



METADETECT

Caractérisation des *Escherichia coli* productrices de Shiga toxine dans du lait cru grâce à de nouvelles approches de métagénomique

ANSES – Laboratoire de sécurité des aliments – Unité COLiPATH

BfR – Département de sécurité alimentaire – National reference center for sequencing (4NSZ) and National reference laboratory for *E. coli* (NRL *E. coli*)

Supervisée par Dr Sabine DELANNOY et Dr Josephine GRUETZKE



Séance publique de Académie d'Agriculture de France

Présentation des thèses – Médaille d'argent-Dufrenoy

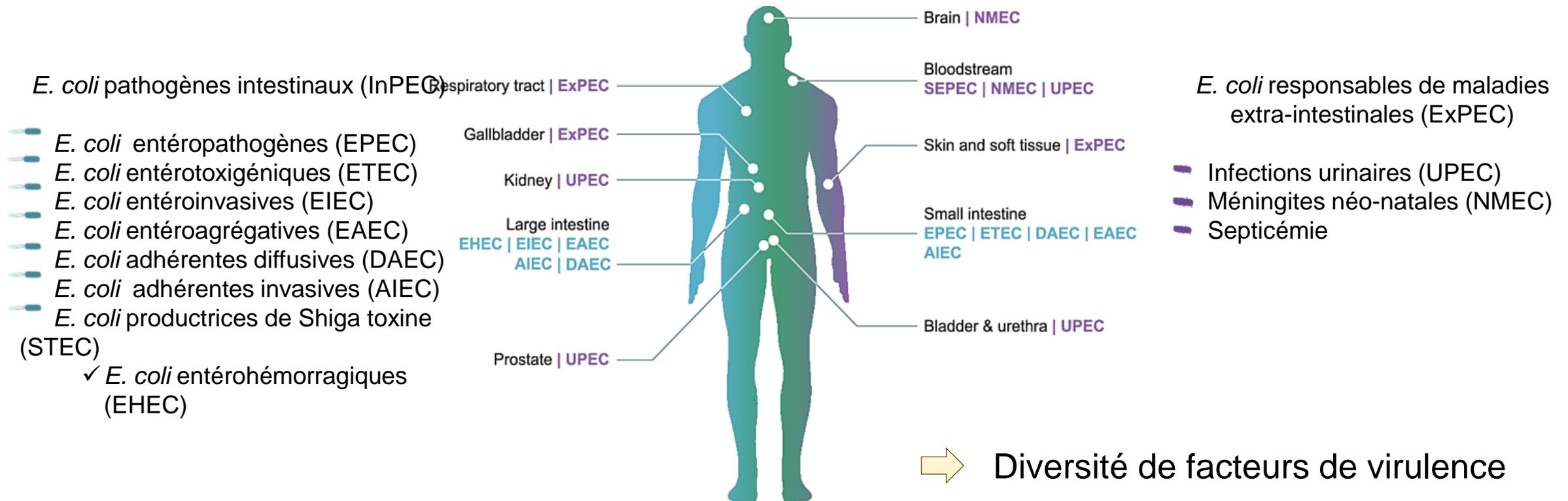
Section 6: Sciences de la vie

Le 18 septembre 2024 par Sandra JAUDOU

Escherichia coli pathogènes

Escherichia coli ⇒ bactéries commensales de la flore microbienne

Acquisition de facteurs de virulence ⇒ *E. coli* pathogène

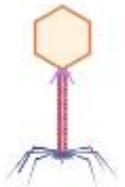


E. coli Entérohémorragiques typiques (EHECt)

E. coli commensale



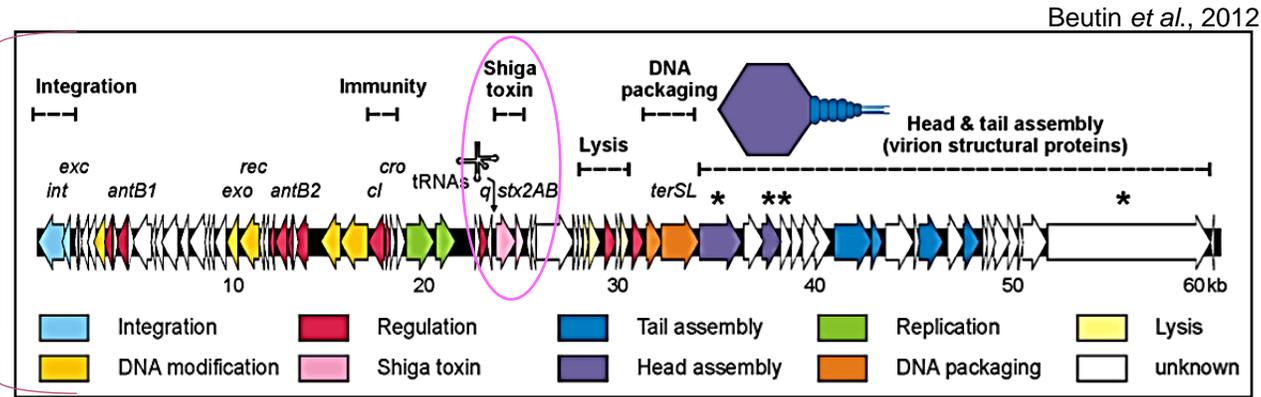
+



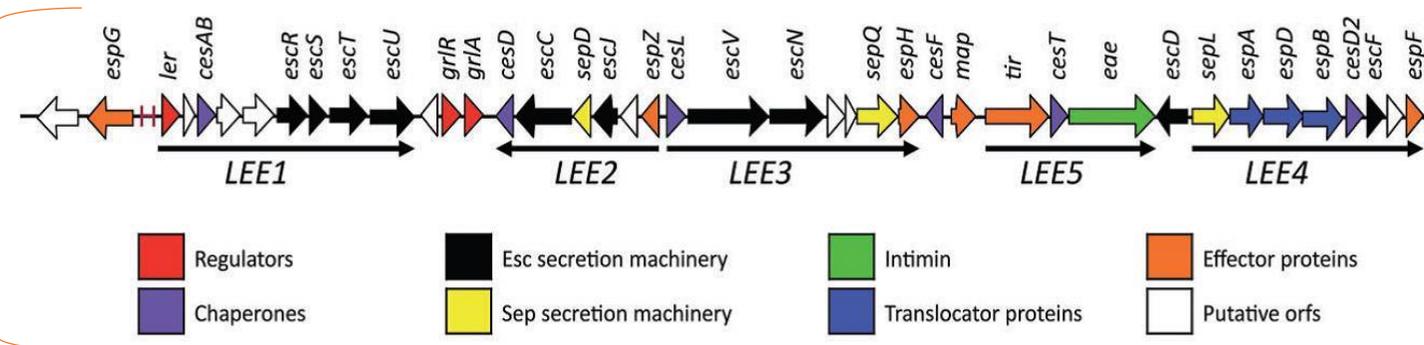
Phage
Stx

+

Locus d'effacement
des entérocytes
(LEE)



