



HAL
open science

Contribution à l'étude de l'expression du gène *stx2* chez des souches STEC d'origine bovine soumises ou non à des conditions d'induction par l'enrofloxacin

Claire Irène Maurer

► To cite this version:

Claire Irène Maurer. Contribution à l'étude de l'expression du gène *stx2* chez des souches STEC d'origine bovine soumises ou non à des conditions d'induction par l'enrofloxacin. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10201 . tel-00652343

HAL Id: tel-00652343

<https://theses.hal.science/tel-00652343>

Submitted on 15 Dec 2011

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.

n° d'ordre 201

2009

Thèse de l'Université de Lyon
délivrée par l'université Claude Bernard Lyon 1
Ecole doctorale E2M2 (Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation)
Diplôme de doctorat de l'Université Claude Bernard – Lyon I
soutenue publiquement le 3 novembre 2009
par Mlle MAURER Claire Irène

Titre : **Contribution à l'étude de l'expression du gène *stx2* chez des souches STEC d'origine bovine soumises ou non à des conditions d'induction par l'enrofloxacin**

Directeur de thèse : Dr Jean-Yves MADEC

Directeur du laboratoire : Dr Didier CALAVAS

Rapporteurs : Pr Hubert BRUGERE
Dr Brigitte CARPENTIER

Examineurs : Pr Jean FRENEY
Dr Frédéric AUVRAY
Dr Jean-Yves MADEC

Résumé en français :

Le travail de thèse a eu pour but de contribuer à une meilleure connaissance de la dangerosité pour l'homme des souches STEC d'origine bovine, en explorant la corrélation pouvant exister entre la présence du gène *stx* chez de telles souches et la réalité de son expression. La quantification de l'expression du gène *stx2* présent chez 46 souches STEC bovines a été réalisée à l'aide d'un test ELISA commercial détectant spécifiquement les shiga toxines, le test ProSpecT® Shiga toxin (OXOID). L'ensemble des résultats de validation préalable obtenus pour ce test a permis de considérer qu'il pouvait être valablement appliqué à l'étude du panel de souches d'*E. coli* O157:H7 bovines collectées au laboratoire, tout en déterminant les limites méthodologiques, et donc d'interprétation. Utilisé comme outil de quantification de la production de Stx2 par les souches du panel choisi, et dans deux conditions expérimentales différentes (présence ou absence d'induction par l'enrofloxacin), ce test a permis de mettre en évidence que seulement 15,2% des souches d'*E. coli* O157:H7/H- étudiés produisent des quantités significatives de Stx2 détectables sans induction, et ce à des niveaux variables. En revanche, la majorité de ces isolats, bien que n'exprimant pas la protéine Stx2 de manière constitutive, produit des quantités significatives de Stx2 en présence de concentrations subinhibitrices d'enrofloxacin, antibiotique de la famille des fluoroquinolones et utilisé en médecine vétérinaire. Enfin, des mutants résistants à l'enrofloxacin sélectionnés à partir de certaines souches d'*E. coli* O157:H7, produisent, après induction par l'enrofloxacin, 3 fois plus de toxine Stx2 que les souches sauvages. Les mutants sont également inductibles en utilisant des doses d'enrofloxacin 100 fois supérieures à celles utilisables pour les souches sauvages. L'ensemble de ces résultats montre (i) la corrélation, ou non, qui peut exister entre la présence du gène *stx2* et son expression, (ii) que la proportion inductible des souches STEC bovines est potentiellement importante, (iii) que l'enrofloxacin induit fortement l'expression du gène *stx2* chez les souches STEC bovines et que (iv) l'induction par l'enrofloxacin conduit à des taux d'expression du gène *stx2* supérieurs chez des souches résistantes aux fluoroquinolones que chez les souches sensibles. Au final,

cette étude contribue à documenter la variabilité des niveaux d'expression des gènes *stx* et illustre le risque que des STEC issus de bovins puissent devenir plus fréquemment pathogènes pour l'homme suite à l'usage croissant des fluoroquinolones vétérinaires.

Discipline : Ecologie microbienne

Mots-clés : STEC, Escherichia coli, induction, enrofloxacin, expression, *stx*, O157

Intitulé du laboratoire :

Afssa Lyon

Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Bovine et Hygiène des Viandes.

Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes

31 avenue Tony Garnier

69364 Lyon Cedex 07

Titre en anglais : Contribution to a better knowledge of the expression of the *stx2* gene in cattle STEC isolates with or without induction by enrofloxacin

Résumé en anglais :

The present study contributed to a better knowledge of the pathogenicity of STEC for humans by quantifying the expression of the *stx2* gene from a panel of 46 cattle STEC isolates by ELISA. Successful validation experiments of the ProSpecT[®] Shiga toxin ELISA (OXOID) first concluded to its capability to be used for a valuable quantification of the Stx2 protein. Stx2 expression was tested in presence and absence of subtherapeutic concentrations of enrofloxacin, an antibiotic of the fluoroquinolones family used in veterinary medicine. Whereas only 15.2% of the strains displayed significant amounts of detectable Stx2 in absence of induction, most of them were shown to be inducible, and at various levels, in presence of subtherapeutic concentrations of enrofloxacin. Also, enrofloxacin-resistant mutants of Stx2-producing *E. coli* O157:H7 were selected and produced 3-fold higher Stx2 levels than native strains after induction with enrofloxacin. Mutants were also inducible using hundred-fold higher enrofloxacin concentrations than the useful ones for native strains. At the end, these results show (i) the inconstant and variable expression of the *stx2* gene from cattle STEC isolates in native conditions, (ii) the potentially high number of inducible STEC isolates in cattle, (iii) that enrofloxacin is a strong inducer of the *stx2* expression in cattle STEC isolates and (iv) that the *stx2* gene is stronger induced in isolates resistant to fluoroquinolones compared to susceptible ones. Finally, this all study documents the variable expression of the *stx2* gene and also suggests that *E. coli* O157:H7 from cattle may become more frequently pathogenic to humans as a side-effect of the increasing use of veterinary fluoroquinolones.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier celui qui m'a donné la chance d'effectuer cette thèse et qui m'a accueillie au sein du laboratoire de l'AFSSA Lyon, Didier Calavas.

A Jean-Yves Madec qui a pris la tête de l'équipe Bactériologie Bovine et Hygiène des Viandes quelques mois à peine avant mon arrivée au laboratoire et qui a accepté de m'encadrer. Après plusieurs mois de redéfinition du sujet de cette thèse, sur une thématique relativement nouvelle au laboratoire, il a su diriger mon travail et en valoriser les résultats sous la forme de 2 publications. Un grand merci pour tout Jym.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres de l'équipe pour m'avoir acceptée malgré mon caractère bien trempé et mes demandes scientifiques nombreuses, surtout à mon arrivée. A tous ces bons moments agrémentés de gâteaux et de chocolat qui m'ont bien profité !

En plus de Jean-Yves, deux membres de l'équipe mycoplasmologie ont suivi et contribué à orienter mon travail et je leur en suis très reconnaissante, merci à Florence Tardy et à Patrice Gaurivaud pour leurs conseils et leur investissement. Un grand merci également à ceux du laboratoire qui m'ont fait profiter de leurs explications dans les domaines ou techniques qui ne m'étaient pas familières : Pauline Martin, Myriam Chazel, Eric Morignat, Ann Dernburg, Denis Longchambon, Saci Iken.

A ceux qui rendent possible notre travail de recherche et font en sorte d'en faciliter les aspects plus triviaux, merci à Christine, Nadine et Mireille du service comptabilité, à Denis, Brahim, Pascal et Jean-Louis pour la logistique et Evelyne à la bibliothèque. Merci aussi à Laïla et à Martine.

A tous les stagiaires du bureau des "thésards" avec qui j'ai pu échanger et partager de bons moments tout au long de mes 3 ans au laboratoire et en dehors. A ma

"jumelle" du 26 mars, Laure, à Sandrine, Saci, Lionel, Hayette, je garde d'excellents souvenirs de ces années à partager le même bureau. A Michelle qui a illuminé mon passage à l'AFSSA.

A ceux sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, à mes parents pour leur soutien indéfectible et l'exemple qu'ils m'ont donné. Vous avez toujours cru en moi, même s'il m'arrivait de douter, vous m'avez appris que là où le talent ne suffit pas, la détermination et la ténacité sont la clé du succès.

A celui qui chaque jour me comble par sa présence, son affection et son soutien. A Toi qui assure au quotidien, j'espère être digne de tant d'attentions. Merci Patrice d'être mon rocher de Gibraltar et mon compagnon sur cette longue route.

