiennes de l'écosystème (Rodriguez-Zaragoza, 1998)
- ❖ Phagocytose

Trophozoïte

Kyste



Bowers, 1980



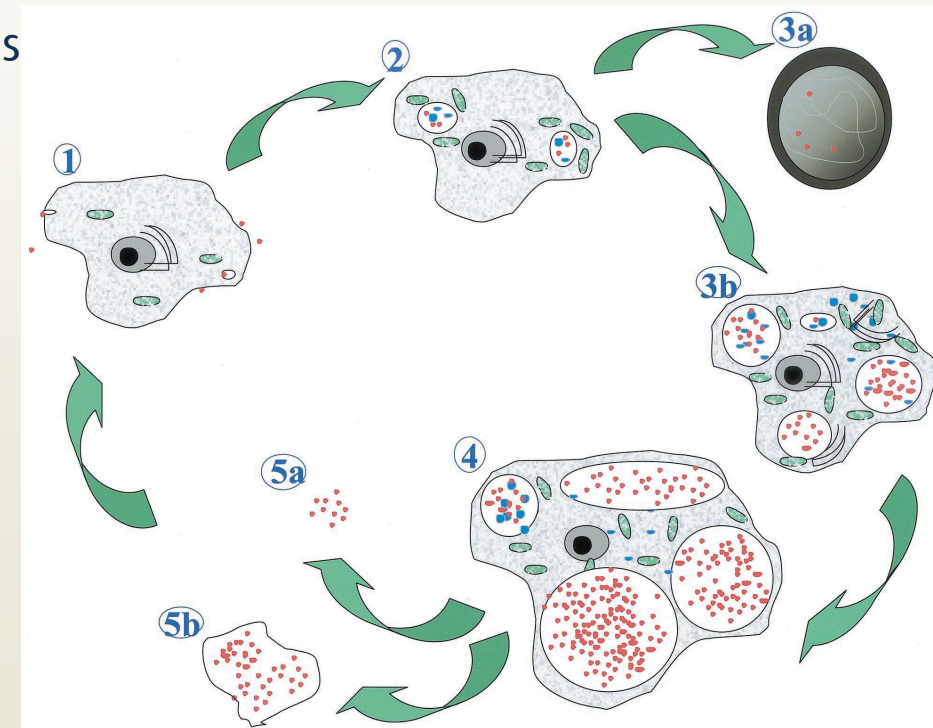
Les amibes : un réservoir d'endocytobiontes ou « Amoeba-Resistant Bacteria » (ARB)

- ❖ Des bactéries associées à l'intérieur de l'hôte sont capables de résister à la phagocytose, voire se multiplier, persister sur plusieurs générations et parfois causer la mort de l'hôte
- ❖ Mais quelles bactéries « environnementales » sont associées aux amibes libres?

→ *Chlamydiae* environnementales = endosymbiontes obligatoires

→ *Protochamydya* et *Neochlamydia*

- ❖ Vivent à l'intérieur des amibes
- ❖ Multiplication (cellule hôte-dépendante)
- ❖ Persistance pendant plusieurs générations



Greub & Raoult, 2001



Firmicutes

- *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp...

Actinobacteria

- *Kocuria rhizophilia*...

Bacteroidetes

Proteobacteria

→ Espèces pathogènes opportunistes:
P. aeruginosa, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ...

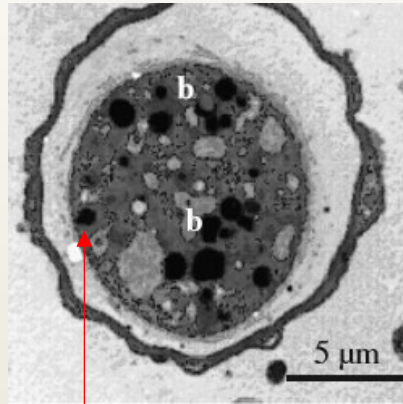
Genres Amibes

<i>Tetramitus</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Learamoeba</i>	<i>Willaertia</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Vannella</i>
<i>Micriamoeba</i>	<i>Vermamoeba</i>	<i>Valhkampfia</i>	<i>Stachyamoeba</i>	<i>Mycetozoa</i>	<i>Unidentified</i>

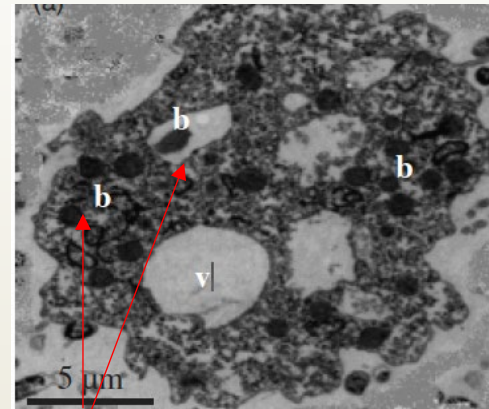
Les amibes : un réservoir de bactéries pathogènes ?

