

ETUDE PRELIMINAIRE DE LA DIVERSITE MOLECULAIRE D'ENTEROCOCCUS CECORUM DANS LES ELEVAGES BRETONS

Potier Paul-Henri ¹, Rigomier Pascale ¹, Moalic Pierre-Yves ², Bourgeon Frédéric ²

¹CHENE VERT - rue Auguste Perret – 29400 LANDIVISIAU,

²BIOCHENEVERT - rue Blaise Pascal - 35220 CHATEAUBOURG

ph.potier@chenevert.vet

RESUME : Les infections à *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum*) représentent une pathologie majeure à l'échelle mondiale chez le poulet de chair à croissance rapide (PCCR). Une étude a été menée sur 25 souches isolées à partir de 18 élevages en Bretagne entre avril et juin 2023 : 19 sont isolées de lésions caractéristiques d'*E. cecorum* sur des PCCR et 6 en contexte d'infection colibacillaire sans signe(s) clinique(s) spécifique(s) d'*E. cecorum*. Parmi ces 6 souches, 3 sont de reproducteurs à croissance rapide (RCR), 1 de poule pondeuse (PP), 1 de PCCR à J4 (PO) et 1 de reproducteurs à croissance lente (RCL). **Matériels et méthodes :** L'objectif est de comparer les profils moléculaires des 25 souches par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La recherche de corrélation avec le profil de résistance aux antibiotiques et des critères zootechniques incluant le caractère récidivant est également effectuée. **Résultats :** L'analyse des spectres moléculaires, sur la base de 21 biomarqueurs spécifiques d'*E. cecorum*, met en évidence un groupe de 21 souches (coefficient de similarité >85%). Il correspond aux 19 souches cliniques isolées de PCCR et aux souches isolées de PP et RCL sans signe clinique spécifique. Les 4 souches indépendantes (<85 % de similarité avec le groupe principal) sont issues de PO et RCR sans signe(s) clinique(s) spécifique(s) d'*E. cecorum*. Cinq souches sont isolées d'élevage de PCCR présentant une récurrence d'infection à *E. cecorum* après traitement antibiotique (amoxicilline). 4/5 présentent un profil moléculaire identique aux souches isolées lors de la primo-infection ; les profils d'antibiorésistance restent inchangés. **Conclusion :** Cette étude préliminaire met en évidence la diversité moléculaire d'*E. cecorum*. Les isolats PO et RCR semblent diverger du groupe des souches de PCCR. Deux hypothèses sont émises pour expliquer cette divergence : le stade physiologique ou les conditions d'isolement de la souche (co-infection). Par ailleurs, l'hypothèse de l'existence de souches persistantes après antibiothérapie est également étudiée.

Preliminary study of the molecular diversity of *Enterococcus cecorum* in Brittany farms

ABSTRACT: *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum*) infections represent a major pathology worldwide in fast-growing broiler chickens (PCCR). A study was carried out on 25 strains isolated from 18 farms in Brittany between April and June 2023: 19 were isolated from typical lesions of *E. cecorum* in PCCRs and 6 in context of colibacillary infection with no specific clinical sign(s) of *E. cecorum*. Of these 6 strains, 3 were from rapid growth broiler breeders (RCR), 1 from laying hen (PP), 1 from PCCR at 4 days post hatch (PO) and 1 from slow growth broiler breeders (RCL). **Materials and methods:** The aim was to compare molecular profiles of the 25 strains by MALDI-TOF mass spectrometry. Correlations were also sought with the antibiotic resistance profile and zootechnical criteria, including recidivism. **Results:** Analysis of molecular spectra, based on 21 specific biomarkers of *E. cecorum*, revealed a group of 21 strains (similarity coefficient >85%). This corresponds to the 19 clinical strains isolated from PCCR and strains isolated from PP and RCL without any specific clinical sign(s). The 4 independent strains (<85% similarity with the main group) are from PO and RCR without specific clinical sign(s) of *E. cecorum*. Five strains were isolated from PCCR farms with recurrent *E. cecorum* infections after antibiotic treatment (amoxicillin). The molecular profiles of 4/5 of these strains were identical to that of the strains isolated during the primary infection; the antibiotic resistance profiles remained unchanged. **Conclusion:** This preliminary study highlights the molecular diversity of *E. cecorum*. The PO and RCR isolates appear to diverge from the group of PCCR strains. Two hypotheses have been put forward to explain this divergence: the physiological stage or the conditions under which the strains were isolated (co-infection). The existence of strains that persist after antibiotic treatment is also being investigated.

