



**HAL**  
open science

## Mise en place d'une stratégie de caractérisation d'E. coli pathogène dans des eaux destinées à la production d'eau d'alimentation

Stéphanie Etienne, Laurence Mathieu, Issa Sy, Jean-Sébastien Py,  
Jean-François Munoz, Benoit Gassilloud

### ► To cite this version:

Stéphanie Etienne, Laurence Mathieu, Issa Sy, Jean-Sébastien Py, Jean-François Munoz, et al.. Mise en place d'une stratégie de caractérisation d'E. coli pathogène dans des eaux destinées à la production d'eau d'alimentation. 2019. hal-03749236

**HAL Id: hal-03749236**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03749236>**

Submitted on 10 Aug 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

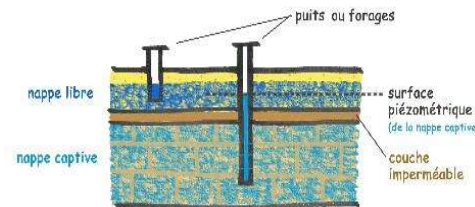
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Mise en place d'une stratégie de caractérisation d'E. coli pathogène dans des eaux destinées à la production d'eau d'alimentation

*Stéphanie Etienne, Laurence Mathieu, Issa Sy, Jean-Sébastien Py, Jean-François Munoz, Benoit Gassilloud*

**Laboratoire d'Hydrologie de Nancy**

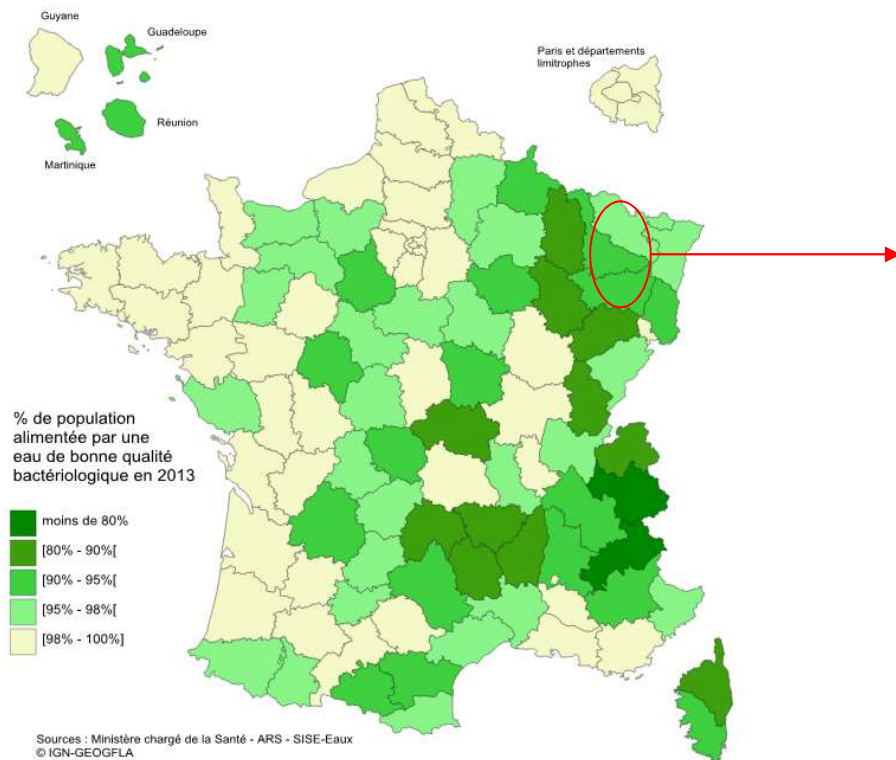
ZAM Journées scientifiques 21-22 Mai 2019



# Site d'étude : La Moselle



% de population alimentée par une eau de bonne qualité bactériologique en 2013



Source: site gouvernementale environnement et santé

## ➤ En France

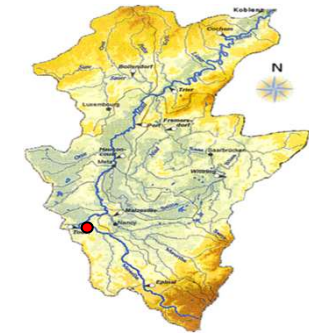
- 27 000 Unités de distributions
- Environ 33400 captages
- 300 000 prélèvements d'eau en 2013



En lien avec la qualité :  
-physico-chimique  
-microbiologique

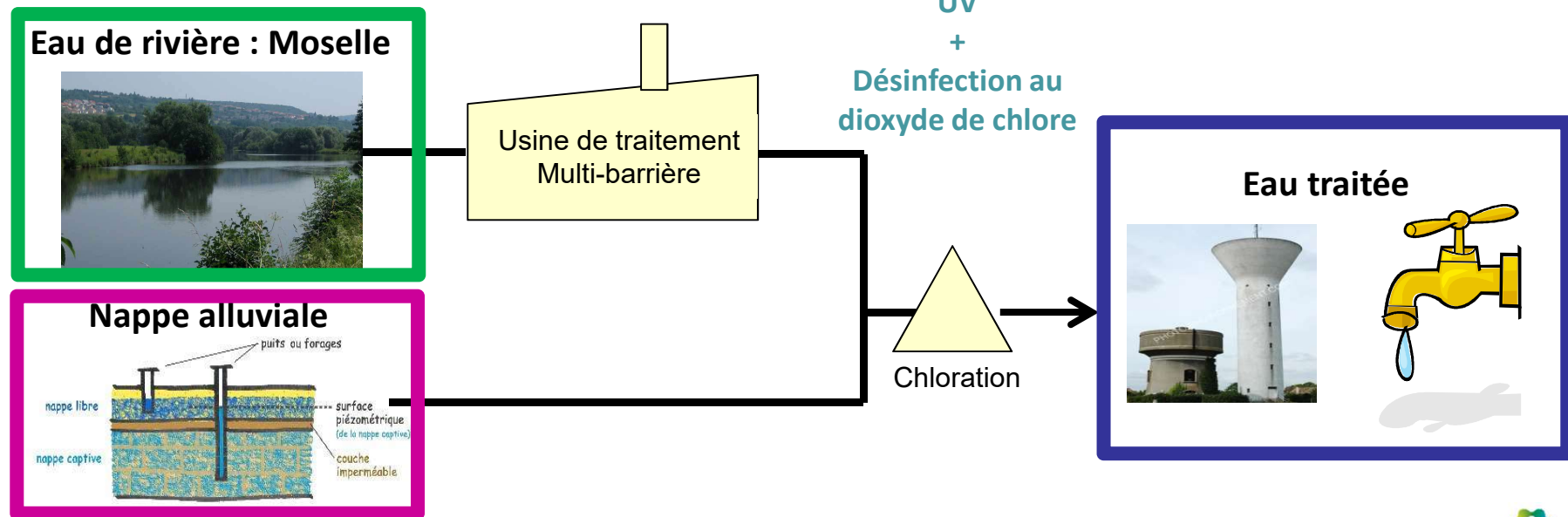


- ❖ Moselle : ressource hydrique potabilisée
- ❖ Soit en captage direct ou en mélange avec une autre ressource
- ❖ Calibration du traitement en fonction du niveau de pollution : A1, A2 et A3



Ex : Traitement conventionnel :

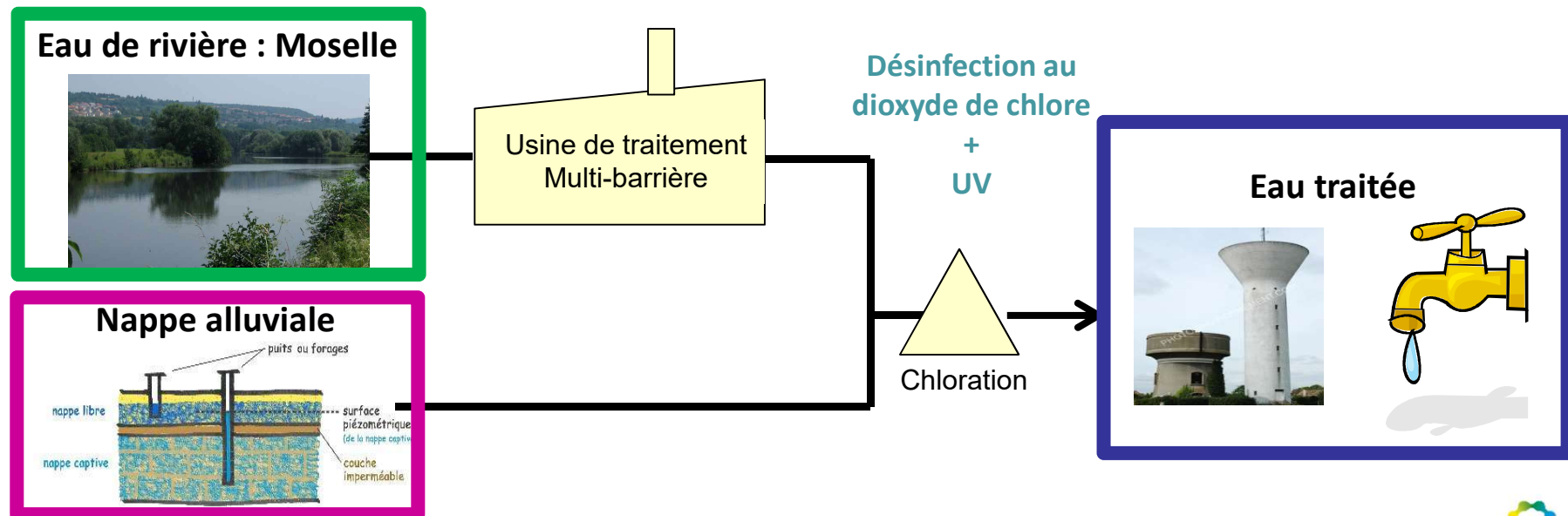
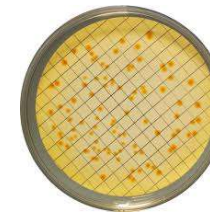
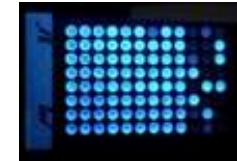
- coagulation-floculation (chlore ferrique et polymères) – clarification par décantation
- Ozonation et filtration sur filtre charbon actif
- filtration sur sable





Qualité microbiologique : Directive européenne 98/83 CE transposé dans le code de la santé publique relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

- Suivi des indicateurs de contamination fécale sur la ressource : ISO NF EN 9308-3
- Suivi sur l'eau traitée
  - ✓ recherche *E.coli* et coliformes : ISO NF EN 9308-1
  - ✓ recherche des entérocoques : ISO NF EN 7899-2
  - ✓ recherche des ASR : ISO NF EN 26461-2