➤ Pathogènes stricts

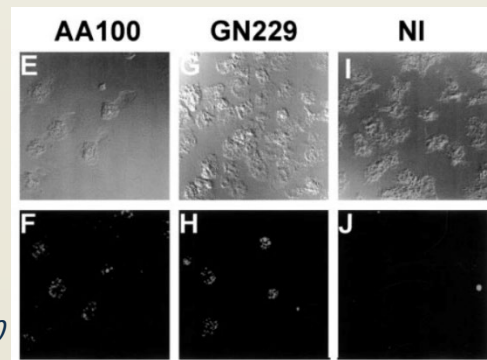
- ❖ Type *Legionella pneumophila*, *Chlamydia* spp, *Vibrio cholerae* (01 et 0139)...
- ❖ Responsables de maladies comme la légionellose ou le choléra chez le sujet sain



L. pneumophila
(Proteobacteria, Gram-)



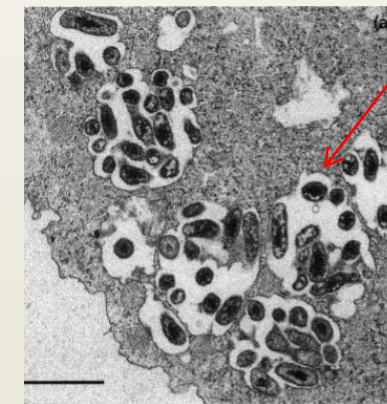
V. Cholerae 01 (Proteobacteria, Gram-),
Adb, 2007



Gao and Kwaik, 2000

➤ Pathogènes opportunistes

- ❖ Type *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, entérobactéries...
- ❖ Responsables de maladies comme des infections pulmonaires ou urinaires chez les sujets immunodéprimés ou fragilisés



B. cepacia
(Proteobacteria, Gram-)

Hypothèse

Les amibes libres intégrées au sein de biofilms aquatiques pourraient constituer un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques dont E. coli favorisant la persistance et dissémination de ces microorganismes

Objectif global

- ❖ *Comprendre le rôle des interactions entre bactéries et amibes dans la dynamique de l'antibiorésistance au sein des biofilms aquatiques*

Questions principales

- ❖ *Déterminer l'influence des interactions amibes/bactéries sur l'émergence, la persistance et la dissémination de bactéries pathogènes*
 - ❖ *Comprendre la contribution de ces interactions dans la dissémination de l'antibiorésistance*
- ❖ *Rechercher l'occurrence de bactéries, dont E. coli, porteuses d'intégrons cliniques au sein des amibes le long d'un gradient d'anthropisation*

- 3 sites d'études le long de l'Orge (GO, SGA, VC)

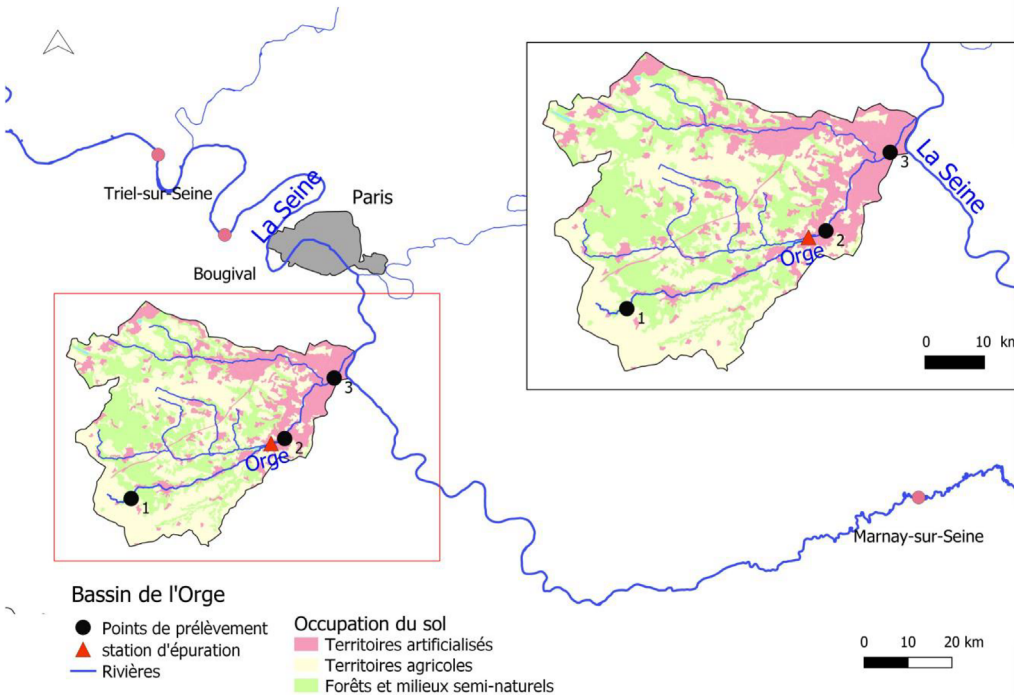


Figure 1 : Points de prélèvements sur la Seine et occupation des sols du bassin versant de l'Orge (1- Gué d'Orge, 2- Saint Germain les Arpajon, 3- Viry-Châtillon) et positionnement de la STEU dont les rejets est la source principale de contamination.

