

Exploration de la diversité génétique des *Escherichia coli* de type STEC isolés en France métropolitaine et sur l'île de la Réunion

Agnès JARDIN (1) et Pierre-Yves MOALIC (2)

(1) Ceva Santé Animale, 10 avenue de la Ballastière, 33500 Libourne

(2) Labofarm, 4 rue Théodore Botrel, BP 351 22603 Loudéac

Aqnes.jardin@ceva.com

Exploration of STEC genetic diversity in different regions of France

Edema disease induces high economic losses in pig production due to a high mortality rate and generally poor performance of affected pigs. It is caused by the shigatoxin Stx2e, produced by STEC (shigatoxin producing *Escherichia coli*). Clinically absent for decades on Reunion Island, the disease suddenly appeared in early 2014, apparently involving a single serogroup: O139:K82. To explore this sudden change in health, French STEC genetic diversity was explored using Multi-Locus Sequence Typing (MLST) of seven housekeeping genes. Ten Reunion Island and 22 metropolitan French O139:K82 *E. coli* were compared in a phylogenetic tree built from the MLST results. Overall, 22 out of these 32 STEC strains had sufficient genetic proximity to belong to the same true cluster despite the fact that they had no epidemiological relations. The ten Reunion Island STEC had low genetic proximity since they did not belong to the same cluster. This result rejects the hypothesis that only a single O139:K82 STEC clone spread on the island.

INTRODUCTION

Les STEC (shigatoxin producing *Escherichia coli*) sont responsables de la Maladie de l'Œdème, caractérisée en forme aiguë par une forte mortalité de porcs sevrés associée à des signes d'œdème et à des baisses de performances zootechniques. Non diagnostiquée pendant plusieurs décennies dans les élevages réunionnais, cette maladie a soudainement ré-émergé au début 2014 et oblige désormais près de 63% des élevages à vacciner leurs porcelets. Contrairement à la métropole (Jardin *et al.*, 2017), un seul sérotype semble impliqué : le sérotype O139:K82. Cette évolution sanitaire brutale questionne et plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : importation accidentelle puis diffusion d'un clone de STEC initialement non insulaire, diffusion d'un clone de STEC insulaire mais à fort pouvoir pathogène (suite à une mutation par exemple)... Pour investiguer ces hypothèses, une exploration de la diversité génétique de STEC réunionnais et métropolitains a été conduite.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Sélection des souches

L'étude a été conduite sur dix souches STEC réunionnaises et 22 souches métropolitaines (21 de Bretagne et une de Nouvelle Aquitaine) de sérotype O139:K82. Ces souches, disponibles dans la souchothèque de Labofarm, ont été isolées entre 2015 et 2017 à partir d'animaux présentant des signes cliniques de la Maladie de l'Œdème.

Le sérotypage a été effectué par agglutination rapide sur lame et la présence de gènes codant pour les facteurs de virulence associés aux STEC (Stx2e, F18) a été confirmée par Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplexe (Jardin *et al.*, 2017).

1.2. Technique d'analyse

La diversité génétique bactérienne a été analysée par Multi-Locus Sequence Typing ou MLST (méthode Sanger). Sept gènes de ménage (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *recA* et *purA*), constitutifs de la bactérie, systématiquement présents et exprimés, réputés à évolution lente ont été séquencés.

Les analyses ont été effectuées par l'équipe Genindexe de Labofarm, Loudéac. Les souches sélectionnées ont été mises en culture sur gélose Muller Hinton afin de s'assurer de la pureté des isolats. L'ADN bactérien a été ensuite extrait par lyse thermique réalisée sur une colonie isolée. L'analyse MLST a été réalisée avec les couples d'amorces et le protocole décrit dans les publications de Writh *et al.*, 2006 et Ahmed *et al.*, 2016. Pour chaque échantillon, les séquences consensus de chacun des sept gènes ont été déterminées à partir des séquences sens et anti-sens obtenues après séquençage.

1.3. Analyse bio-statistique

Après préparation, les séquences correspondant aux sept gènes ont été concaténées (un contig par souche). Sur la base de ces contigs, un logiciel de traitement logarithmique (FastTree software) a comparé de façon répétée l'ensemble des souches entre elles, ce qui a permis de construire un arbre phylogénétique présenté sous une forme racinée en figure 1.