SOMMAIRE

Liste des Tableaux	10
Liste des figures	12
INTRODUCTION	14
1. <i>Importance des EHEC en santé publique</i>	15
1.1. Pathologies humaines à <i>E. coli</i>	15
1.2. Importance du réservoir bovin des STEC	26
1.4. Principales voies d'infections humaines à EHEC	33
2. <i>Définition, déterminisme et variabilité de la virulence des souches STEC pour l'homme (EHEC)</i>	35
2.1. Définitions actuelles de la virulence des EHEC	36
2.2. Les facteurs de virulence	38
2.3. Variabilité de l'expression des shiga toxines	47
2.4. Utilisation des antibiotiques, antibiorésistance et virulence des STEC	53
2.5. Virulence comparée des souches bovines et humaines	59
2.6. Mobilité des gènes impliqués dans la virulence des STEC	60
3. <i>Prévention et contrôle des infections humaines à STEC</i>	63
3.1. Outils et méthodes disponibles pour la surveillance	63
3.2. Données de surveillance des infections humaines à EHEC	67
3.3. Surveillance du réservoir animal et des produits alimentaires en France et en Europe	74
3.4. Evaluation des risques pour l'homme liés aux STEC	77
3.5. Prévention des infections à EHEC	81
INTRODUCTION AU TRAVAIL DE THESE	84
MATERIELS ET METHODES	86
1. <i>Souches bactériennes</i>	86
2. <i>Conservation des souches bactériennes</i>	86
2.1. Congélation	86
2.2. Lyophilisation	87
3. <i>Cultures bactériennes à partir d'échantillons congelés ou lyophilisés</i>	87
3.1. Culture à partir de souches congelées	87
3.2. Culture à partir de souches lyophilisées	87
4. <i>Caractérisation des souches bactériennes</i>	88

4.1.	Identification des <i>E. coli</i>	88
4.2.	Mesure de la croissance bactérienne	91
4.3.	Détermination de la résistance aux antibiotiques	92
4.4.	Détermination du profil de virulence : PCR <i>stx</i> commun, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>ehx</i> , <i>uida</i>	93
5.	<i>Quantification de la production de toxines Stx</i>	95
5.1.	Préparation des gammes de dilution d'antibiotique pour la culture en bouillon	95
5.2.	Induction de l'expression des toxines par les antibiotiques	96
5.3.	Protocole ELISA ProSpec [®] Shiga toxin à partir d'une suspension bactérienne en bouillon de culture	97
5.4.	Variation de la production de toxine après élimination de l'enrofloxacin	98
6.	<i>Sélection de STEC résistants à l'acide nalidixique et à l'enrofloxacin</i>	99
6.1.	Préparation des milieux de sélection	99
6.2.	Préparation des boîtes de gélose supplémentée en antibiotique	100
6.3.	Sélection des souches résistantes par repiquages successifs	100
RESULTATS		102
1.	<i>Validation du test ELISA ProSpec[®] shiga toxin</i>	103
1.1.	Remarque préliminaire sur l'estimation de l'incertitude des mesures	104
1.2.	Cinétique de croissance bactérienne	104
1.3.	Analyse des performances intrinsèques du test ELISA ProSpec [®] Shiga toxin	110
1.4.	Préparation de l'échantillon et réalisation du test	130
2.	<i>Etude de l'expression de la toxine sur un panel de 50 souches</i>	137
2.1.	Expression de la toxine en condition basale	138
2.2.	Effet de l'enrofloxacin sur la croissance bactérienne et sur l'expression de la toxine	138
3.	<i>Recherche et sélection de STEC résistants aux (fluoro)quinolones</i>	154
3.1.	Recherche de STEC résistants aux (fluoro)quinolones ou d' <i>E. coli</i> résistantes aux (fluoro)quinolones possédant le gène <i>stx</i>	154
3.2.	Sélection et test de mutants résistants à l'enrofloxacin et à l'acide nalidixique	155
4.	<i>Publication n°1</i>	170
5.	<i>Publication n°2</i>	179
DISCUSSION		189
1.	<i>Choix du test et validation</i>	190
1.1.	Performances intrinsèques du test	190
1.2.	Validité et limites des mesures d'absorbance – lien avec la croissance bactérienne	195
1.3.	Conclusions sur l'usage du test ProSpec Shigatoxin	197

2.	<i>Expression basale et expression induite de la toxine Stx2 par les souches O157 : H7 bovines</i>	198
2.1.	Différents niveaux d'expression basale de Stx2 sont observables	198
2.2.	Effet de l'enrofloxacin sur l'expression de Stx2	199
2.3.	Proportion de souches STEC inductibles parmi les souches d'origine animale	201
2.4.	Relation entre les niveaux d'expression basale et induite pour une souche donnée	202
2.5.	Variation de la production de toxine au cours du temps, labilité de l'induction	203
3.	<i>Effets cumulés de l'enrofloxacin sur la sélection de résistance et l'induction de toxines</i>	204
3.1.	Stratégie de sélection de souches d' <i>E. coli</i> O157 :H7 résistantes aux fluoroquinolones	205
3.2.	Expression de Stx2 chez la souche mutante HSVR 149 en l'absence d'induction	206
3.3.	Expression de Stx2 chez la souche mutante HSVR 149 après induction par l'enrofloxacin	207
3.4.	Conclusions sur le niveau de sur-risque global pour l'homme	207
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		209
REFERENCES		211
ANNEXES		225
LISTE DES ABREVIATIONS		233