## Principaux micro-organismes pathogènes pour l'Homme transmissible par l'eau (WHO, 2006)

Pathogen	Health significance	Persistence in water supplies <sup>a</sup>	Resistance to chlorine <sup>b</sup>	Relative infectivity <sup>c</sup>	Important animal source
<b>Bacteria</b>					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Low	May multiply	Low	Low	No
<i>Campylobacter jejuni, C. coli</i>	High	Moderate	Low	Moderate	Yes
<i>Escherichia coli</i> – Pathogenic <sup>d</sup>	High	Moderate	Low	Low	Yes
<i>E. coli</i> – Enterohaemorrhagic	High	Moderate	Low	High	Yes
<i>Legionella</i> spp.	High	Multiply	Low	Moderate	No
Non-tuberculous mycobacteria	Low	Multiply	High	Low	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>e</sup>	Moderate	May multiply	Moderate	Low	No
<i>Salmonella typhi</i>	High	Moderate	Low	Low	No
Other salmonellae	High	May multiply	Low	Low	Yes
<i>Shigella</i> spp.	High	Short	Low	Moderate	No
<i>Vibrio cholerae</i>	High	Short	Low	Low	No
<i>Yersinia enterocolitica</i>	High	Long	Low	Low	Yes
<b>Viruses</b>					
Adenoviruses	High	Long	Moderate	High	No
Enteroviruses	High	Long	Moderate	High	No
Hepatitis A virus	High	Long	Moderate	High	No
Hepatitis E virus	High	Long	Moderate	High	Potentially
Noroviruses and sapoviruses	High	Long	Moderate	High	Potentially
Rotaviruses	High	Long	Moderate	High	No
<b>Protozoa</b>					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	High	Long	High	High	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	High	Long	High	High	Yes
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	High	Long	High	High	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	High	Moderate	High	High	No
<i>Giardia intestinalis</i>	High	Moderate	High	High	Yes
<i>Naegleria fowleri</i>	High	May multiply <sup>f</sup>	High	High	No
<i>Toxoplasma gondii</i>	High	Long	High	High	Yes
<b>Helminths</b>					
<i>Dracunculus medinensis</i>	High	Moderate	Moderate	High	No
<i>Schistosoma</i> spp.	High	Short	Moderate	High	Yes

## Pathogène étudié : *Escherichia coli*



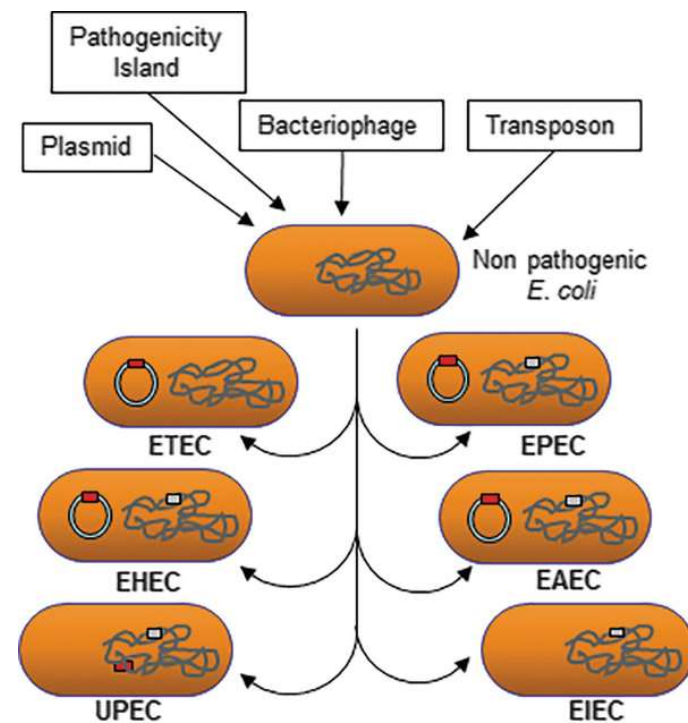
- *E. coli* :
  - Représente 80% de la flore intestinale aérobie de l'homme
  - Très présente dans la flore intestinale aérobie des mammifères
  - Retrouvé dans l'environnement : témoin de contamination fécale
  - La majorité des souches sont non pathogènes
  - Acquisition de gènes de virulence : *E. coli* pathogènes



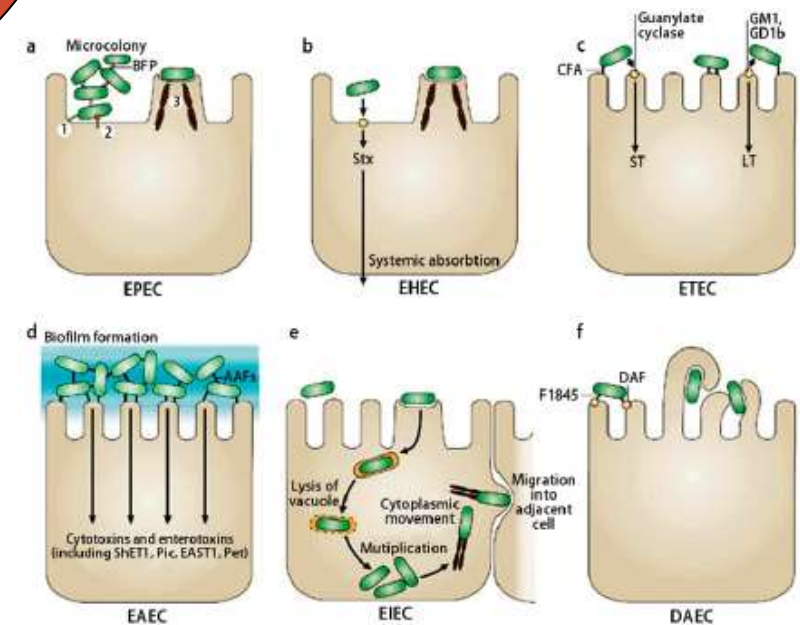
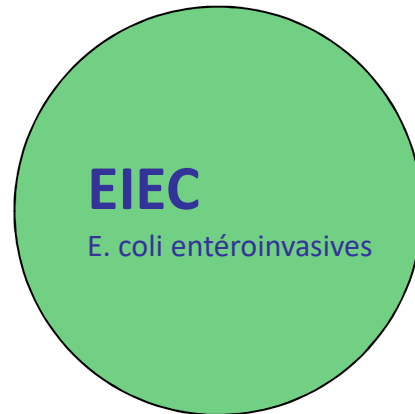
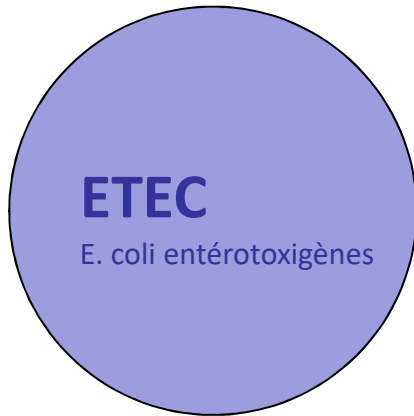
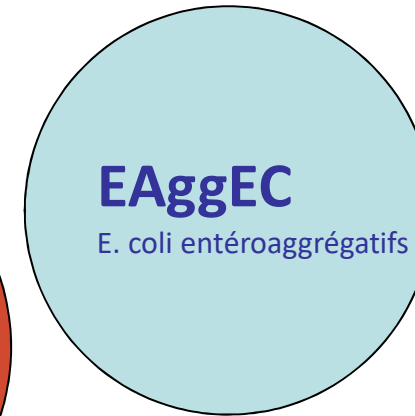
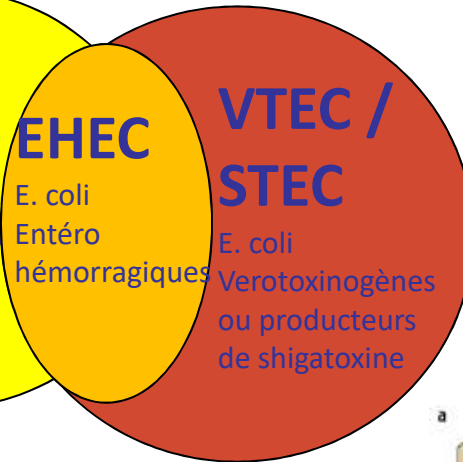
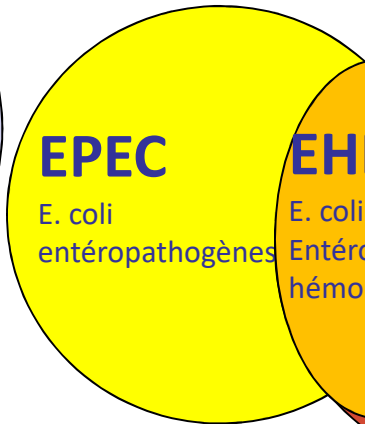
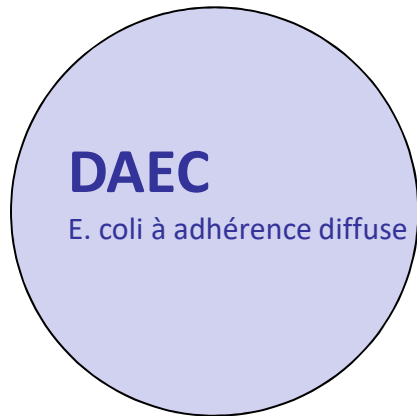
- *E. coli* extra-intestinaux : infections du tractus urinaire, des méningites, bactériémies...

- *E. coli* diarrhéiques :

Classification suivant 7 pathotypes connus



# Pathotypes diarrhéiques



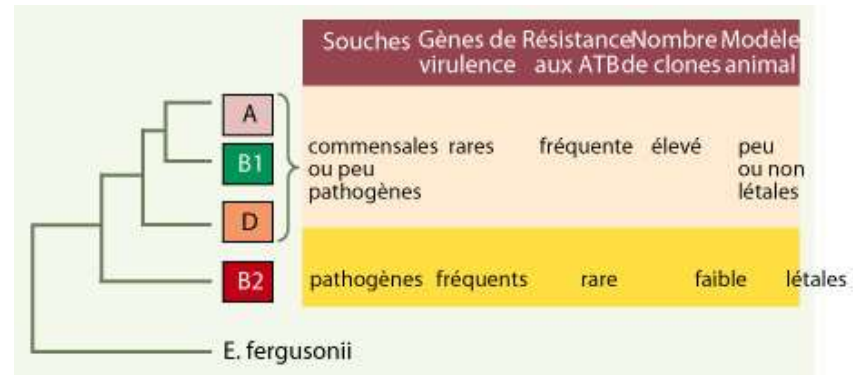
## STEC: *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines

- Top 5: O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7
- Depuis incident des graines germées 2011 -> top 6 (+ O104:H4)

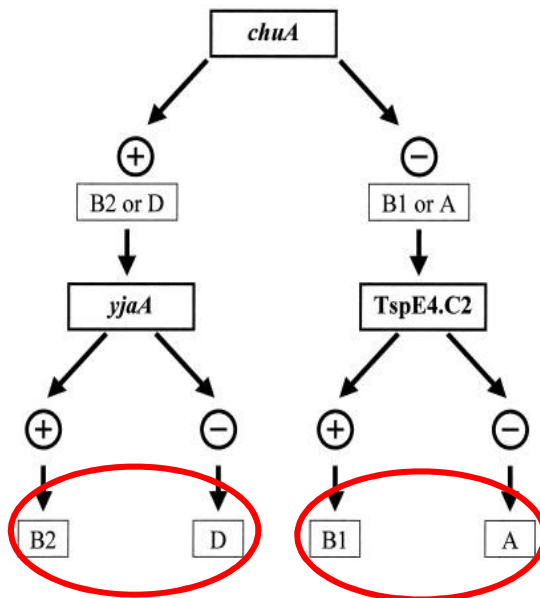




## Les *E. coli* ont été classés en 4 groupes phylogénétiques (2000)



Protéines permettant la classification des *E. coli* en 4 groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D. Clermont *et al.*, 2000.