2. RESULTATS

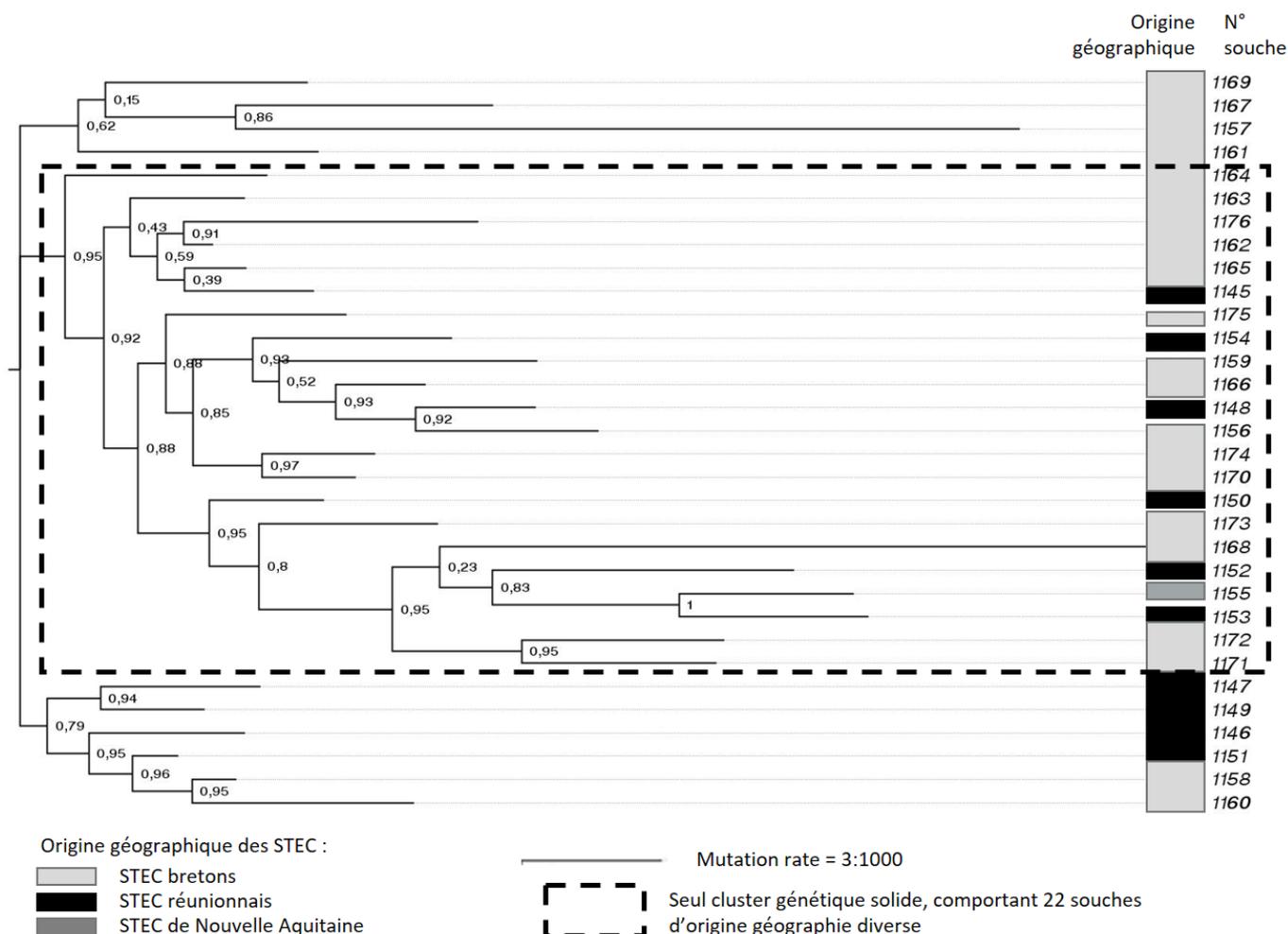


Figure 1 – Arbre phylogénétique raciné

La figure 1 positionne dans un arbre phylogénétique raciné les souches STEC étudiées et partiellement séquencés.

22 souches sur les 32 investiguées présentent une parenté génétique suffisante pour être placées dans le même cluster vrai (valeur numérique du nœud le plus en amont du cluster $\geq 0,95$). Ces 22 souches ne présentent pas entre elles de liens épidémiologiques connus (origine géographique et années d'isolement diverses).

De même que les STEC métropolitains, les STEC réunionnais ne sont pas tous dans le même cluster, du fait d'une variabilité génétique notable entre eux.

CONCLUSION

L'hypothèse qu'un clone STEC particulier (à pouvoir pathogène exacerbé et/ou d'origine non insulaire) ait diffusé entre les élevages porcins réunionnais n'est donc pas étayée par les résultats de cette étude. Il n'est pas mis en lumière une originalité et une proximité génétique des STEC réunionnais, qui auraient pu expliquer l'émergence brutale de la Maladie de l'Œdème sur l'île de la Réunion. D'autres pistes explicatives seraient désormais à explorer. Ainsi la recherche des changements s'étant opérés dans la filière porcine réunionnaise et ayant pu faciliter l'expression du pouvoir pathogène des STEC serait un axe de travail pertinent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, S., Besser, T.E, Call, D.R., Weissman, S.J., Jones, L.P., Davis, M.A., 2016, Evaluation of two multi-locus sequence typing schemes for commensal *Escherichia coli* from dairy cattle in Washington State. J Microbiol Meth 124, 57-61.
- Jardin A, Leneveu P., Bayon-Auboyer M.H., Morvan H., Moalic P.Y., Le Guennec J., Creac'h P., Gotter V., 2017. Diagnostic de la maladie de l'œdème chez le porc en France : bilan des connaissances acquises depuis 2014 par la PCR de génotypage des *Escherichia coli*. Journées Rech. Porcine, 49, 177-182.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Malden, M.C., Ochman, H., Achtman, M., 2006, Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol, 60, 1136-1151.