AMONT

St-Martin-de-Bréthencourt (GO)

Codes 1-1-X

MILIEU

St-Germain-lès-Arpajon (SGA)

Codes 1-2-X

AVAL

Viry-Châtillon (VC)

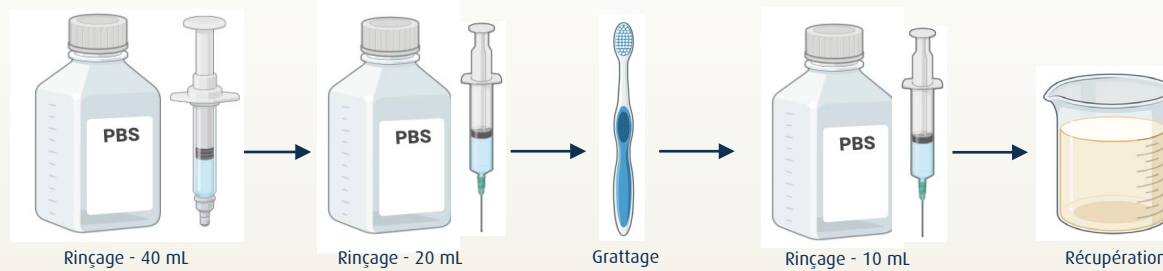
Codes 1-3-X · Site le plus anthropisé

- Pièges à biofilm (dalles de granite immergées – 800cm²)



- 3 réplicats biologiques par site (3 dalles – A, B, C) soit 9 échantillons de biofilms au total
- Echantillon d'eau prélevé pour chaque site

1. Récupération du biofilm

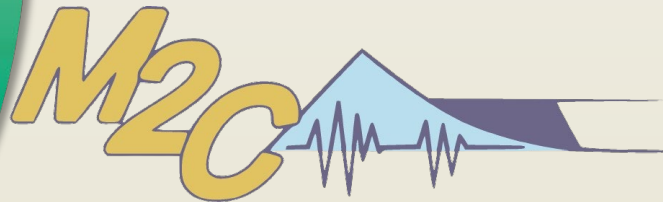


Le biofilm récupéré est divisé en trois volumes égaux dispatchés pour différentes analyses :

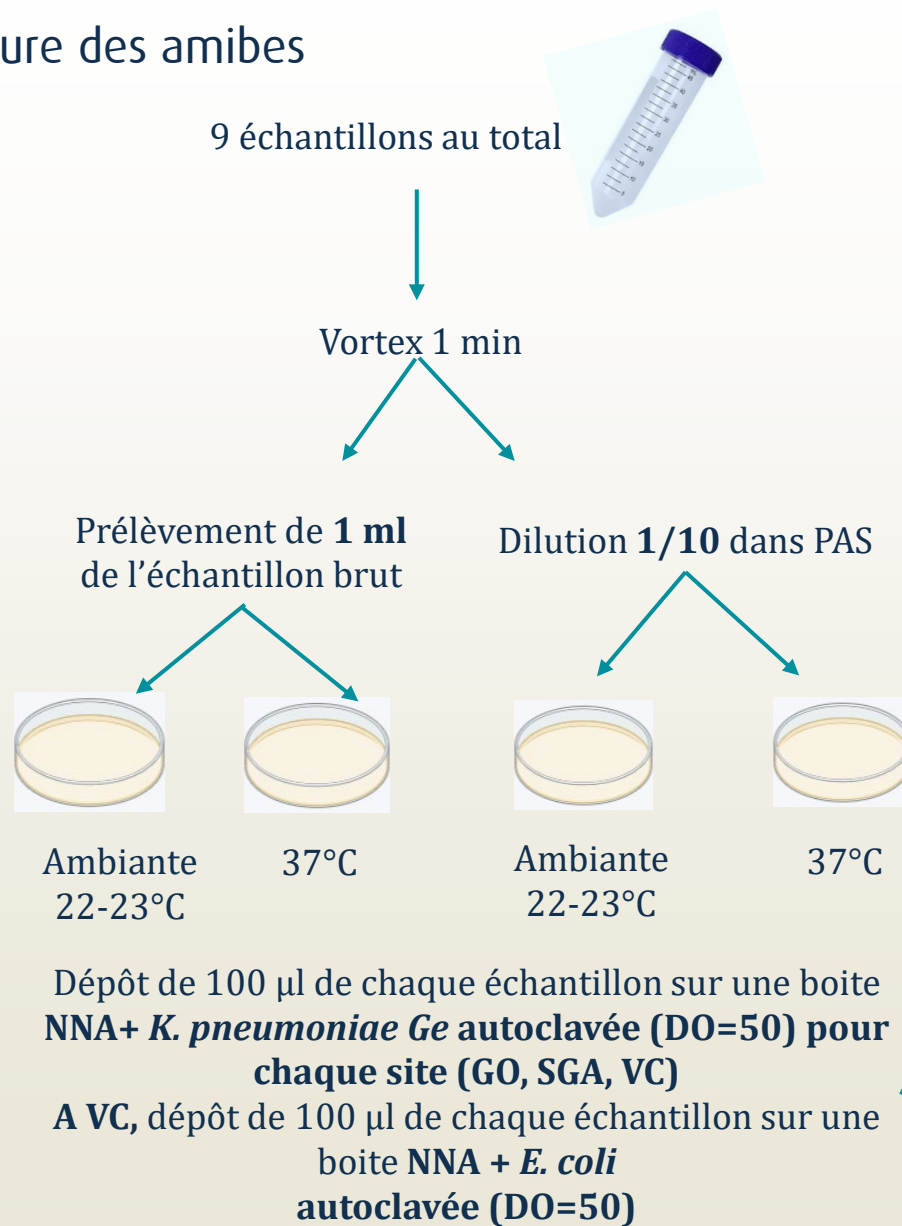
Culture bactérienne et approches moléculaires