Production de
la Shiga toxine

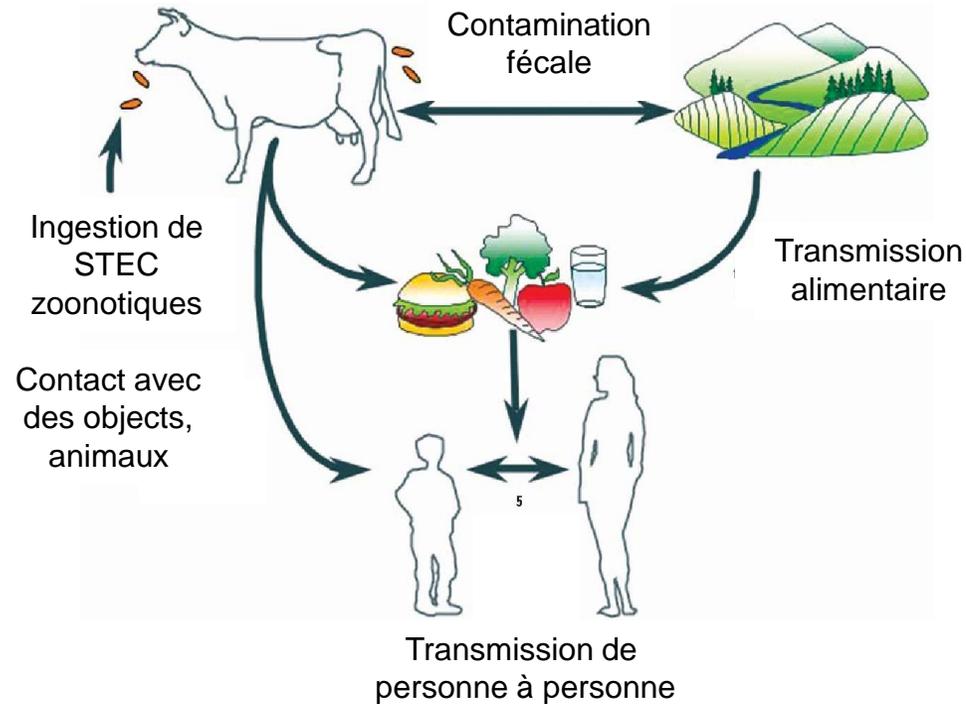


Adhésion
aux cellules
hôtes

Makino *et al.*, 1998; McDaniel *et al.*, 1995

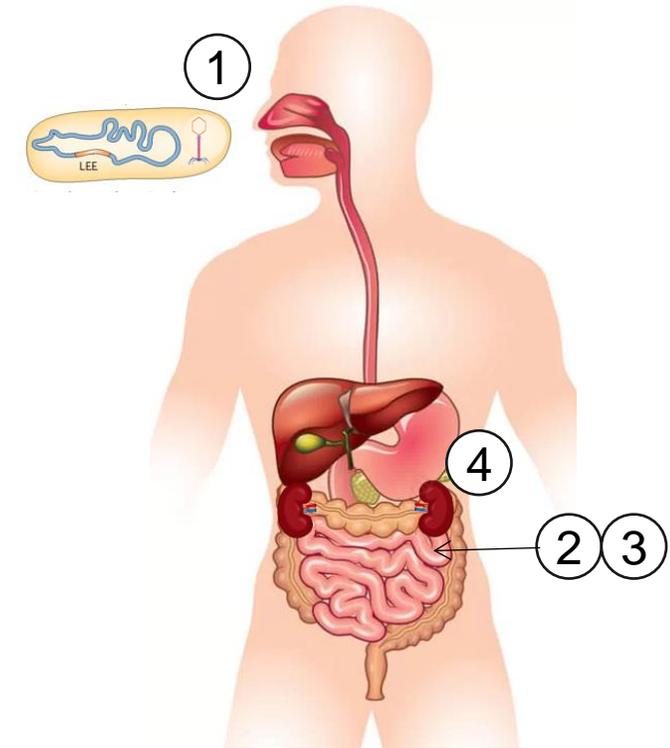
- Diarrhée aqueuse, colite hémorragique
- Syndrome hémolytique et urémique (SHU, 5-10% d'infection STEC)

Pathogénicité des STEC



Pathogène à transmission essentiellement alimentaire

- ① Ingestion de la bactérie
- ↓
- ② Attachement et colonisation
⇒ Nécessite des facteurs d'adhésion (ex: intimine)
- ↓
- ③ Production de la toxine Shiga
⇒ Mort cellulaire (diarrhée)
- ↓
- ④ Circulation de la toxine via la circulation sanguine
⇒ Atteinte d'autres organes
⇒ Causes symptômes sévères (SHU, CH)



SHU: Syndrome hémolytique et urémique
CH: Colite hémorragique

Récentes épidémies SHU en France

- Plusieurs sources, principalement fromage au lait cru (O26:H11, *stx* et *eae* positive)



ACTUALITÉ 01-06-2018 (mis à jour le 20-05-2019)

2018

Epidémie de syndrome hémolytique et urémique pédiatrique à Escherichia coli O26 en France métropolitaine en lien avec la consommation de reblochon : point au 31 mai 2018



ENQUÊTES/ÉTUDES 10-12-2020 (mis à jour le 10-10-2022)

2019

Épidémie d'infections à Escherichia coli producteur de Shiga-toxines O26:H11 liée à la consommation de fromages au lait cru. France, mars-mai 2019



PRESSE 18-03-2022 (mis à jour le 18-03-2022)

2022

Cas graves de syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'enfant : retrait - rappel préventif de lots de pizzas surgelées Fraîch'Up de la marque Buitoni en raison d'une possible contamination par la bactérie Escherichia coli O26



ENQUÊTES/ÉTUDES 12-07-2022 (mis à jour le 23-09-2022)