INTRODUCTION

E. cecorum a été isolé pour la première fois de la flore caecale de poulets et décrit comme *Streptococcus cecorum* en 1983. En 1989, *Streptococcus cecorum* a été reclassé dans le genre *Enterococcus* sur la base du séquençage de l'ARN 16S (Williams *et al.* 1989). Cette bactérie est un organisme commensal dominant chez les volailles adultes. *E. cecorum* est détectable dans l'intestin des poulets à partir de la troisième semaine de vie et devient un composant dominant du microbiote intestinal des poulets sains à l'âge de 12 semaines (Borst *et al.*, 2017).

Durant les 20 dernières années, *E. cecorum* s'est révélé être l'une des principales causes de troubles locomoteurs chez le poulet de chair à croissance rapide (Jung *et al.*, 2018). Il est impliqué dans diverses maladies locomotrices telles que l'ostéomyélite vertébrale, la spondylarthrite et la nécrose de la tête fémorale (Souillard *et al.*, 2022). Au-delà, de ces impacts multiples sur la productivité, cet agent pathogène dégrade fortement le bien-être animal (Grund *et al.* 2022).

La source de contamination reste floue, mais une fois le troupeau infecté, la transmission horizontale est rapide. La voie d'infection oro-fécale semble la plus probable (Borst *et al.*, 2017).

La pathogénèse des souches responsables des maladies locomotrices a été décrite dans la thèse de J. Schreier en 2022. La contamination orale et la colonisation de l'intestin ont lieu dès la première semaine après l'éclosion. La translocation dans la circulation sanguine intervient entre la première et la deuxième semaine. La phase septicémique se met en place entre la deuxième et la troisième semaine, mais la plupart des oiseaux sont asymptomatiques. Enfin, la phase squelettique et l'apparition de signes cliniques clairs associés à ce pathogène survient généralement au cours de la quatrième semaine de vie.

Le profil de résistance aux antimicrobiens de cette bactérie reste encore difficile à établir. En effet, une étude réalisée par Jung *et al.* en 2018 a mis en évidence, à partir de souches cliniques isolées dans différents pays, des niveaux de résistance aux antibiotiques différents.

Récemment, différentes études ont porté sur l'étude de la diversité moléculaire des souches cliniques et non cliniques d'*E. cecorum* via des outils tels que le « Whole-genome sequencing (WGS) » (Laurentie *et al.*, 2022), le spectromètre de masse MALDI-TOF (Dunnam *et al.* 2023) ou encore via un ensemble de « Polymerase chain reaction (PCR) » (Huang *et al.* 2023).

Enfin, les études autour des cas de récurrence après un traitement à base d'amoxicilline semblent peu nombreuses voire inexistantes dans la littérature. Il semble cependant intéressant d'investiguer ces cas et d'étudier les isolats impliqués dans les récurrences.

Cette étude préliminaire aura donc pour premier objectif de comparer les profils moléculaires de souches cliniques et de souches isolées dans un contexte d'infection colibacillaire sans signe(s) clinique(s) spécifique(s) d'*E. cecorum* par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ensuite, les profils de résistance aux antibiotiques des souches seront déterminés et les résultats obtenus seront comparés aux données de la littérature. Enfin, les cas de récurrence après traitement antibiotique seront analysés plus en détails. Par ailleurs, la recherche de corrélations entre les profils moléculaires, les profils de résistance aux antibiotiques et les critères zootechniques sera également effectuée.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte et description des souches

A partir de 18 élevages en Bretagne, 25 souches de *E. cecorum* ont été isolées entre avril et juin 2023. Parmi ces souches, 19 ont été isolées de lésions caractéristiques d'*E. cecorum* sur des PCCR et 6 en contexte d'infection colibacillaire sans signe(s) clinique(s) spécifique(s) d'*E. cecorum*. Au sein de ces 6 souches, 3 sont de reproducteurs à croissance rapide (RCR), 1 de poule pondeuse (PP), 1 de PCCR à J4 (PO) et 1 de reproducteurs à croissance lente (RCL).