Isolement et culture des amibes

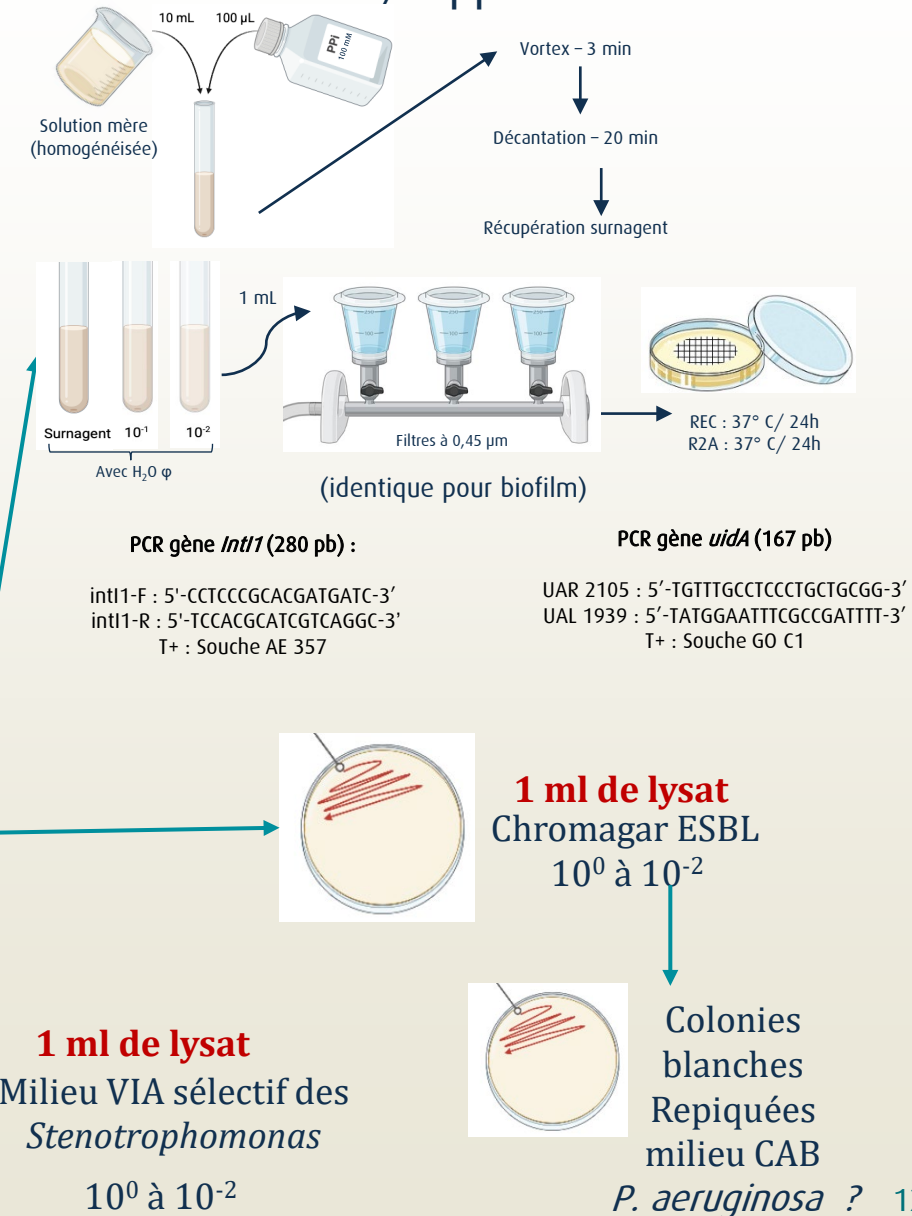
Dosage des antibiotiques



2. Culture des amibes



3. Culture des bactéries / Approche moléculaire



E. coli et biofilm

- Abondance d'*E. coli* dans les biofilms de l'orge le long du gradient d'anthropisation