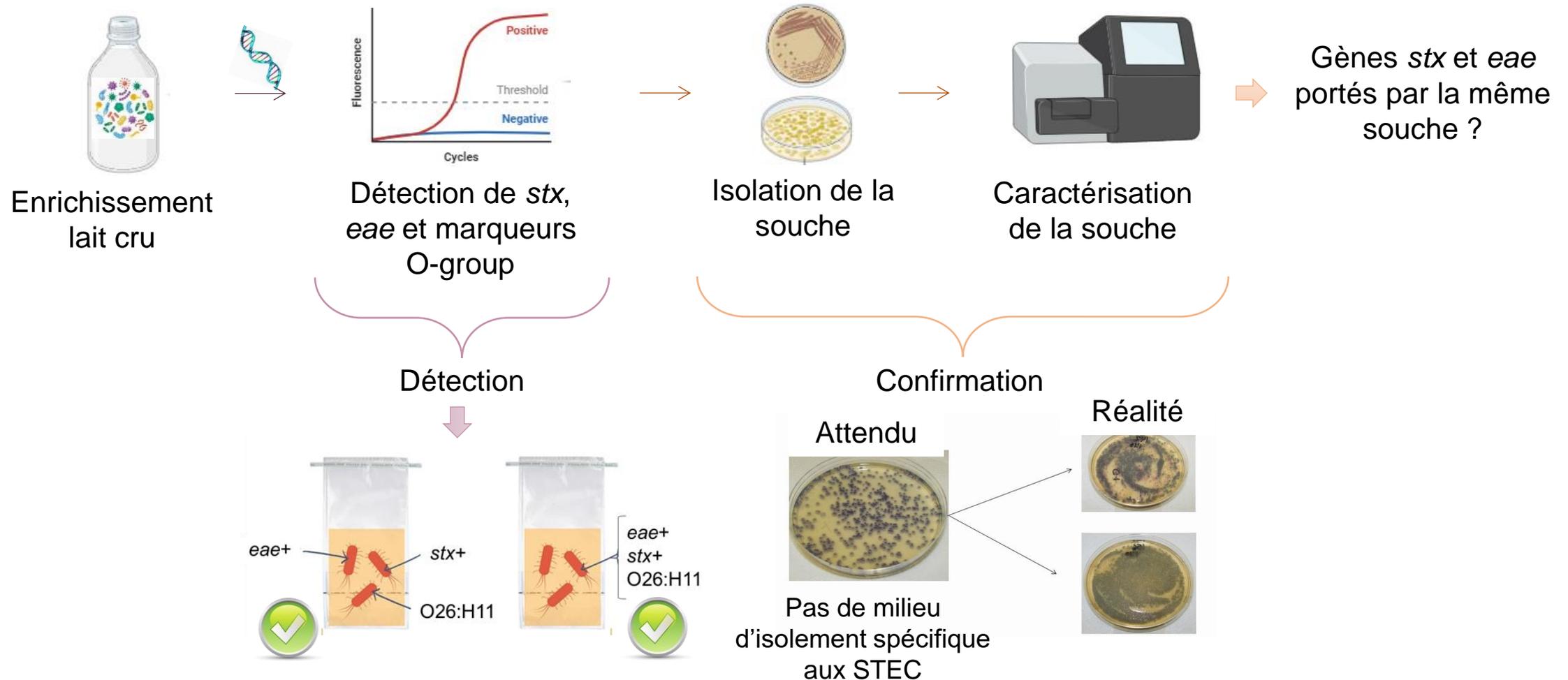
2022

Toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à E. coli O157 producteur de Shiga-toxines, associée à la consommation de concombres crus

Fromage au lait cru → O26:H11

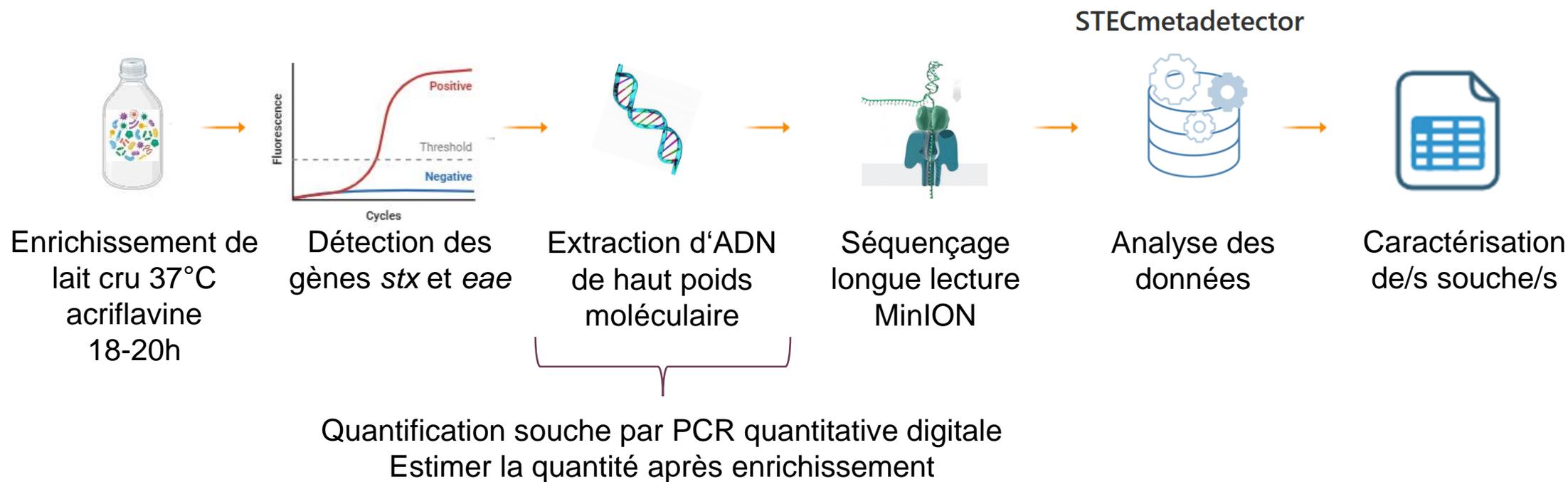
Caractérisation des EHEC typiques à partir de lait cru