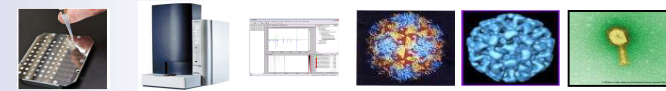


Amplification PCR

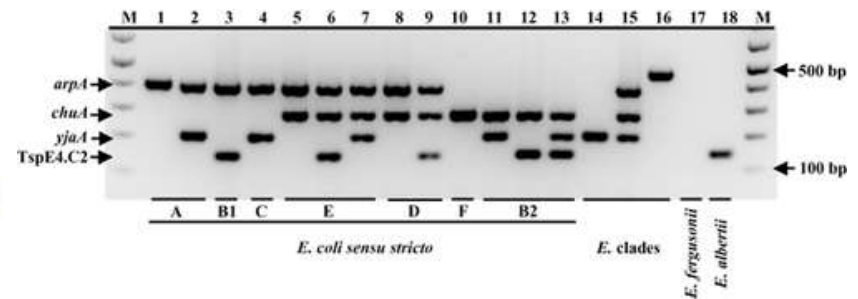
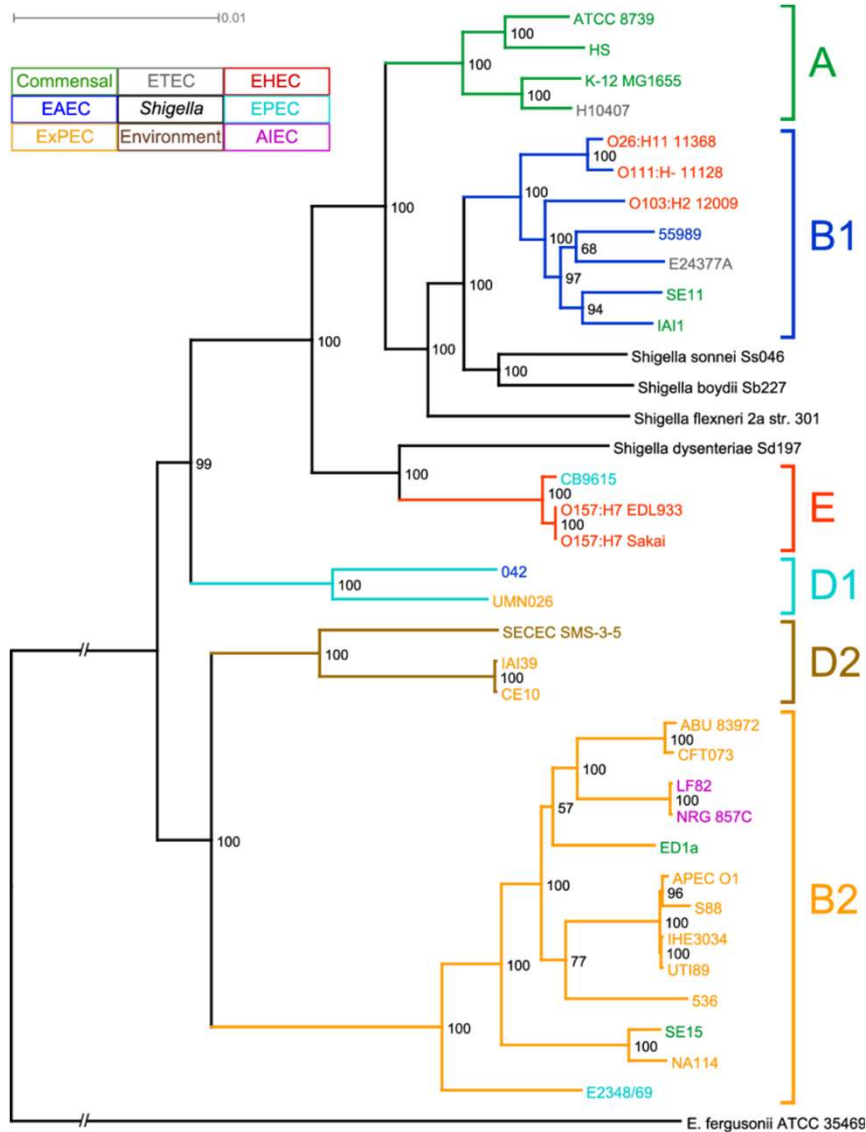
➤ Groupe B2 et D : *E. coli* pathogène extra-intestinal, d'origine humaine

➤ Groupe A et B1 : *E. coli* pathogène intestinal, généralement commensal

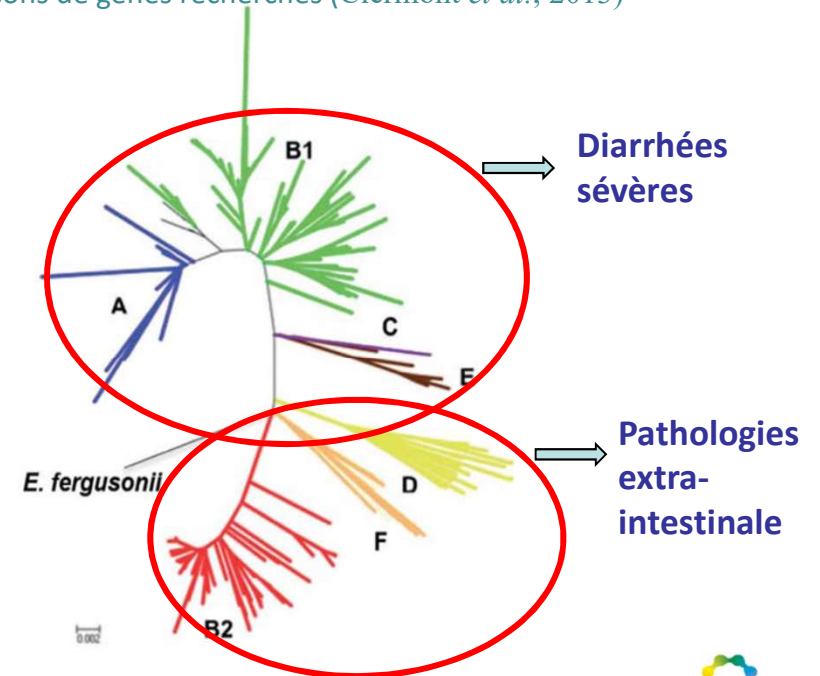
# Classification par phylogroupes



## Les *E. coli* ont été classés en 7 groupes phylogénétiques (2013)



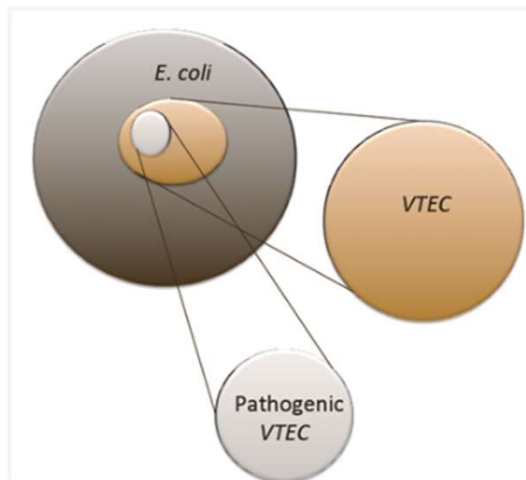
Mise en évidence des phylogroupes de *E. coli* en fonction des combinaisons de gènes recherchés (Clermont *et al.*, 2013)





## *E. coli* producteurs de shiga-toxines (STEC/VTEC)

- Principale cause de cas de colite hémorragique (CH) et de syndrome hémolytique-urémique (SHU) chez l'homme.
- Le SHU :
  - principale cause d'insuffisance rénale chez les enfants < 3 ans
  - responsable de séquelles rénales graves dans un tiers des cas.
  - peut entraîner la mort dans 1 à 2 % des cas
- Epidémiologie :
  - entre 70 et 100 enfants atteints /an
  - épidémie O104:H4 en 2011 en Allemagne : 4320 cas de diarrhées sanglantes, 850 cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU) et 82 décès



Séropathotype	Incidence relative	Implication dans des épidémies	Association avec les SHU ou les colites hémorragiques	Sérotypes
A	Élevée	Fréquente	Oui	O157:H7, O157:NM*
B	Modérée	Non fréquente	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:H8/NM, O121:H19, O145:NM
C	Faible	Rare	Oui	O91:H21, O104:H21, O113:H21, et autres sérotypes
D	Faible	Rare	Non	multiples sérotypes
E	Non humain**	n.a.	n.a.	multiples sérotypes

\* NM : non mobile. \*\* Sérotypes de STEC isolés chez les animaux mais jamais associés à des infections humaines.  
n.a. : non applicable.

- **Pathogènes émergents importants en santé publique impliqués dans de nombreuses épidémies alimentaires**



➤ **Indicateur de contamination fécale dans le domaine de l'eau :**

❖ **Eau traitée** ➤ **Doit être absent dans 100 mL**

✓ La recherche des *E. coli* se fait avec des normes analytique ISO NF EN 9308-1 :  
Culture 24h - 48h à 36 et 44 ° C sur milieu gélosé sélectif (TTC) : recherche d'*E.coli* et coliformes

✓ La recherche des entérocoques fécaux se fait avec des normes analytique ISO NF EN 7899-2 :  
Culture 48h à 36° C sur milieu gélosé sélectif (Slanetz) : recherche des entérocoques

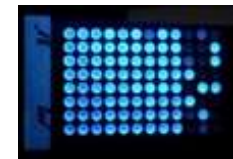
➤ ***E. coli* : Bacille gram – de la famille des *Entérobactériaceae***



✓ Défini par différents caractères phénotypiques: lactose +, oxydase -, thermotolérante, indole +,  $\beta$ -galactosidase + et  $\beta$ -glucuronidase +

❖ **Moselle**

✓ La recherche des *E. coli* indicateur se fait avec des normes analytique ISO NF EN 9308-3  
(+ entérocoques fécaux) par méthode NPP