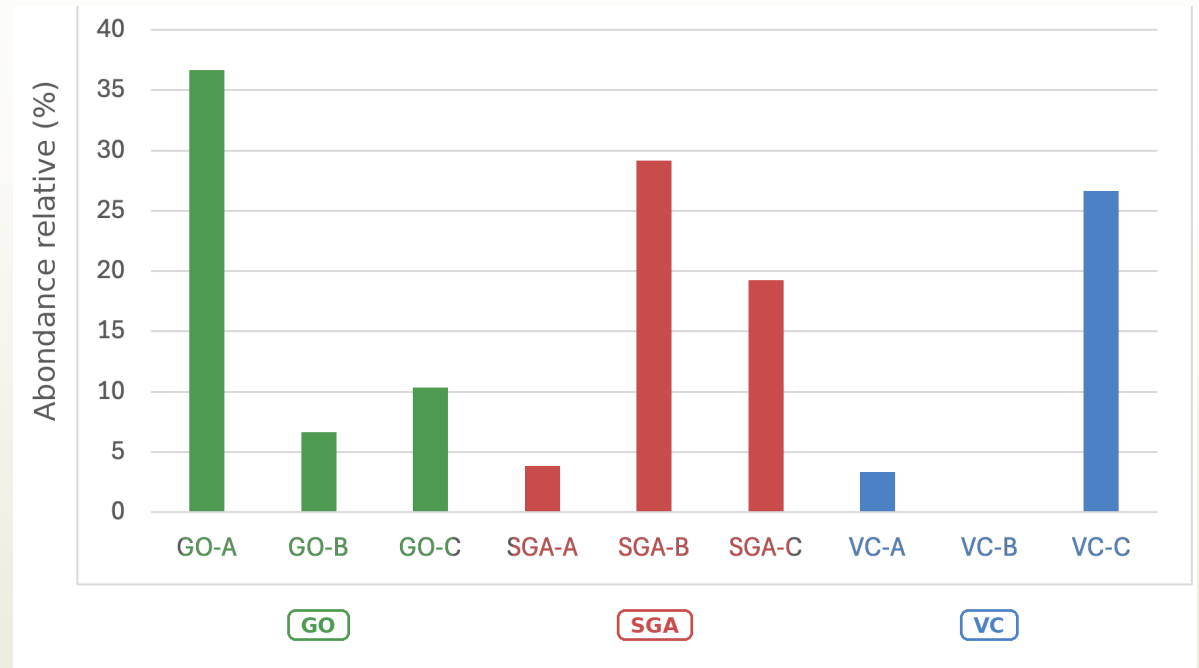


- ❖ En moyenne GO : $3.37 \text{ UFC/cm}^2 \pm 0.71$; SGA : $79.22 \text{ UFC/cm}^2 \pm 26.96$; VC : $75.35 \text{ UFC/cm}^2 \pm 21.05$
- ❖ Abondance d'*E. coli* augmente avec le gradient d'anthropisation
- ❖ Peu de *E. coli* dénombrées à GO
- ❖ Intra-variabilité entre les dalles d'un même site
- ❖ Abondance de coliformes (non-*E. coli*) et d'autres bactéries cultivées et isolées à partir de chaque biofilm (résultats non présentés)

E. coli et biofilm

- Abondance relative d'*E. coli* porteuses d'intégrons cliniques de classe 1 (*intI1*) dans les biofilms de l'Orge le long du gradient d'anthropisation

Site	Dalle	Nb souches <i>E. coli</i> cultivées	Nb isolats possédant <i>intI1</i>	Total par site
GO	A	30	11	15/89
	B	30	2	
	C	29	3	
SGA	A	26	1	13/76
	B	24	7	
	C	26	5	
VC	A	30	1	9/90
	B	30	0	
	C	30	8	