1.2. Isolement et identification d'*E. cecorum*

Les isollements sont réalisés sur des géloses Columbia avec ou sans mélange inhibiteur (acide nalidixique et colistine, Bio-Rad), incubées 18 à 48 heures à 37±2°C en atmosphère enrichie en CO₂. Les colonies caractéristiques sont identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF selon les recommandations du fournisseur (MALDI Biotyper, Bruker).

1.3. Collecte des facteurs zootechniques

Chaque souche est caractérisée grâce à des données recueillies auprès des éleveurs, lors des examens lésionnels ou lors de la lecture des géloses.

1.4. Résistance aux antimicrobiens

Les antibiogrammes sont réalisés selon une méthode de diffusion en milieu gélosé (NF U47-107) sur gélose MH (Bio-Rad) incubée 18 à 24 heures à 37±2°C en atmosphère enrichie en CO₂. Le profil de sensibilité des souches *E. cecorum* a été évalué sur un panel de 16 antibiotiques utilisés à visée thérapeutique ou à titre de caractérisation phénotypique et/ou épidémiologique.

(gentamicine, amoxicilline, ceftiofur, cefoxitine, oxacilline, ampicilline, tiamuline, lincomycine, tylosine, tilmicosine, erythromycine, spiramycine, florfenicol, enrofloxacin, triméthoprim/sulfamide et tetracycline). La catégorisation est déterminée selon les recommandations du CA-SFM ou à défaut du fabricant de la molécule et dépend des diamètres critiques et des règles de lecture interprétative (recommandations humaines 2013, sections générales et *Enterococcus*, recommandations vétérinaires 2023, sections *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pasteurellaceae* et Enterobactériales).

1.5. Analyse par spectrométrie de masse

La comparaison moléculaire des souches *E. cecorum* par spectrométrie de masse nécessite une préparation d'échantillon spécifique par extraction éthanol/acide formique.

Brièvement, une colonie d'une culture fraîche (18-24h) est transférée et mélangée dans un tube avec 300 µL d'eau déminéralisée. 900 µL d'éthanol 100% sont ajoutés et à nouveau mélangés. Le tube est centrifugé à 12000 g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. L'éthanol résiduel est éliminé après une centrifugation complémentaire et le culot est séché à l'air libre. Le culot bactérien est repris par une solution d'acide formique 70% (v/v). Un volume égal d'acétonitrile est ajouté et mélangé délicatement. La préparation est finalement centrifugée à 12000 g pendant 2 min et 4 dépôts d'1 µL de surnageant sont réalisés sur une cible en acier poli. Le dépôt est séché à l'air libre puis recouvert par 1 µL d'une solution d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique à 10 mg/mL (50 % acétonitrile, 47,5 % eau, 2,5 % acide trifluoroacétique).

Les dépôts sont analysés sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex LT (MALDI Biotyper, Bruker) à l'aide des solutions Compass flexControl et MBT Compass (Bruker). Pour chaque isolat, 12 spectres de masse sont enregistrés (gamme de masse 2000 -20000 m/z ; mode positif linéaire ; 240 tirs laser ; 3 mesures par dépôt).