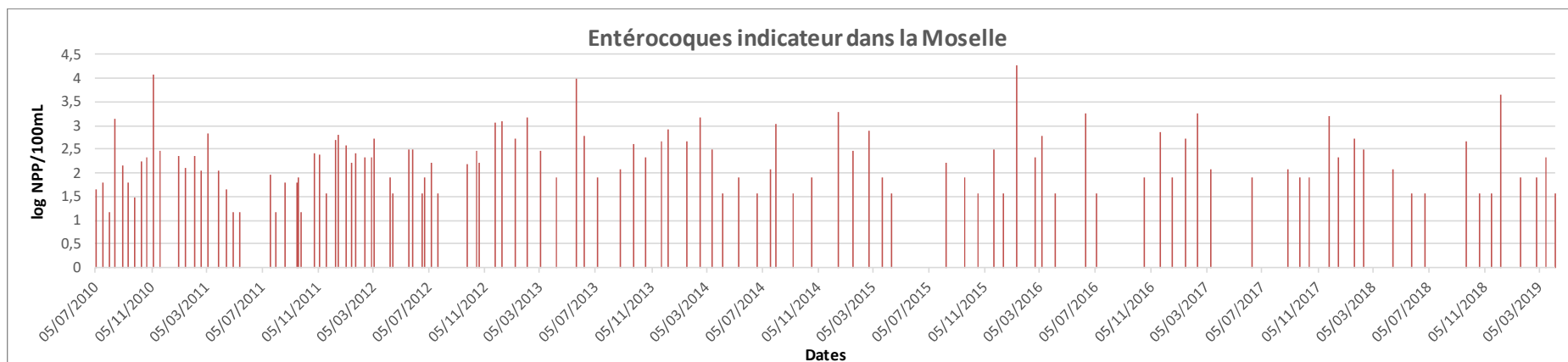
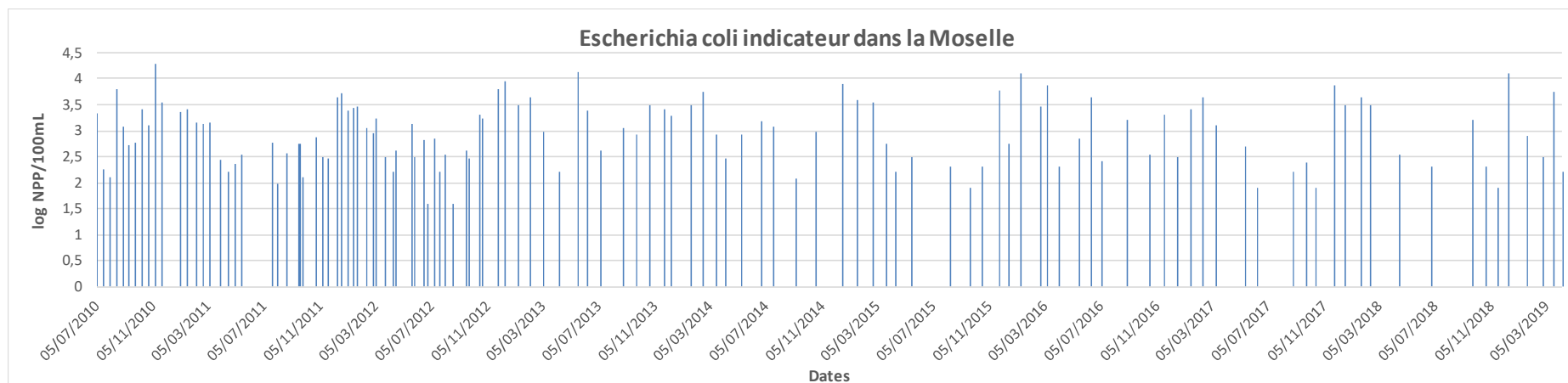


➤ **Cette recherche ne permet pas de distinguer *E. coli* non pathogènes des pathogènes**



## ❖ Dans la Moselle :

100% d'échantillons positifs en indicateurs fécaux en *E. coli* et Entérocoques







## 1. Recherche direct de marqueurs génomiques caractéristiques E coli STEC (eae, stx1 et 2)

- PCRq après extraction génomique et concentration d'1 litre d'eau
- PCR de groupe (O26, O103, O111, O145 et O157)
- *Absence d'informations sur la viabilité*

## 2. Recherche de marqueurs génomiques et mise en évidence d'une multiplication bactérienne par PCRq dans les bouillons de culture

- PCR de groupes (O26, O103, O111, O145 et O157)
- Spectrométrie de masse MALDI-TOF (développement)
- *Quantification relative*

## 3. Culture classique dans différents bouillons et milieux gélosés sélectifs

- Identification IMS
- PCR de groupes (O26, O103, O111, O145 et O157)
- Spectrométrie de masse MALDI-TOF (développement)
- *Isolement très fastidieux, formes non cultivables*

LSB3



---

***Journées scientifiques ZAM 2016***

**Occurrence de bactéries *E. coli* pathogènes pour l'homme dans les eaux de la rivière Moselle pouvant être utilisées pour la production d'eau destinées à la consommation**

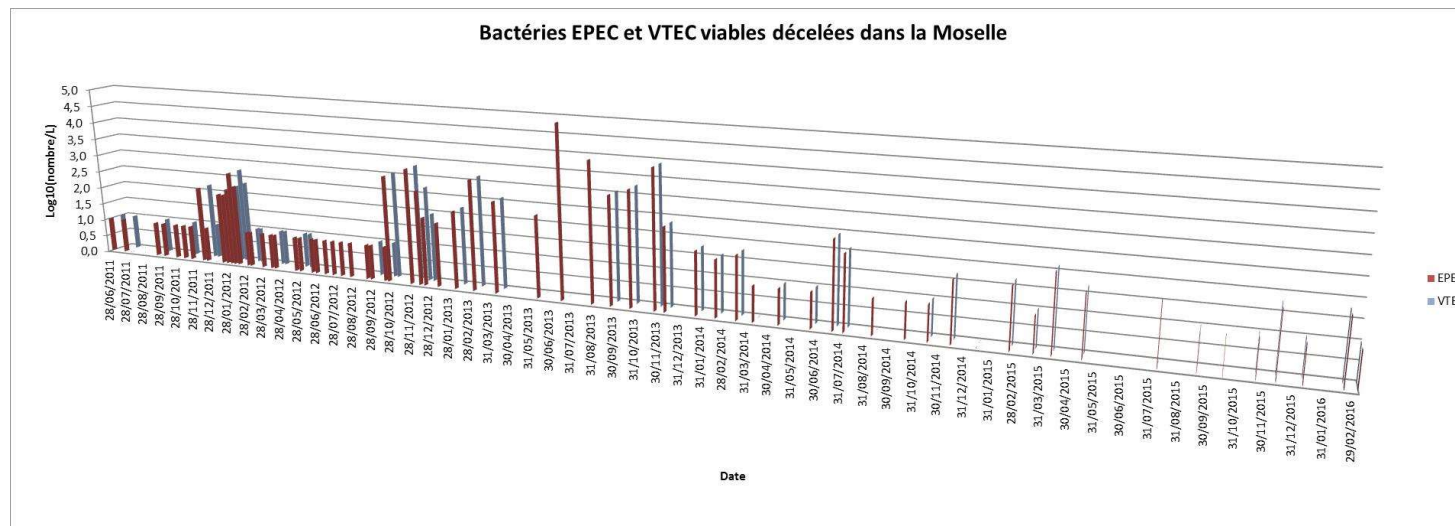
**Benoit Gassilloud et Stéphanie Etienne  
Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (ANSES-LHN)**



## ❖ dans la Moselle



- **91 % des échantillons prélevés** contiennent des E coli pathogènes viables (présence du gène eae)
- **66% des échantillons prélevés** contiennent des bactéries STEC (gènes eae et stx1 et/ou stx2)
- Répartition des sérogroupes : 71% O26, 87% O103, 76% O111, 89% O145 et **62% pour O157**
- Concentration pouvant dépasser ponctuellement 4 Log10
- Par rapport aux indicateurs différence de > 2 log10 (moins de 1%)





- *E. Coli* VTEC : occurrence et résistance dans les milieux hydriques environnementaux
- Leur isolement est relativement complexe
- Méthodes moléculaires (PCR) : sensibles et spécifiques mais pas pratiques pour une utilisation en routine
- MALDI-TOF : alternative aux méthodes moléculaires
- LHN, depuis 2017 : Programme de développement de spectres de références de VTEC

Master 2 Microbiologie– Maud Variot– Année 2017/2018



Discriminer les *E. coli* pathogènes des non pathogènes  
Identifier et recenser des marqueurs caractéristiques

Etude de Validation de la robustesse des biomarqueurs caractéristiques

Master 2 Microbiologie– Issa SY– Année 2018/2019



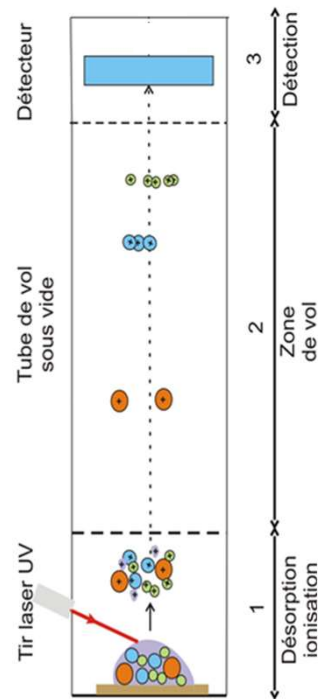
Sur des souches *E. coli* non pathogènes isolées de fèces d'animaux différents



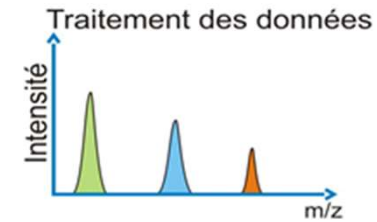
## Principe du fonctionnement du spectromètre de masse MALDI-TOF



MALDI-TOF Microflex™ Bruker



Source: Rémi Moreda, site de l'académie de Montpellier



Molécules à séparer

Plaquette MALDI  
Échantillon mélangé à la matrice

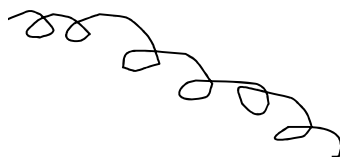
➤ Utilisé principalement en routine

➤ Identification bactérienne





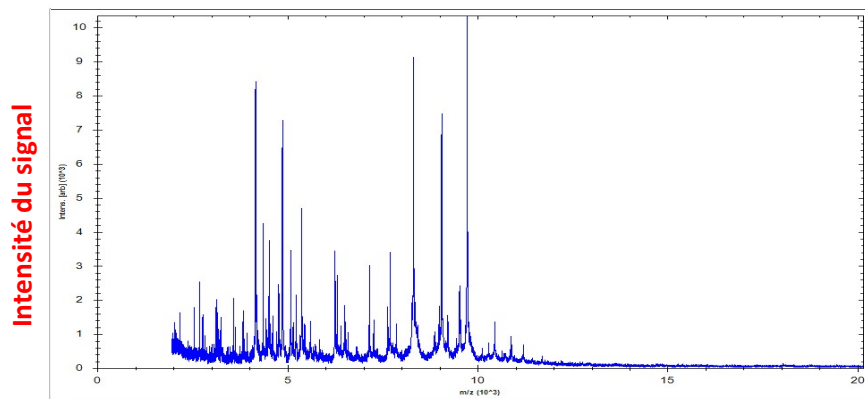
Les protéines traversent le tube de vol avec une vitesse dépendant de  $m/z$



## Profil protéomique

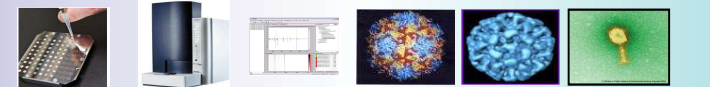
- spectre avec 100 à 200 pics
- Représentation principale de ces pics : protéines cytosoliques basiques, protéines ribosomales, des protéines de choc thermique, des protéines liant l'ADN et de l'ARN chaperonne ...
- Protéines conservées