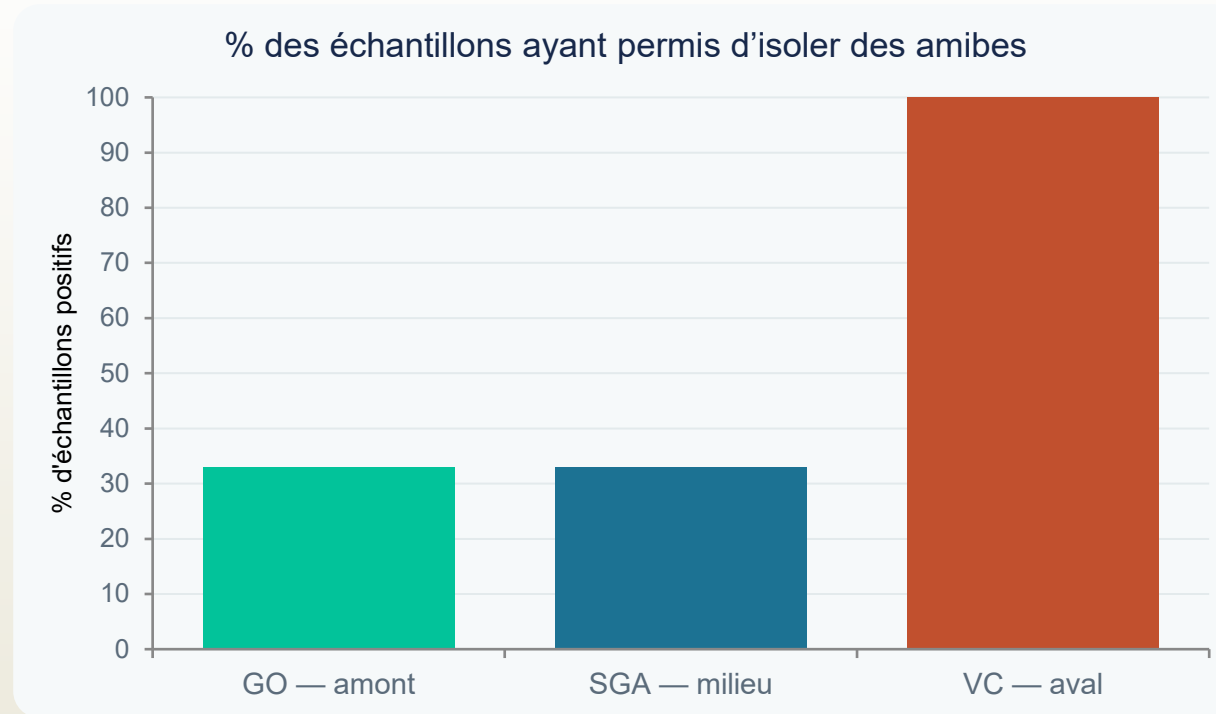


- ❖ En moyenne GO: 17,98 %; SGA 17.1 %; VC 10.0%
- ❖ Intégrons de classe I plus abondants parmi les *E. coli* isolées à GO et SGA, contrairement à VC
- ❖ Intra-variabilité entre les dalles d'un même site
- ❖ Présence d'intégrons de classe I dans certaines bactéries cultivées (non-*E. coli*) et isolées à partir de chaque biofilm (résultats non présentés)

Amibes – isolement

- Isolement d'amibes à partir des biofilms de l'Orge le long du gradient d'anthropisation

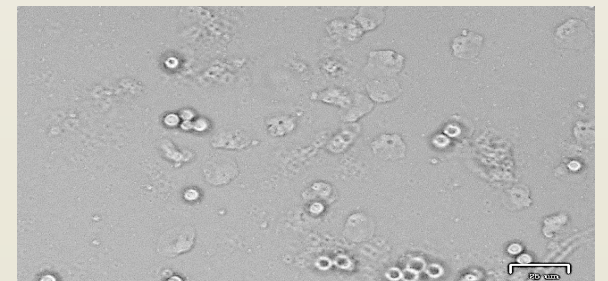
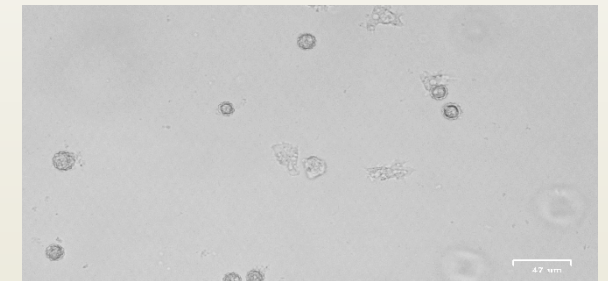
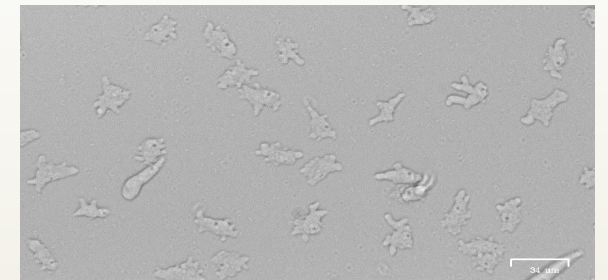
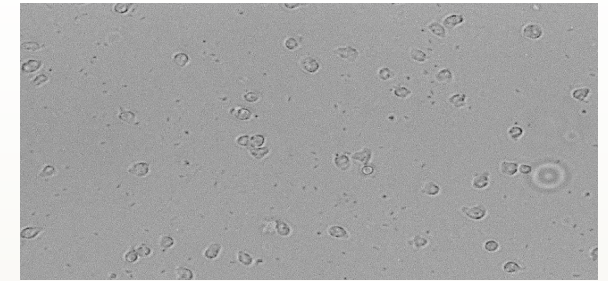
Site	Échantillons	Conditions testées pour la culture des amibes	Conditions Positives
GO	1-1-A	4	0
	1-1-B	4	0
	1-1-C	4	2
SGA	1-2-A	4	0
	1-2-B	4	1
	1-2-C	4	0
VC	1-3-A	8	3
	1-3-B	8	2
	1-3-C	8	1