Finalement le MALDI-typage est basé sur l'analyse discriminante des empreintes moléculaires réalisée à l'aide des logiciels flexAnalysis et ClinProTools (Bruker). La détection de biomarqueurs protéiques et leur analyse différentielle permet de caractériser des MALDI-types (MT) qui différencient les souches.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

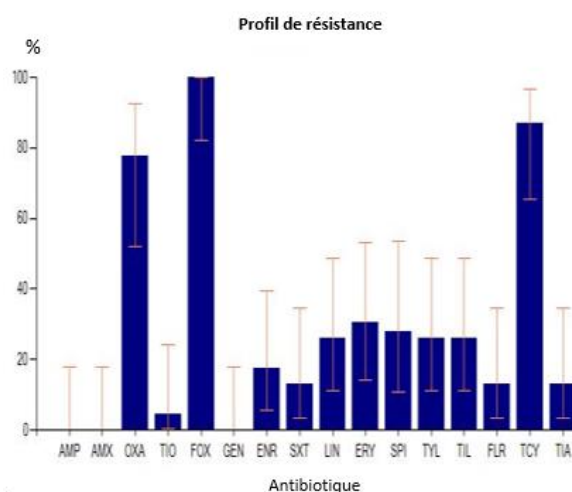
2.1. Résistance aux antimicrobiens

23 antibiogrammes sur 25 permettent d'étudier l'antibiorésistance des souches d'*E. cecorum* vis-à-vis des 16 antibiotiques testés. Deux ne présentaient pas de

culture bactérienne significative malgré plusieurs essais. Les résultats sont présentés dans la figure 1.

Aucun isolat n'est « pan-susceptible » ni « pan-résistant ». Les résistances les plus importantes atteignent 100% pour la Cefoxitine (Céphamycines), 87% pour la Tétracycline (Cyclines), 77,8% pour l'Oxacilline (Pénicillines du groupe M) et 30,4% pour l'Erythromycine (Macrolides). Une sensibilité de 100% a été observée sur 3 molécules : Ampicilline et Amoxicilline (Pénicillines du groupe A) ; Gentamicine (Aminosides).

Figure 1 : Profil de résistance aux antibiotiques des 23 souches d'*Enterococcus cecorum*



La résistance de chaque isolat a été traduite par un profil associant la résistance à chacun des antibiotiques testés. Une diversité importante a été trouvée puisque 13 profils différents ont pu être identifiés pour 23 souches analysées. Les 3 principaux sont : Cefoxitine^R / Tétracycline^R (86,6%) ; Cefoxitine^R / Oxacilline^R (60,4%) ; Cefoxitine^R / Oxacilline^R / Tétracycline^R (56,4%).

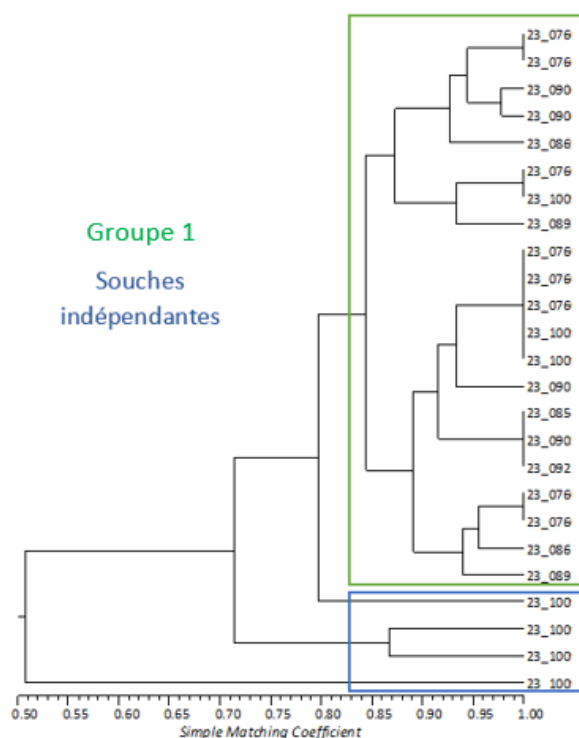
Les souches présentent au minimum 1 et au maximum 8 résistances aux antibiotiques. Sur les 23 souches, 21, soit 90,9%, sont résistantes à au moins 3 antibiotiques.