- ISO/TS 13136:2012 pour détection STEC dans les aliments destinés aux animaux et aux humains



Projet MetaDetect

Evaluer l'usage des nouvelles approches de séquençage à longues lectures afin de caractériser les EHEC typiques directement à partir de lait cru



Séquençage MinION pour la caractérisation de EHECt

Contamination artificielle
500, 50 et 5 CFU/mL
(n=3, 4 et 5)

EHECt
O26:H11

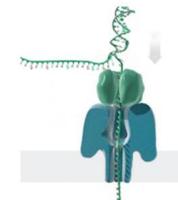


Enrichissement
de lait cru
37°C acriflavine*
18-20h

Détection *stx eae*
Quantification EHECt



Extraction d'ADN
de haut poids
moléculaire
Jaudou *et al.*, 2022



Séquençage
longue lecture
MinION

STECmetadetector



Analyse des
données



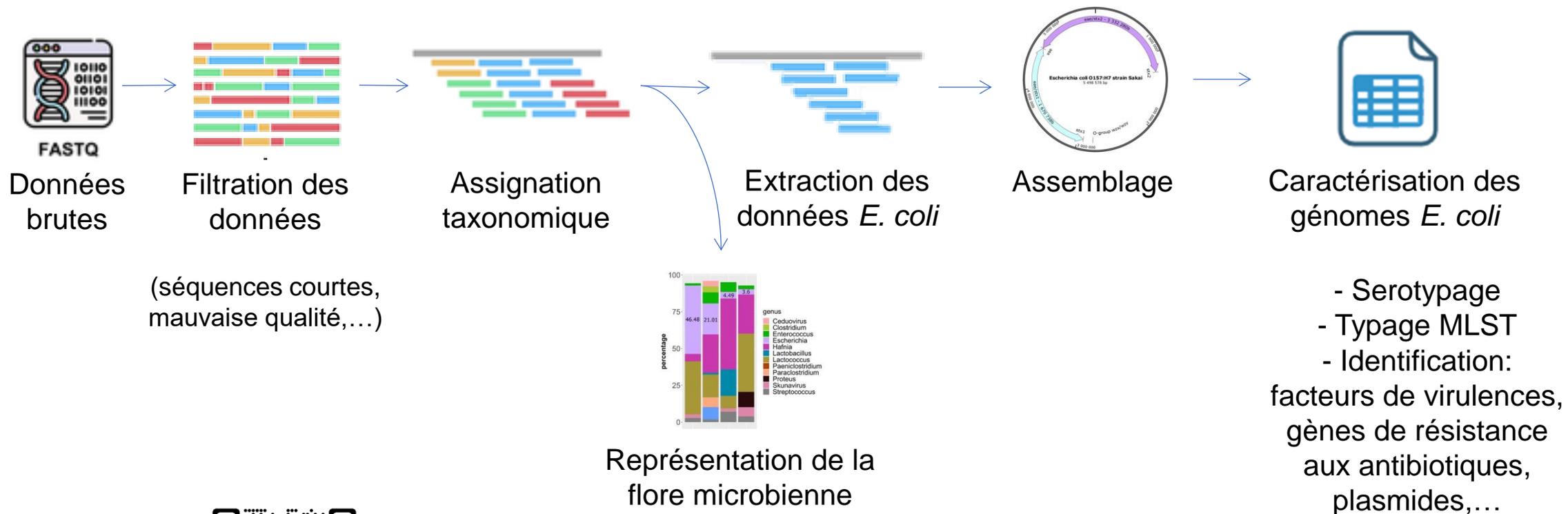
Caractérisation
de/s souche/s

*Antibiotique ralentit la
croissance des bactéries
à coloration de Gram +



Caractérisation des EHECt grâce au séquençage MinION et assemblage génome

Des données MinION à la reconstruction du génome



STECmetadetector



Jaudou *et al.*, 2023a

https://gitlab.com/bfr_bioinformatics/STECmetadetector

Caractérisation des EHEC typiques

1. Caractérisation des EHECt

- ✓ 500 CFU.mL⁻¹
- ✓ 50 CFU.mL⁻¹
- ✓ 5 CFU.mL⁻¹

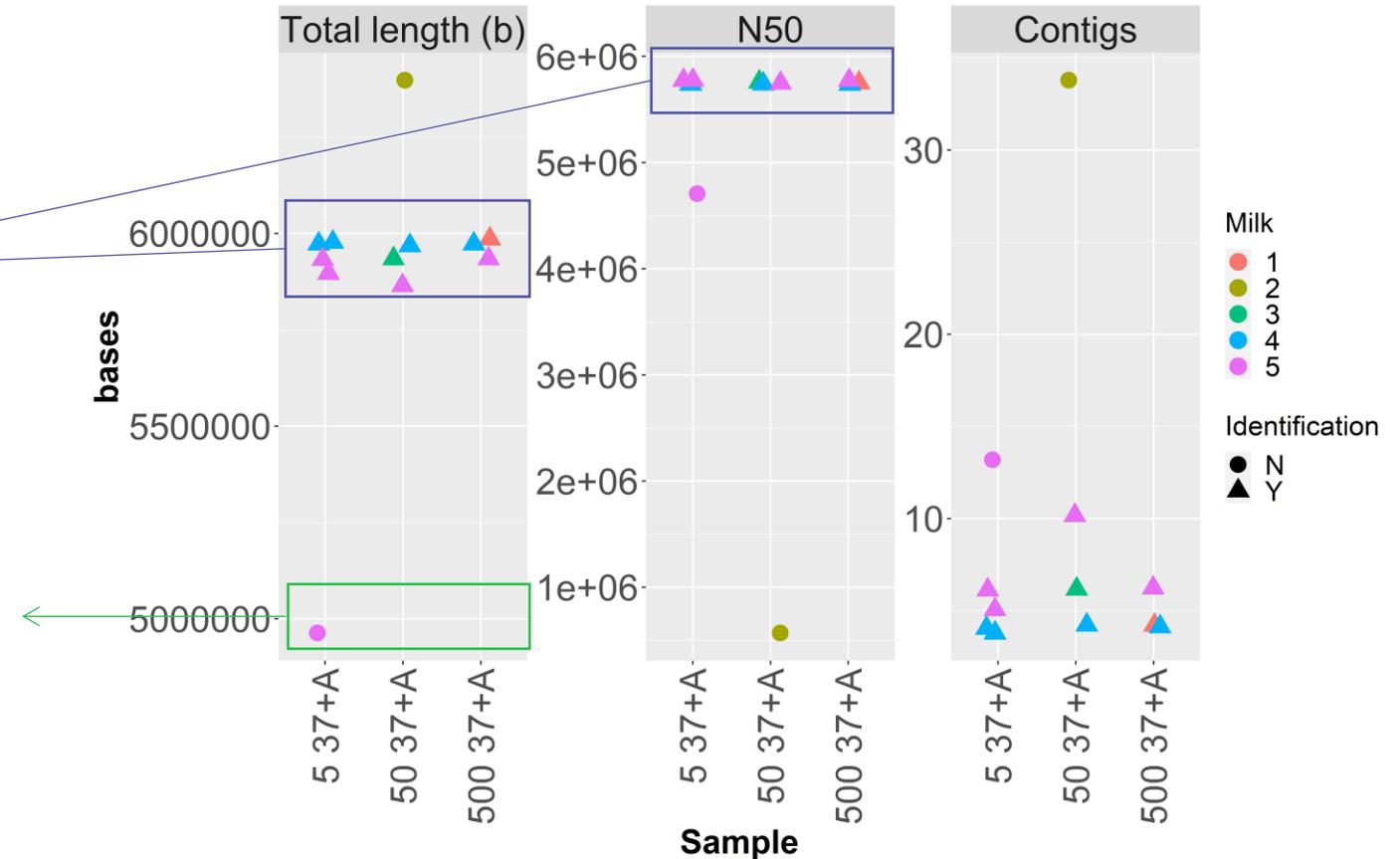