- ❖ 9 échantillons (3 biofilms de chaque site) + 4 tests par échantillon à GO et SGA, 8 tests par échantillon par VC soit 48 conditions testées au total
- ❖ Sur 48 conditions testées, seulement 9 positives (18,75% de résultats positifs)
- ❖ L'abondance des amibes augmente le long du gradient d'anthropisation puisque le site situé le plus en aval (VC) concentre 6 des 9 isollements positifs (66,7%)
- ❖ Intra-variabilité entre les réplicats d'un même site

Amibes – isolement

- Contaminations fongiques fréquentes au cours des cultures, surtout pour le site SGA
- Plusieurs échantillons : absence d'amibe cultivable
- Trophozoïtes et kystes présents selon les échantillons
- Échantillons : trophozoïtes sous 2 formes distinctes, dont une forme allongée en « ver »
- ❖ Plus grande diversité de morphologies des amibes sur le site VC



Isolement bactérien provenant des lysats d'amibes

- Milieu CAB et isolement de bactéries ESBL (milieu Chromagar ESBL) et *Stenotrophomonas* (milieu VIA sélectif) à partir des lysats d'amibes

Échantillons (conditions positives)	Site	ESBL (UFC/mL)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Cétrimide)
1-1-C, brut	GO	544 000	+
1-1-C, 10^{-1}	GO	54 200	-
1-2-B, brut	SGA	312 000	+
1-3-A (Kpn), brut	VC	210 000	+
1-3-A (E. coli), brut	VC	10 200	+
1-3-A (E. coli), 10^{-1}	VC	3 580	-
1-3-B (Kpn), 10^{-1}	VC	8 600	-
1-3-C (E. coli), brut, 37 °C	VC	≈1 676 (10^{-2})	+

- ❖ 8/9 lysats amibiens possèdent des souches ESBL (Chromagar) sur les trois sites
- ❖ 5/9 lysats avec suspicion de présence de *P. aeruginosa*
- ❖ 0/9 colonie de *Stenotrophomonas*

Isolats bactériens provenant des lysats

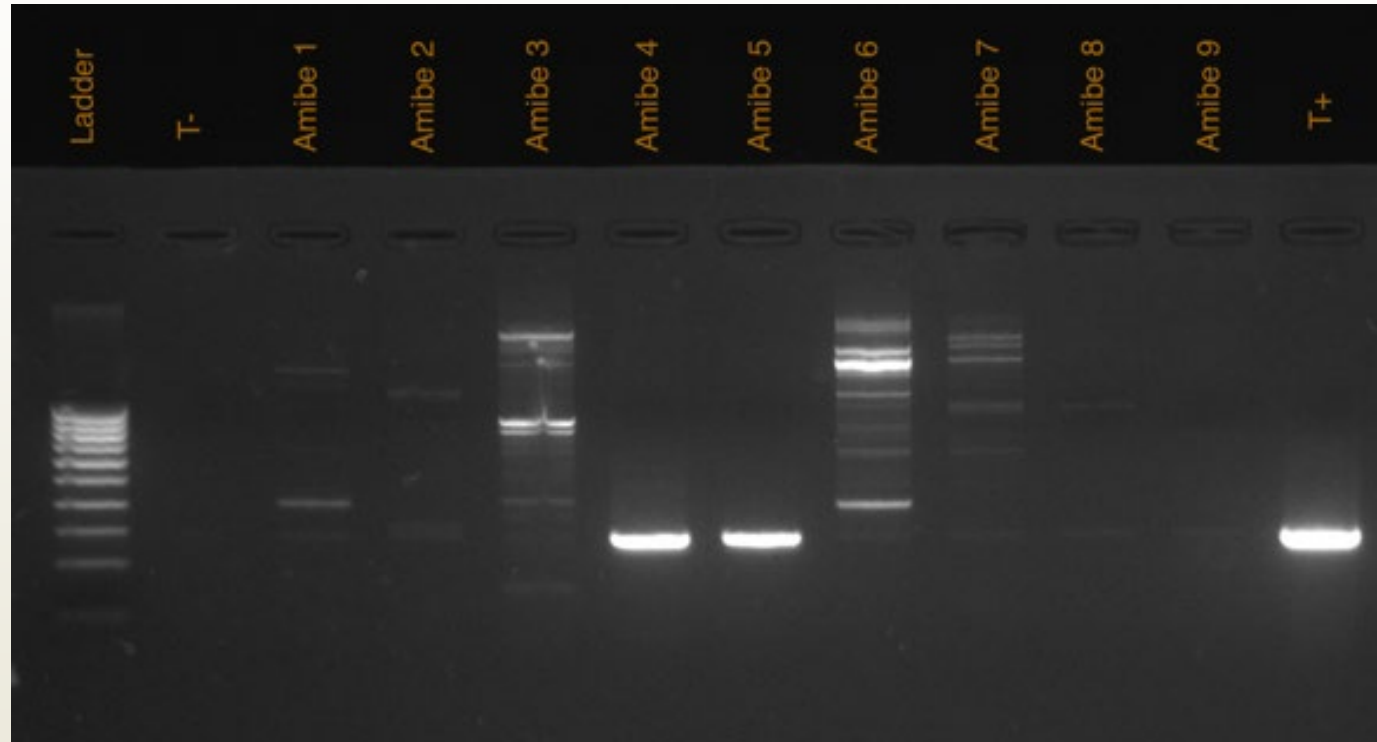
- Isolement d'*E. coli* (milieu chromogène REC) ou bactéries hétérotrophes aérobies mésophiles - FAM (milieu R2A) à partir des lysats d'amibes
- Approche moléculaire : PCR ciblant le gène codant l'ARNr 16S à partir de l'extraction totale d'ADN

