

Caractérisation de la diversité génétique d'*Ehrlichia ruminantium* à l'échelle mondiale par l'approche MLVA et MLST

NATHALIE VACHIER¹, KARINE HUBER², NADIA HADDAD³, DAMIEN F MEYER³, LUDOVIC PRUNEAU³, ANGELIQUE SALDANA¹, HELOISE PILET³, MOEZ BERRICH³, RIM BOUCHOUICHA³, VALERIE PINARELLO³, CATHERINE CARASCO-LACOMBE³, MELANIE MAGAN³, HASSANE ADAKAL⁴, HENRI-JEAN BOULOUIS⁵, DOMINIQUE MARTINEZ² et THIERRY LEFRANCOIS¹

¹CIRAD, UMR15 CIRAD, site de Duclos Prise d'Eau, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe; ²CIRAD, UMR15 CIRAD, Montpellier, France, ³UPE, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, ENVA, ANSES, UPEC, USC INRA, 94703 Maisons-Alfort, France, ⁴CIRDES Laboratoire de Biotechnologie (URBIO), 559, 3-51 Avenue du Gouverneur Louveau, B.P. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

INTRODUCTION

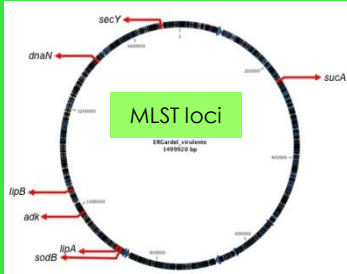
- ✓ *Ehrlichia ruminantium*, ER: agent de la cowdriose, maladie tropicale des ruminants
- ✓ Présente en Afrique Sub-saharienne, dans l'Océan indien & dans la Caraïbe
- ✓ Caractérisation génétique mono-locus: ciblant les gènes *pCS20* & *map-1*
- ✓ Manque d'efficacité des vaccins liés à la grande diversité génétique

OBJECTIFS: pour le modèle ER

- ✓ Développer des outils d'épidémiologie moléculaire ciblant les zones ayant des séquences en tandem répétées en nombre variable, VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats)
- ✓ Caractériser la diversité génétique par MLVA (Multi-Locus VNTR Analysis) & MLST (Multi-Locus Sequence Typing)

METHODES

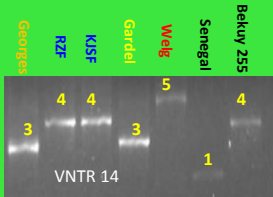
- ✓ Pour typage MLST: 5 gènes *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* & *sucA*



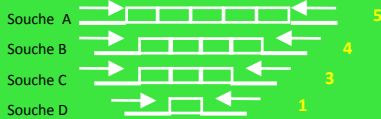
Souches d'ER de référence & échantillons de terrain

PCR nichée ciblant les 5 gènes

Séquençage des produits de PCR & Analyse des séquences



- ✓ Pour typage VNTRs:



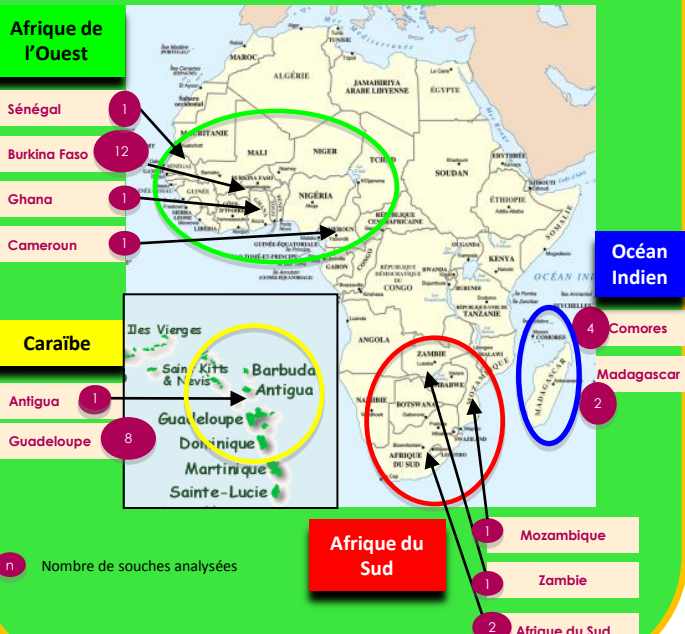
Tailles différentes des produits de PCR

- Dessin des amorces & optimisation des PCR simples & nichées en utilisant les souches ER de référence Gardel et Welgevonden
- Obtention d'un profil allélique avec 7 loci ciblant les VNTRs: MLVA
- Détermination d'un index de discrimination (I.D.) sur 21 souches:

$$I.D. = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

N = nbre total de souches
 n_j = nombre de souches avec même profil allélique

- ✓ Souches d'origines différentes analysées par MLST & MLVA



DEVELOPPEMENT DES PCR NICHEES CIBLANT LES VNTRs

- ✓ Basés sur les données du génome des souches de Gardel et Welgevonden
- ✓ 21 VNTRs choisis en utilisant la base de données des séquences répétées (<http://minisatellites.u-psud.fr>)

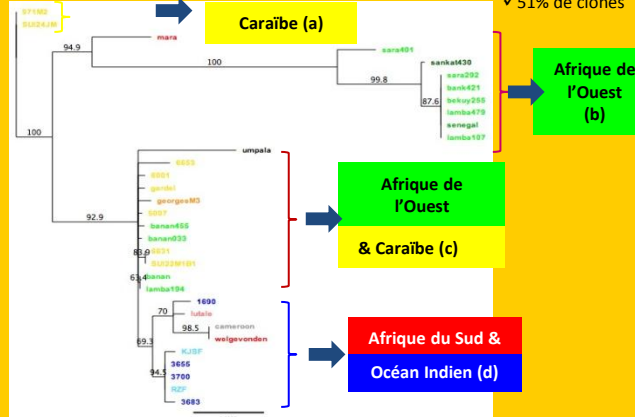
- ✓ 7 PCR nichées développées avec succès sur 21 souches: Utilisation directe sur échantillons de terrain: Tiques & organes

- ✓ $ID_{global} = 0.97$ pour les 7 VNTRs 3 à 7 allèles par VNTR

$0.59 < ID_{individual} < 0.78$ $ID > 0.76$ pour 3 VNTRs

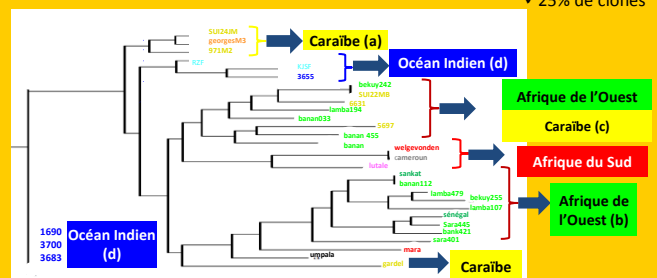
Caractérisation génétique d'ER par MLST & VNTRs

Arbre MLST NJ



- ✓ 51% de clones
- ✓ 2 groupes distincts avec souches de la Caraïbe (Guadeloupe) (a) & d'Afrique de l'Ouest (b)
- ✓ 1 groupe défini par des souches d'Afrique de l'Ouest (BF) et de la Caraïbe (Guadeloupe /Antigua)(c)
- ✓ Souches de Madagascar (RZF & KISF) & Comores (1690, 3655, 3700 & 3683) proches des souches d'Afrique du Sud (Welgevonden & Lutale)(d)

Arbre MLVA NJ sur 7 VNTRs



- ✓ 25% de clones
- ✓ Même groupes pour souches Caraïbe (a), Afrique de l'Ouest (b), Afrique de l'Ouest & Caraïbe(c)
- ✓ Groupes distincts pour souches de l'Océan Indien (d)
- ✓ Forte discrimination au sein des groupes(b) & (c)
- ✓ 2 souches caribéennes appartiennent au groupe (c) par MLST différent par MLVA

CONCLUSION & PERSPECTIVES

- ✓ Développement d'outils moléculaires pour les études de phylogénie
- ✓ Identification de groupes associés aux origines géographiques
- ✓ Confirmation de l'origine des souches de la Caraïbe en provenance d'Afrique de l'Ouest
- ✓ Identification d'événements génétiques récents par MLVA pour les souches de la Caraïbe & de l'Océan Indien
- ✓ Souches supplémentaires de l'Océan Indien pour confirmer la structuration des souches
- ✓ Etudes en cours à l'échelle régionale: Caraïbe & Océan Indien