## Génération d'un spectre

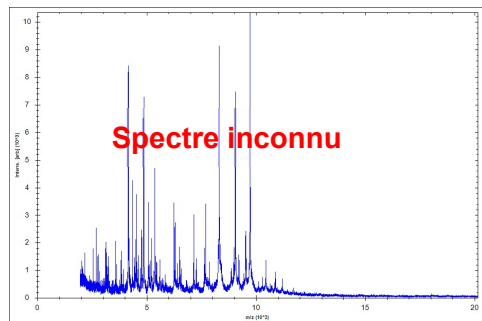


Valeurs  $m/z$  values : 2 to 20 kDa

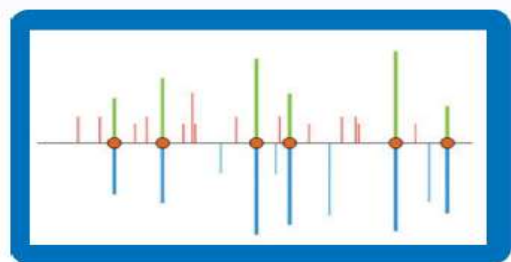
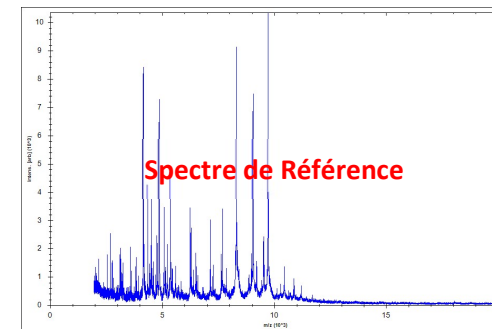
# MALDI-TOF : identification bactérienne



Comparaison des spectres générés à une base de donnée contenant une librairie de profils spectral de différents micro-organismes



Base de donnée de spectre de référence



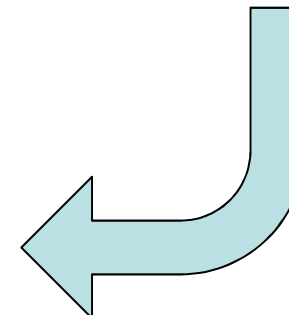
## Pattern Matching

Calcul du score de correspondance:

**Rel Score**  
% de correspondance du spectre de référence  
(e.g. 6 / 10 = 0.6)

**Rel P-Num.**  
% de correspondance du spectre inconnu  
(e.g. 6 / 20 = 0.3)

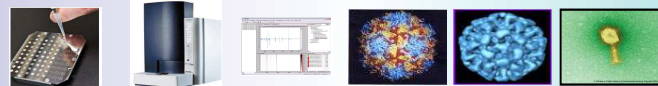
**I-Corr.**  
Correlation de l'intensité: somme des ratios  
(0,4+1+0,5+0,9+1+0,8)/6 = 0.76



- Similarité du profil de masse d'un micro-organisme inconnu avec celui d'une souche répertoriée dans la bibliothèque interrogée.
- 3 Scores individuels allant de 0 à 3: **< 1.7**   **1.7 - 2**   **2-3**



Mix	Detected Species	Log(Score)
●	Escherichia coli DSM 1576 DSM	2.349
●	Escherichia coli RV412 A1 2010 06a LBK	2.322
●	Escherichia coli DSM 682 DSM	2.311
●	Escherichia coli MB11464 1 CHB	2.177
●	Escherichia coli DSM 1103 QC DSM	2.113
●	Escherichia coli Nissl VML	2.108
●	Escherichia coli ATCC 25922 CHB	2.096
●	Escherichia coli DH5alpha BRL	2.086
●	Escherichia coli ATCC 35218 CHB	2.045
●	Escherichia coli DSM 30083T HAM	1.959



## Limite de la spectrométrie de masse MALDI-TOF



**Base de données commercialisée**

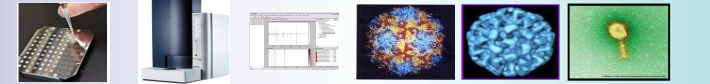
- **E coli sans discrimination**



**Création de Base de données propriétaire**

- **Caractérisation des E coli pathogène**
- **Discrimination de sérotype**
- **Caractérisation des E coli non pathogène**
- **Discrimination de phylogroupe**
- **Caractérisation des Shigella**

**Première Etape : acquérir une collection de souches représentative de l'espèce d'intérêt**



## Mise en place d'une collection de souches E coli pathogène ou non pathogène

### ➤ Souches de référence

- O157:H7 strain 43895 (ATCC) *stx1+* *stx2+*
- O157:H7 strain 43890 *stx1+* *stx2-*
- O157:H7 strain SA7 *stx1-* *stx2+*
- O157:H7 strain 12900 (NCTC) *stx1-* *stx2-*
- O26:H11 strain 09QMA277.2 *stx1+* *stx2+*
- O26:H11 strain Fred2 *stx1+* *stx2-*
- O26:H11 strain 5917/97 *stx1-* *stx2+*
- O103:H2 strain PMK5 *stx1+* *stx2-*
- O103:H2 strain CH087 *stx1+* *stx2-*
- O111:H8 strain 95NR1 *stx1+* *stx2+*
- O111:H8 strain 4417/96 *stx1+* *stx2-*
- O111:H8 strain CB6199 *stx1-* *stx2+*
- O145:H28 strain ED28 *stx1+* *stx2-*
- O145:H28 strain EH023 *stx1-* *stx2+*
- *E. coli* strain 13167 (NCTC)
- *E. coli* strain 00090 (WDCM)
- *Shigella boydii* 2 (CIP 82.50T)
- *Shigella boydii* 13 (CIP 58.21)
- *Shigella flexneri* (CIP 82.48T)
- *Shigella flexneri* 2 (CIP 104222)
- *Shigella sonnei* (CIP 52.55)
- *Shigella sonnei* (CIP 82.49T)

### ➤ Souches de l'environnement issus de projets de recherche

*E. coli* lac+ indole +

*E. coli* lac+ indole –

*E. coli* lac- indole +

*E. coli* lac+ indole +  $\beta$  glucuronidase –

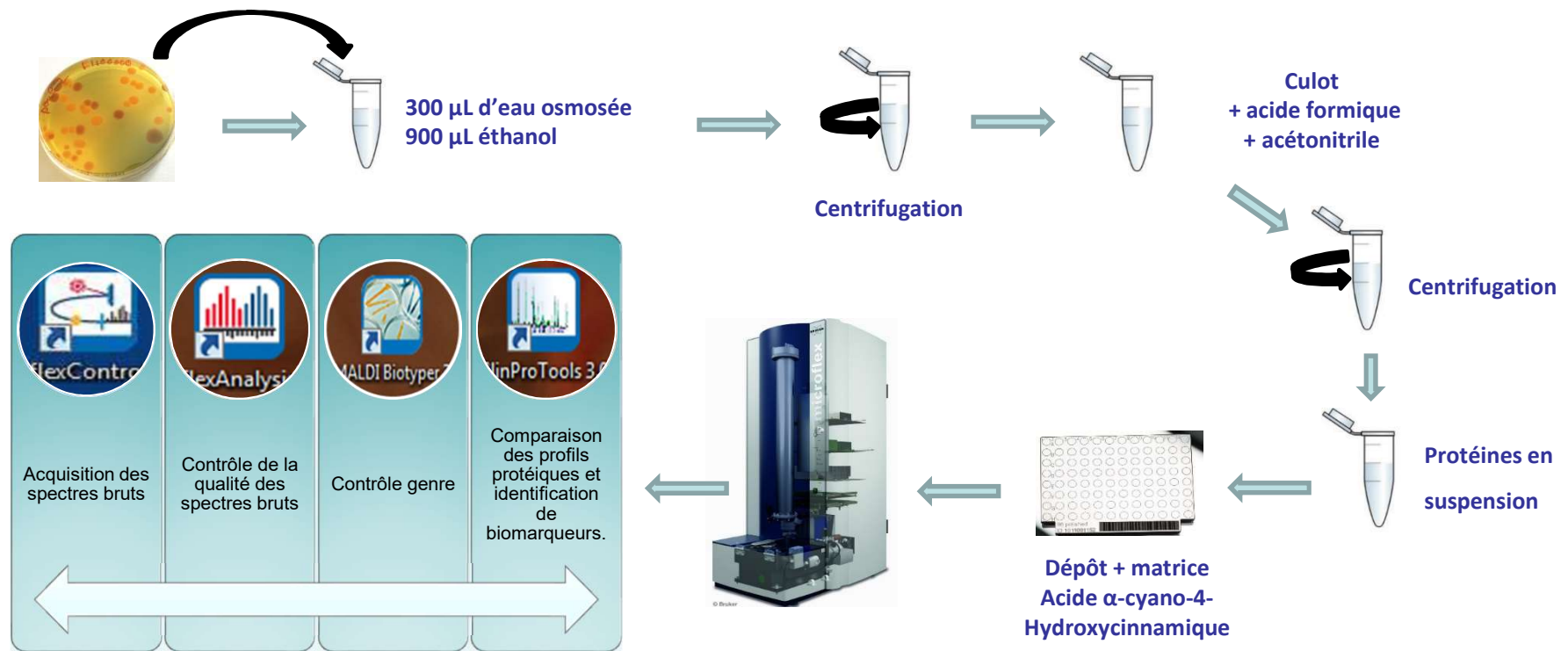
### ➤ Souches animaux





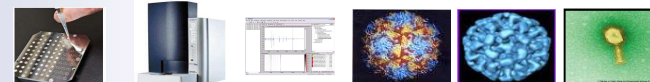
## Principe Création de spectre de référence : Matériel et Méthodes