Site	Lysat	Nb coliformes isolées REC	Nb FAM isolées R2A	Nb total d'isolats par lysat	Nb total d'isolats par site
GO	1-1-C	5	2	7	13
	1-1-C	4	2	6	
SGA	1-1-B	15	19	34	34
VC	1-3-A	13	16	29	94
	1-3-A	11	7	18	
	1-3-A	2	0	2	
	1-3-B	21	8	29	
	1-3-B	0	0	0	
	1-3-C	11	5	16	

- ❖ Validation de la présence de bactéries au sein de chaque lysat amibien (PCR ciblant le gène codant l'ARNr 16S).
- ❖ Aucune *E. coli* isolée sur milieu REC à partir des 9 lysats amibiens
- ❖ Validation de ces résultats par approche moléculaire : aucune *E. coli* détectée par approche moléculaire (PCR ciblant le gène *uidA*, marqueur spécifique d'*E. coli*) à partir de l'ADN total extrait avec un kit d'extraction
- ❖ Coliformes (non-*E. coli*) cultivées et isolées sur milieu REC, autres bactéries cultivées et isolées sur milieu R2A

Isolats bactériens provenant des lysats

- Isolement de bactéries hétérotrophes aérobies mésophiles - FAM (milieu R2A) à partir des lysats d'amibes
- Approche moléculaire : PCR ciblant le gène *int1* dans les isolats et à partir de l'extraction totale d'ADN



- ❖ Aucune détection du gène *int1* à partir des isolats
- ❖ Détection du gène *int1* dans les lysats amibiens 1-3-A provenant de VC

- Amibes présentes sur chaque site
 - VC concentre 6 des 9 échantillons positifs
- Diversité morphologique des amibes plus marquées à VC
 - Plus d'échantillons positifs par rapport à GO et SGA
 - Cohérence avec une pression anthropique plus élevée ?
- Présence d'intégrons de classe I dans le périphyton et les lysats
 - Connus pour être un support génétique responsable de la dissémination l'antibiorésistance
- Présence de souches ESBL (8/9 lysats)
 - Porteuses d'intégrons de classe I ?
 - Résistances aux antibiotiques ?
- *P. aeruginosa* potentiellement détectée dans 5/9 lysats
 - Présence de résistance aux antibiotiques ? Pathogène ? Présence d'intégrons de classe I
- Aucune détection d'*E. coli* dans les lysats
 - Quelques cas d'*E. coli* résistants aux amibes décrits dans la littérature

- Présence de bactéries porteuses d'intégrons de classe I
- Présence de bactéries classées comme ESBL
- Présence de ces bactéries dans le périphyton et les amibes
 - Potentielle interaction entre bactéries ATB/amibes
 - Implication des amibes dans la dissémination de l'antibiorésistance == à confirmer

❖ Quelques perspectives

- Identifier les amibes,
- Identifier les bactéries potentiellement porteuses d'intégrons cliniques
- Caractériser la résistance aux antibiotiques des souches d'intérêt isolées
- Optimiser l'approche cultivable visant à isoler les bactéries porteuses d'intégrons

- Campagnes supplémentaires nécessaires pour consolider les résultats
- Campagnes à réaliser sur périodes hiver / été ?

Merci pour votre attention

Des questions ?