2.2. Analyse MALDI-TOF MS

L'analyse de tous les isolats à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF a confirmé leur appartenance à l'espèce *E. cecorum*.

L'analyse des spectres moléculaires, sur la base de 21 biomarqueurs spécifiques d'*E. cecorum*, met en évidence un groupe de 21 souches (groupe 1) qui ont un coefficient de similarité supérieur à 85% et 4 souches indépendantes (Figure 2).

Figure 2 : Dendrogramme réalisé sur la base de l'analyse de 21 biomarqueurs spécifiques à *Enterococcus cecorum* identifiés au spectromètre de masse MALDI-TOF



Le groupe 1 correspond aux souches cliniques isolées de PCCR et à 2 souches isolées de PP et RCL dans un contexte d'infection colibacillaire sans signe(s) clinique(s) spécifique(s) d'*E. cecorum*. Plusieurs de ces souches sont similaires à 100%, certaines ont des liens identifiables pouvant expliquer ce résultat car elles sont isolées du même bâtiment alors que d'autres ne présentent pas de liens identifiables.

Les 4 souches indépendantes correspondent à 3 souches de RCR et 1 souche de PO isolées dans un contexte d'infection colibacillaire sans signe(s) clinique(s) spécifique(s) d'*E. cecorum*. Ces souches partagent moins de 85% de similarité avec le groupe 1 et possèdent une dissimilarité variable et importante entre elles.

2.3. Analyse des biomarqueurs spécifiques

Une sélection de 21 biomarqueurs correspondant à 45 pics moléculaires parmi les quelques 180 pics moléculaires du spectre moyen de chaque souche a été retenue après l'analyse discriminante des empreintes moléculaires MALDI-TOF des 25 isolats. Les critères de sélection sont basés sur l'absence ou la présence d'un pic moléculaire dans au moins une souche et le décalage de pics moléculaires (peak shift) sur l'ensemble des souches.

Les isoformes BM9-1 et 9-2 permettent la discrimination entre les souches du groupe 1 et les 4 isolats indépendants. Les isoformes BM14-1 et 14-2 permettent quant à eux la discrimination entre les souches du groupe 1 et 3 des 4 souches indépendantes.

2.4. Relation entre les souches à partir des données d'antibiogramme, moléculaires et zootechniques

Il n'a pas été possible d'établir de corrélation entre les profils de résistance aux antibiotiques, les profils moléculaires des souches et les facteurs zootechniques dont notamment l'âge de l'animal, l'organe lésé ou encore le couvoir d'origine.

2.5. Analyse des souches récidivantes

Les souches isolées lors de 5 cas de récides d'infection après traitement à base d'amoxicilline (même lot dans le même bâtiment) ont été analysées.

Dans 4 cas sur 5, les profils moléculaires et les profils d'antibiorésistance des isolats des primo infections et des cas de récides sont identiques (100% de similarité). Aucune différence de sensibilité ou résistance acquise par ces isolats entre les deux épisodes cliniques n'est mise en évidence dans cette étude.

Dans le dernier cas, la souche récidivante appartient au même groupe de spectres que la souche primo-infectante mais elles ne partagent plus que 94 % de similarité. De plus, les diamètres d'inhibition sont différents pour deux molécules antibiotiques : Lincomycine et Erythromycine.

2.6. Discussion

Cette étude préliminaire de 25 souches permet dans un premier temps de faire un état des lieux des résistances antimicrobiennes présentes sur la zone de production bretonne. En France, les souches d'*E. cecorum* sont sensibles à l'amoxicilline (98-100% de sensibilité, RESAPATH online, 2020-2022) et notre étude confirme ce phénomène puisque la sensibilité à cette molécule est de 100%. Elle était de 70% dans l'étude de Borst *et al.* (2012). La surveillance de la sensibilité à cet antibiotique est donc primordiale car c'est le principal traitement utilisé dans les élevages lors d'une infection à *E. cecorum*. D'autres différences ont également été mises en évidence notamment sur des molécules tels que l'Erythromycine (30,4% de souches résistantes dans notre étude, 89 % au Canada ; 89,6 %, 78,1 % ou 26,7 % en fonction des études aux USA et 46,3 % en Pologne) et la Tétracycline (87 % de souches résistantes dans notre étude contre 98,6 % au Canada, 86,2 %, 64,7 % ou 68,8 % en fonction des études aux USA et 6 % en Pologne)(Jung *et al.*, 2018).