- Analyse sur des extraits protéiques
- Nécessite une extraction des protéines

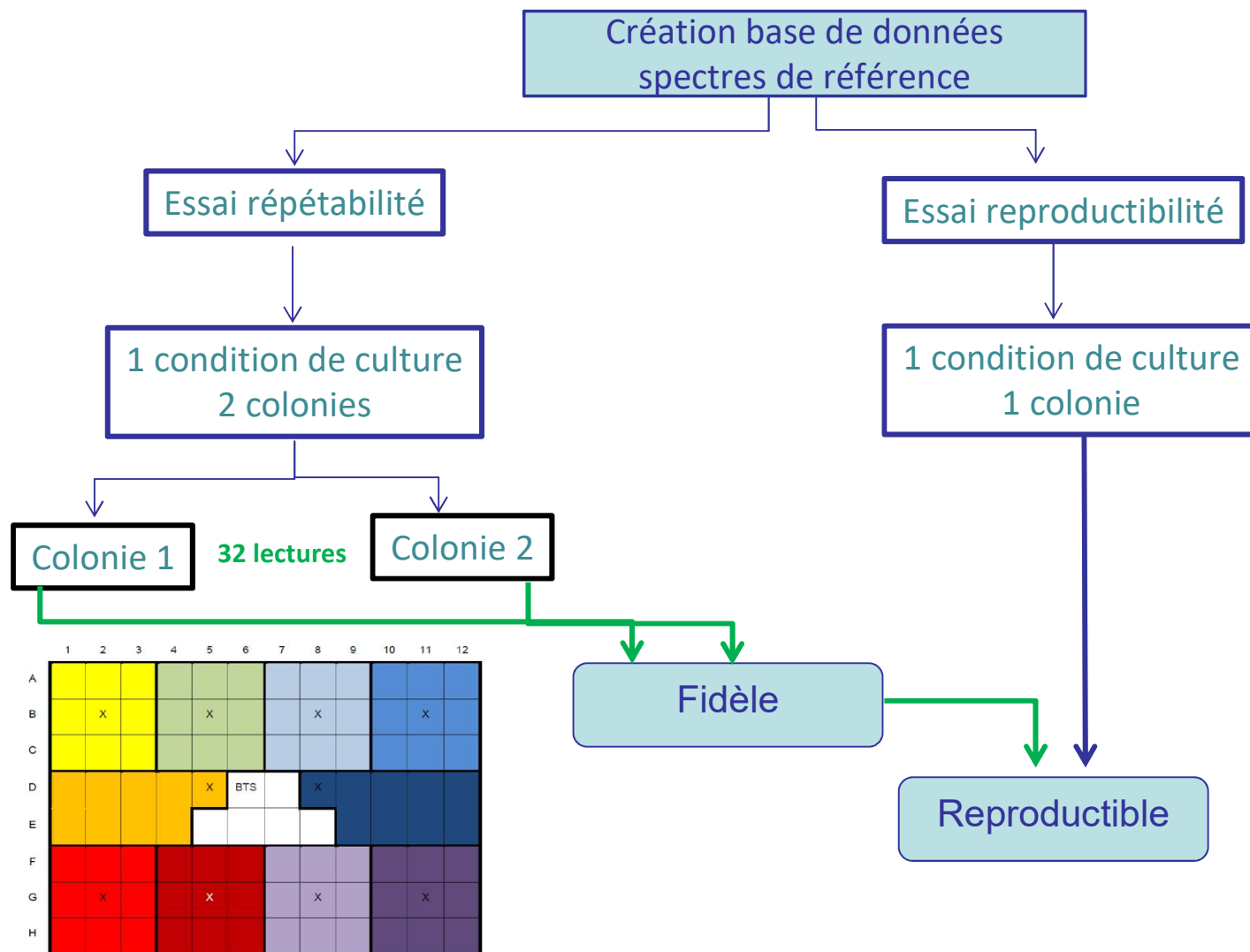


Master 2 Microbiologie– Issa SY– Année 2018/2019

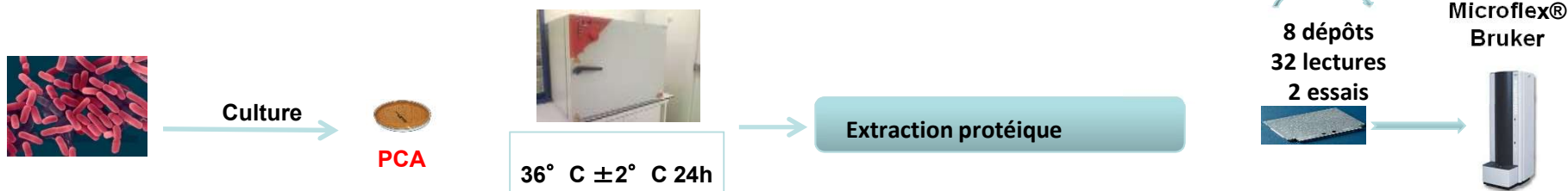
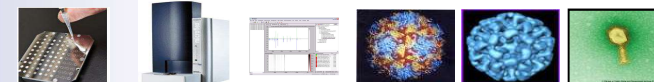




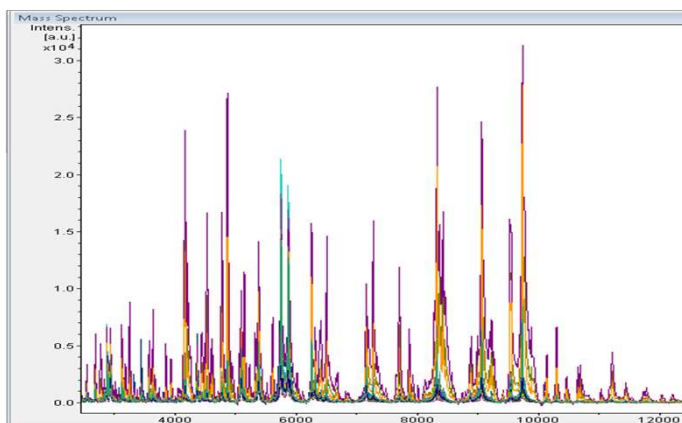
## Homogénéité des spectres obtenus en répétabilité et en reproductibilité



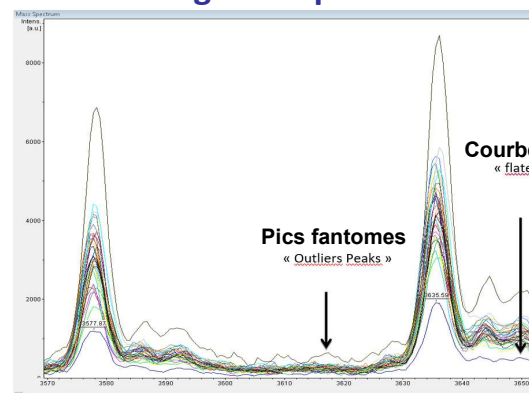
# MALDI-TOF : spectres de référence



## Détermination du nombre de spectres bruts à réaliser pour créer un spectre de référence

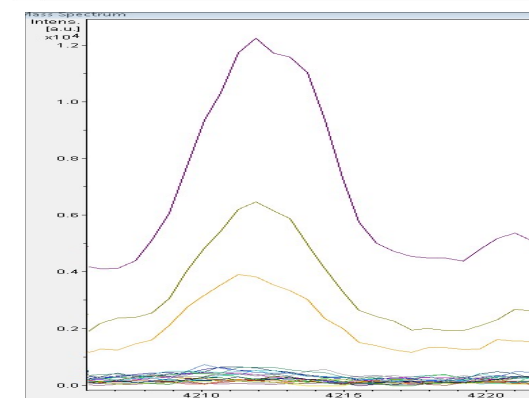


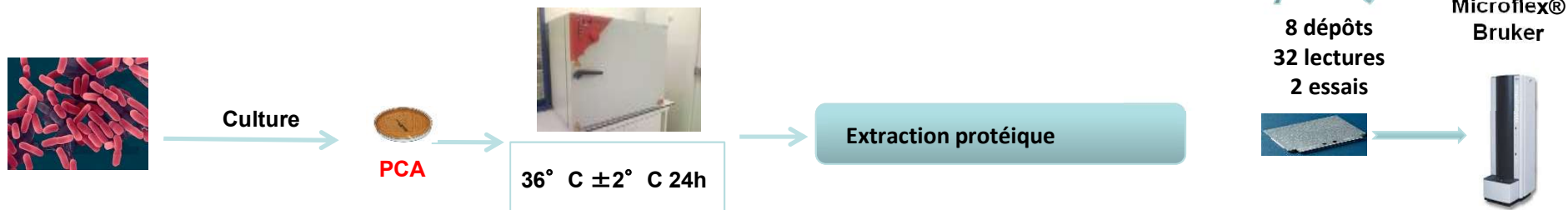
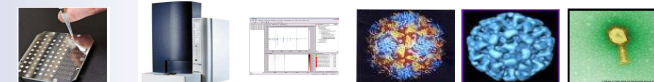
### ➤ Toilettage des spectres bruts



- Validation de la calibration (8 pics identifiés) = ok
- Nombre de spectres éliminés comprenant des « Flateline »
- Nombre de spectres éliminés comprenant des « Outliers Peaks »
- Nombre de spectres éliminés pour trop grande variation entre les pics (<500 ppm)

➤ Conservation des spectres bruts > 80% (26/32)





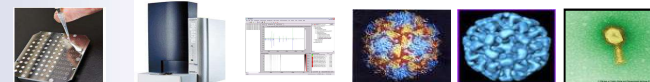
## ➤ Résultats obtenus sur *E. coli* pathogènes et non pathogènes, *Shigella*

	% MSP preserved	
	PCA E1	PCA E2
15F000107	100%	92,50%
15F000483	89%	100%
15F002264	91%	97%
15F003089	78%	100%
15F003434	86%	81%
15F000167	89%	94%
15F000766	100%	81,50%
15F001812	87,50%	100%
15F003205	92,50%	97%
15F003764	84,50%	90,50%
15F000347	91%	95,50%
15F001352	97%	87,50%
15F003164	97%	88%
15F001356	98,50%	91%
15F002065	91%	100%
15F000047	98,50%	97%
15F001673	97%	100%
15F002246	92,50%	91%
15F003678	94%	100%
15F000399	92,50%	100%
E. coli NCTC	92,50%	87,50%
E. coli WDCM00090	91%	91%

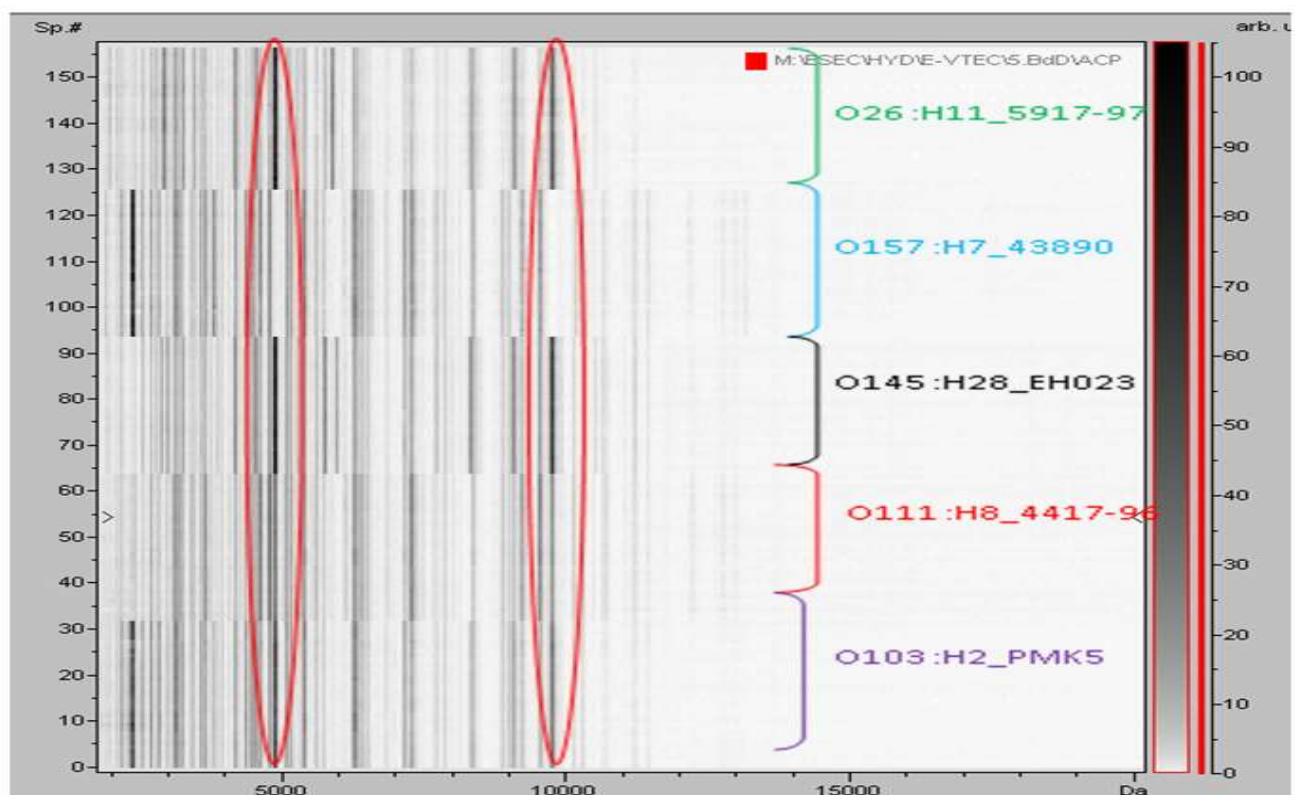
	% MSP preserved	
	PCA E1	PCA E2
O157:H7_43895	83%	82,50%
O157:H7_43890	100%	91%
O157:H7_SA7	78%	79,50%
O157:H7_12900	100%	100%
O26:H11_09QMA277,2	78%	84,50%
O26:H11_FRED2	81,50%	98,50%
O26:H11_5917/97	95,50%	79,50%
O103:H2_PMK5	76,50%	84,50%
O103:H2_CH087	78%	80%
O111:H8_95NR1	81,50%	84,50%
O111:H8_4417/96	87,50%	72%
O111:H8_CB6199	87,50%	78%
O145:H28_ED28	76,50%	97%
O145:H28_EH023	83%	100%