Quantification après enrichissement



qdPCR > 10⁸ copies.mL⁻¹

2. Présence de plusieurs *E. coli*

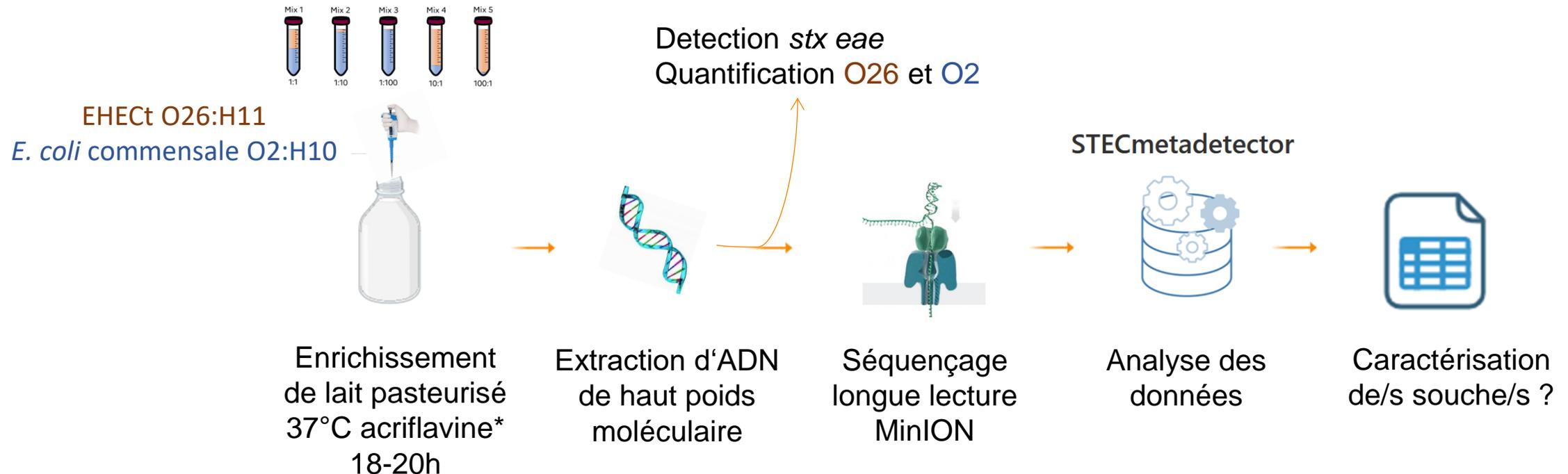
- ✓ 1 réplikat sur 3 à 5 CFU.mL⁻¹



Caractérisation des EHEC typiques faible niveau de contamination
Limité par la quantité de EHECt et la présence d'autres souches *E. coli*

Caractérisation des EHEC typiques

Co-contamination artificielle



Possible si

- EHECt > 10⁸ copies.mL⁻¹
- au moins 10x plus ou moins de données EHECt

Identification des EHECt grâce au machine learning

STECmetadetector
 Quantité EHECt > 10^8 copies.mL⁻¹
 Ratio EHECt/autre *E. coli* > 10:1