Ces différences géographiques pourraient être expliquées par la possibilité d'une acquisition de résistance facilitant l'adaptation du germe à l'environnement dans lequel il évolue. La grande diversité des profils de résistance dans notre étude (13 profils pour 23 souches) et dans l'étude de Dunnam *et al.* en 2023 (73 profils pour 100 souches) corrobore cette hypothèse d'adaptation en fonction de l'environnement.

Différentes études ont mis en évidence des différences génétiques entre les souches cliniques et non cliniques ; ces différences ne sont cependant jamais discriminantes pour l'ensemble de la population testée. En effet, dans l'étude de Laurentie *et al.* en 2022, 6 gènes identifiés discriminaient 94% des souches cliniques par rapport aux non cliniques. L'étude de Huang *et al.* en 2023 montre que les souches cliniques sont déléetées d'un ensemble de gènes par rapport aux souches non cliniques. Les deux biomarqueurs (BM9-1/9-2 et 14-1/14-2) retrouvés spécifiquement dans le groupe 1 de souches cliniques isolées de PCCR devront être investigués en ce sens, notamment sur des collections de souches isolées de contenu intestinal de poulet sains. La mise en évidence de biomarqueurs spécifiques de souches à haut potentiel clinique est un enjeu majeur pour une meilleure compréhension de cette maladie, et dans l'identification des sources de contamination.

Enfin, le caractère récidivant des souches d'*E. cecorum* n'a pas ou peu été étudié dans la littérature. Le résultat

obtenu lors de cette étude laisse place à deux hypothèses. La première, également émise par Borst *et al.* (2017), est que la persistance de cette bactérie dans l'environnement lui permet de survivre assez longtemps pour recontaminer les animaux après un premier traitement antibiotique. La seconde est que l'antibiothérapie n'est pas totalement efficace sur l'infection, certains organes ou certaines formes du pathogène ne seraient pas accessibles par l'amoxicilline et formeraient un réservoir bactérien.

CONCLUSION

Cette étude préliminaire porte sur une collection récente mais relativement réduite de souches d'*E. cecorum* isolées de volailles en Bretagne. Les profils de résistances aux antimicrobiens montrent une grande diversité et leur caractérisation contribue à la surveillance des phénomènes de résistance qui pourraient apparaître suite à l'utilisation de l'amoxicilline pour traiter les infections dans les élevages. Par ailleurs, des pistes autour de la possible existence de biomarqueurs spécifiques de souches cliniques isolées de lésions sur le PCCR devront être explorées.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le LCV et toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à cette étude préliminaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Borst L.B, Suyemoto M.M, 2012. Avian Pathology, 41(5), 479–485.
- Borst L.B, Suyemoto M.M, 2017. Veterinary Pathology, 1–13.
- Dunnam G., Thornton J., 2023. Avian Diseases, 67(2), 1-8.
- Grund A., Rautenschlein S., 2021. Journal of Applied Microbiology, 130(5), 1494–1507.
- Grund A., Rautenschlein S., 2022. Europ.Poult.Sci., 86, 59-73.
- Huang Y., Eeckhaut V., 2023. Veterinary Research, 54(1), 13.
- Jung A., Metzner M., 2017. BMC Microbiology, 17(1), 33.
- Jung A., Chen L., 2018. Avian Diseases, 62(3), 261–271.
- Laurentie J., Loux V., 2022. mSphère, 8, 2.
- Schreier J., Rychlik I., 2022. Veterinary Research, 53(1), 110.
- Souillard R., Laurentie J., 2022. Veterinary Microbiology, 269, 109426.
- Williams A.M., Farrow J.A.E., 1989. Letters in Applied Microbiology, 8(5), 185–189.