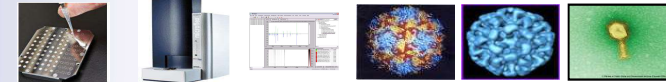
	% MSP preserved	
	PCA E1	PCA E2
S. boydii 2 CIP 82.50T	98,50%	97%
S. boydii 13 CIP 58.21	92,50%	89%
S. flexneri 2 CIP 104.222	92,50%	100,00%
S. flexneri CIP 82.48T	98,50%	97,00%
S. sonnei CIP 52.55	94%	98,50%
S. sonnei CIP 82.49T	95,50%	94%

- L'extraction protéique des *E. coli* pathogène semble moins efficace ?
- Quelle est la limite acceptable ?
- Quel est l'impact sur la répétabilité ? Et la reproductibilité ?

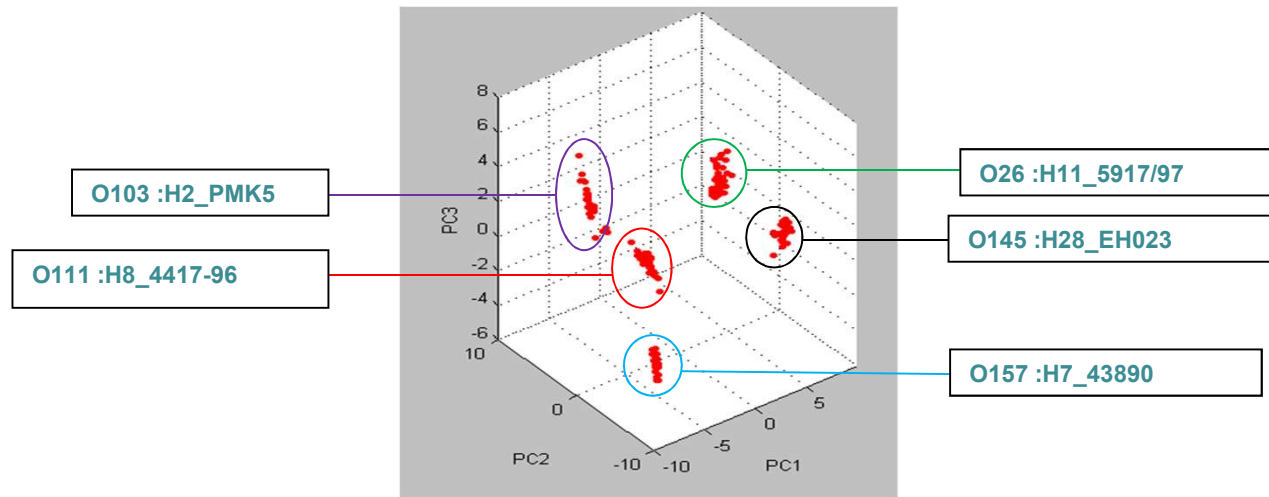


- Analyse des Gel View : visualisation des différences dans les profils des spectres

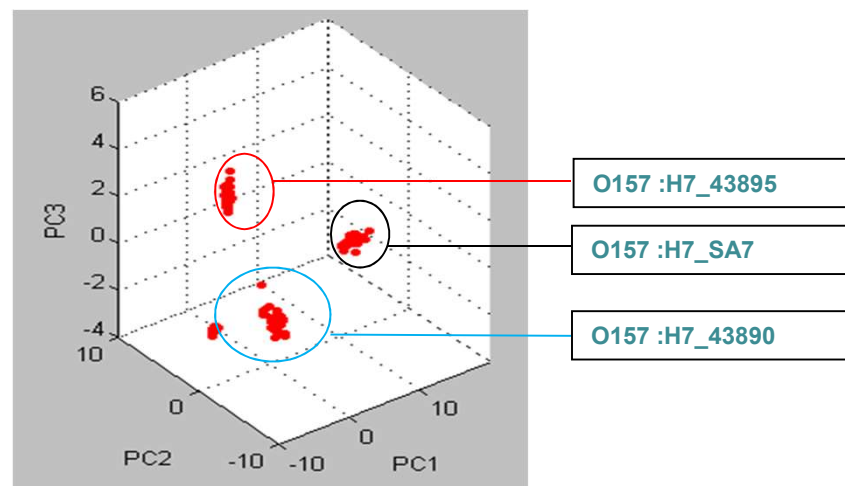




## ➤ Analyse multi composantes 3D :

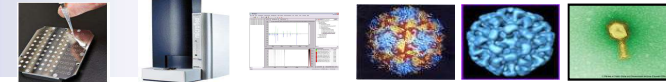


❖ Visualisation de la répartition des 5 sérotypes STEC en fonction de 3 composantes principales (pics, intensités et fréquences d'apparitions)

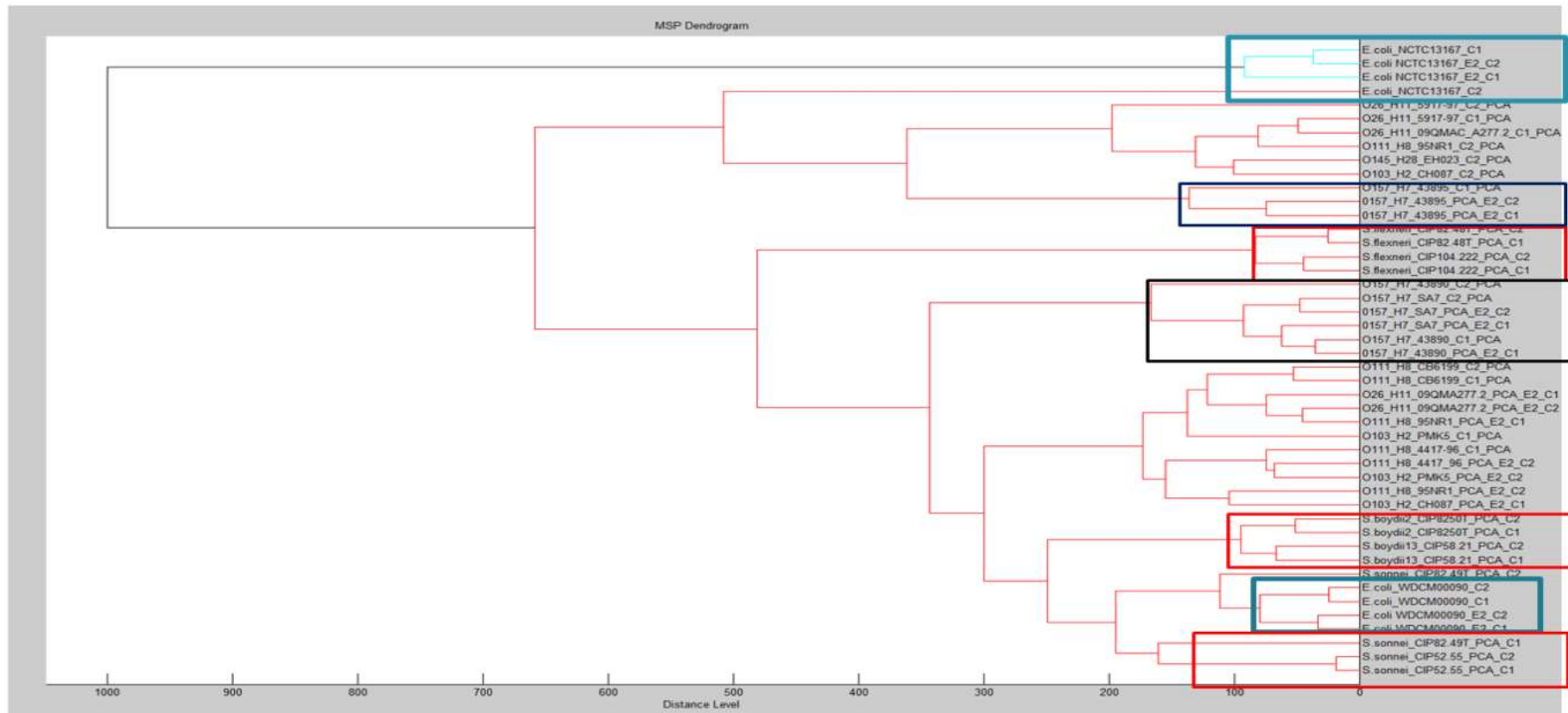


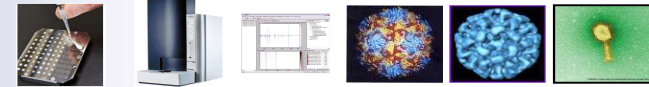
❖ Visualisation de la répartition intra-sérotype O157