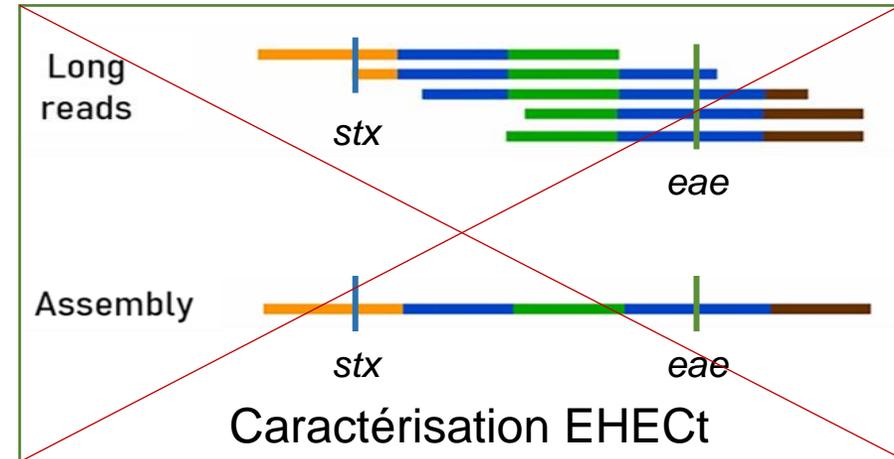
Conditions non respectées



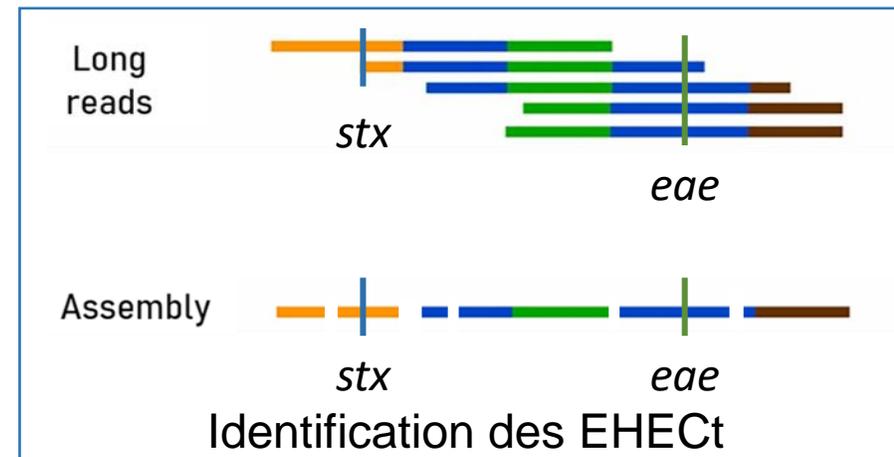
Identification de marqueurs génétiques permettant de prédire la colocalisation *stx* et *eae* dans un même génome

Quantité EHECt > 10^8 copies.mL⁻¹

Conditions respectées

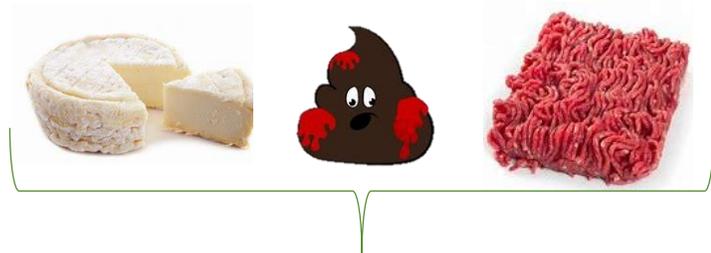


Conditions respectées



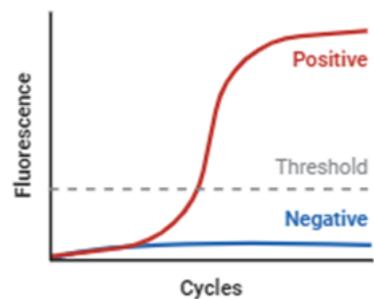
Application sur des échantillons naturellement contaminés

Bouillons d'enrichissement



Quantification des souches (qdPCR)

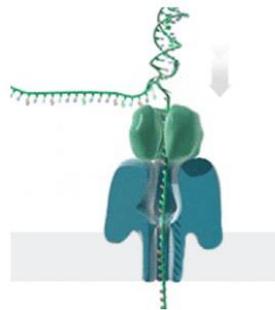
Caractérisation EHECt



Echantillons positifs pour *stx* et *eae*



Extraction ADN HPM



Séquençage MinION

STECmetadetector



Analyse de données

Présence EHECt

➡ Caractérisation des EHEC typiques quand conditions respectées
Si quantité de données suffisante mais plusieurs souches *E. coli*, identification

Avancées

- Développé une méthode permettant la caractérisation des STEC à partir de lait cru
- Identification génétique des EHECt dans matrices complexes
- Technologie de séquençage MiNION: portable, faible coût d'investissement, analyse rapide en temps réel de plusieurs échantillons
- Piste d'améliorations: limite de caractérisation
 - Améliorer l'enrichissement mais étape qui reste compliquée (bactéries de la même famille)
 - Trouver un moyen de distinguer différentes souches de *E. coli*



Il y a 10 ans, séquencer
1 génome humain
coûtait 100M de dollars



Aujourd'hui cela
revient à 1000
dollars



Peut-être < 10€
dans le future ?

Prix actuel pour confirmation
EHECt: 5-6€ par échantillon



Merci pour votre attention

Anses

- Sabine DELANNOY
- Patrick FACH
- Maï-Lan TRAN
- Fabien VORIMORE



BfR

- Josephine GRUETZKE
- Burkhard MALORNY
- Carlus DENEKE
- Elisabeth SCHUH
- André GOEHLER



And colleagues from 4NSZ and NRL *E. coli* groups

Collaborators

Family, friends, colleagues from the OS and from Berlin

Académie Agriculture de France

- Anne BRISABOIS
- Anne-Marie HATTENBERGER

Jury members

- Eric OSWALD
- Mickaël DESVAUX-LENOTRE
- Catherine SCHOULER
- Stefano MORABITO

PhD Committee members

- Karine LAROUCAU (ANSES)
- Stéphane BONACORSI (Robert Debré)
- Fabrice TOUZAIN (ANSES)