## ➤ Analyse dendrogramme : visualisation de regroupements sous forme de clades





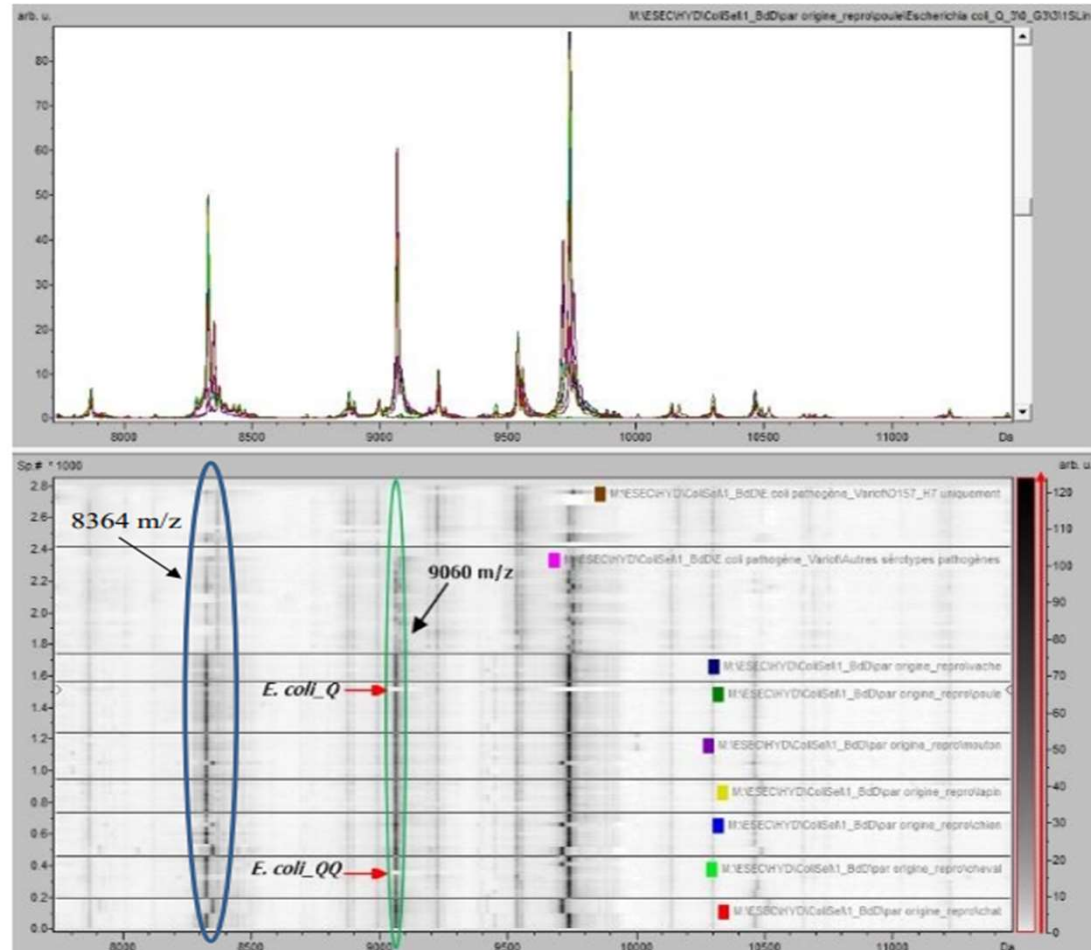
## ➤ Caractérisation de biomarqueurs caractéristiques (GelView)

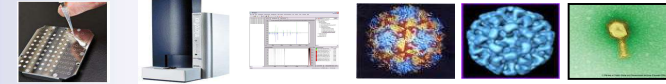
- Biomarqueur de souches *E. coli* non pathogènes

➤ Pic à 8364 m/z = biomarqueur d'orientation

Présent à 75 % ➔ chez les non pathogènes

25 % ➔ non concluant





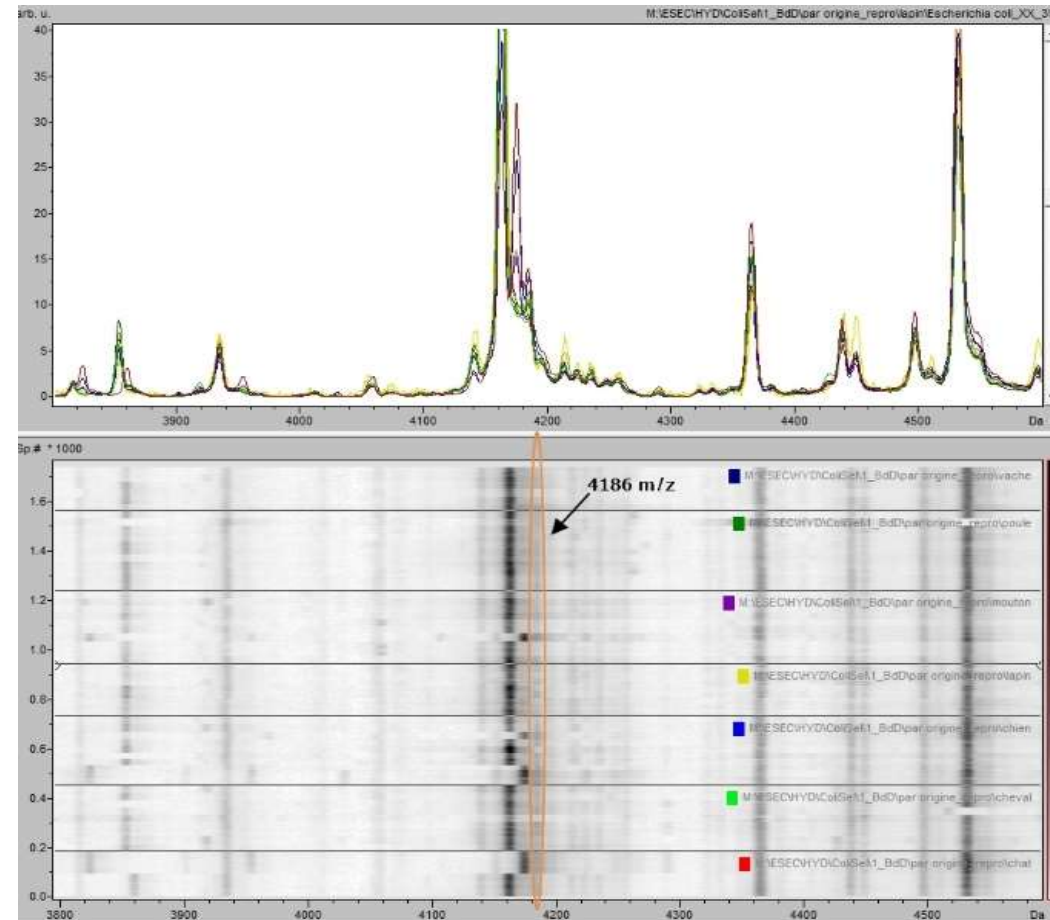
## ➤ Caractérisation de biomarqueurs caractéristiques (GelView)

- Biomarqueur de souches *E. coli* non pathogènes

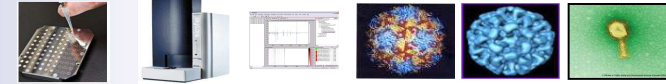
➤ **Pic à 4186 m/z** = biomarqueur caractéristique

Si Absent ➔ souche non pathogène

Si Présent ➔ souche pathogène



Master 2 Microbiologie– Issa SY– Année 2018/2019



## ➤ Caractérisation de biomarqueurs caractéristiques (GelView)

- Biomarqueur de souches *E. coli* pathogènes

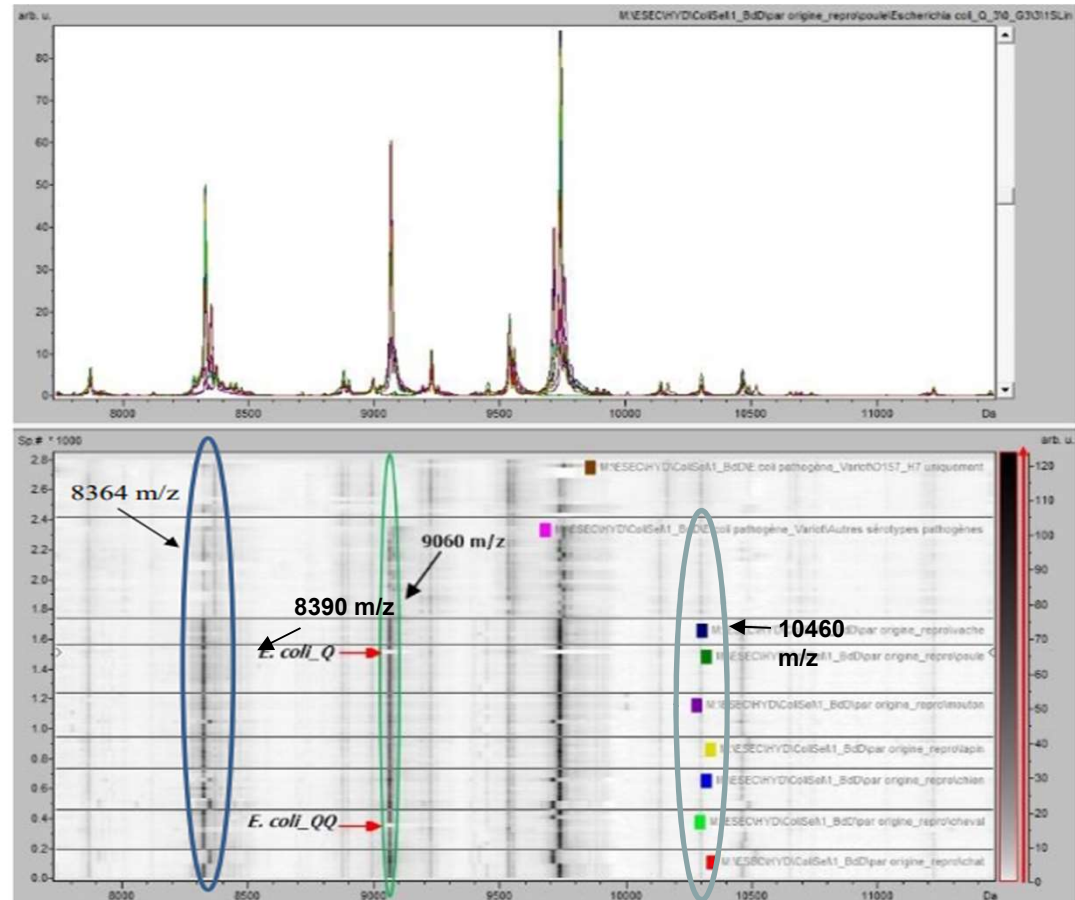
**Pic à 9060 m/z = biomarqueur caractéristique pathogène O157**

- Si Absent ➔ souche VTEC O157
- Si Présent ➔ souche VTEC non-O157 et *E. coli* non pathogène

**Nouveaux biomarqueurs recensés:**  
**10460 m/z ; 8390 m/z**

- *E. coli*\_Q3 et *E. coli*\_QQ3 :  
**VTEC O157 ?**

**PCR pas de marqueurs spécifiques de O157**



Master 2 Microbiologie– Issa SY– Année 2018/2019



### Avantages Maldi-tof

- Lecture rapide : 96 analyses sur 1 run en 10 min
- Simplicité des protocoles de préparation
- Robustesse importante des spectres générés (dans une condition donnée)
- Exploration des voies métaboliques et expression des protéine par la présence de biomarqueurs
- Coût relativement faible pour des analyses en routine

### Inconvénients Maldi-tof

- Ne permet pas l'identification de virus ou parasites
- Les bases de données de spectres à disposition : identification au genre et à l'espèce uniquement

### Perspectives

- Caractérisation d'autres biomarqueurs caractéristiques des E.coli pathogènes et non pathogènes ainsi que des Shigella
- « Whole Genom Sequencing »
- Classement dans les différents groupes phylogénétiques via les PCR de groupe



Merci pour  
votre attention