Liste des Tableaux

Tableau I.1 :	Les principales caractéristiques des pathotypes d' <i>E. coli</i> _____	19
Tableau I.2 :	Prévalence des STEC _____	28
Tableau I.3 :	Les marqueurs de virulence des STEC et leur localisation _____	37
Tableau I.4 :	Les principales épidémies à EHEC d'origine alimentaire ou environnementale de 1995 à 2008 _____	72
Tableau R.1 :	Dénombrement d' <i>E.coli</i> HSVR 149 en fonction de l'absorbance mesurée en bouillon BHI	108
Tableau R.2 :	Evaluation de l'expression de la toxine Stx à partir de cultures bactériennes en bouillon BHI _____	111
Tableau R.3 :	Evaluation de l'effet sur l'absorbance mesurée en ELISA, du délai entre l'arrêt de la réaction enzymatique et la lecture _____	114
Tableau R.4 :	Evaluation de la linéarité du test sur une gamme de dilution de toxine _____	116
Tableau R.5 :	Evaluation de la linéarité du test sur des gammes de dilution de cultures bactériennes (HSVR 11, 99 et 149) _____	117
Tableau R.6 :	Variabilités intra-et inter-lot du test ELISA à partir de gammes de dilutions de la toxine Stx purifiée _____	119
Tableau R.7 :	Evaluation de la variabilité intra-lot du test ELISA à partir de gammes de dilutions de 4 souches bactériennes (HSVR 99, 121, 149 et ATCC 43889) _____	120
Tableau R.8 :	Evaluation de la variabilité inter-lot du test ELISA à partir d'une même gamme de dilution de la toxine Stx purifiée _____	123
Tableau R.9 :	Variabilité inter-lot du test ELISA à partir des 46 souches de la collection HSVR (kits et échantillons différents) _____	124
Tableau R.10 :	Evaluation de l'expression de 3 souches (HSVR 11, 99 et 149) sur 4 kits de 4 lots différents à des dates différentes _____	126
Tableau R.11 :	Evaluation de l'expression de 3 souches (HSVR 11, 99 et 149) en duplicate sur 2 kits _____	127

Tableau R.12 :	Vérification de la variabilité entre 2 lecteurs de plaque _____	128
Tableau R.14 :	Expression de la toxine pour les 50 souches en condition basale exprimée en ratio $DO_{450/65nm}$ sur DO_{600nm} _____	139
Tableau R.15 :	CMI des 50 souches du panel pour l'enrofloxacin _____	145
Tableau R.16 :	CMI pour l'enrofloxacin et pour l'acide nalidixique des souches natives et mutantes sélectionnées _____	156
Tableau R.17 :	Expression de la toxine par HSVR 87 et les mutants HSVR 87 NA5 et HSVR 87 EN4 C en condition basale ou induite par l'enrofloxacin _____	157
Tableau R.18 :	Expression de la toxine par ATCC 43889 et les mutants ATCC 43889 NA5, ATCC 43889 NA6 B et ATCC 43889 EN4 C en condition basale ou induite par l'enrofloxacin _____	159
Tableau R.19 :	Expression de la toxine par HSVR 149, HSVR 149 NA3, HSVR 149 NA4 A et HSVR 149 NA4 B en condition basale ou induite par l'enrofloxacin _____	162
Tableau R.20 :	Expression de la toxine par HSVR 149 et le mutant HSVR 149 EN4 A en condition basale ou induite par l'enrofloxacin _____	163
Tableau R.21 :	Expression de la toxine par HSVR 149 et le mutant HSVR 149 EN4 A en condition basale et en présence d'acide nalidixique _____	167

Liste des figures

Fig. I.1 :	Classifications des pathotypes d'E.coli _____	19
Fig. I.2 :	Mécanismes d'interaction des différents pathotypes d'E. coli responsables de diarrhées (d'après Nataro and Kaper 1998) _____	20
Fig. I.3 :	Stéréogramme représentant la structure moléculaire en 3D de la toxine Stx2 dessinée avec MOLSCRIPT et RASTER3D (d'après Fraser 2004 J Biol Chem) _____	23
Fig. I.4 :	Diffusion des toxines Stx chez le patient _____	25
Fig. I.5 :	Les principales voies de transmission des EHEC et leurs interactions _____	35
Fig. R.1 :	Courbes de croissance _____	105
Fig. R.2 :	Représentation graphique du nombre d'UFC par unité de DO _{600nm} théorique _____	109
Fig. R.3 :	Evaluation de l'effet du volume de substrat enzymatique sur l'absorbance mesurée _____	113
Fig. R.4 :	Absorbance à 450/650 nm en fonction du délai entre l'arrêt de la réaction enzymatique et la lecture _____	115
Fig. R.5 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm d'une gamme de toxine purifiée en fonction de la quantité de toxine _____	116
Fig. R.6 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm de 3 gammes de dilution de cultures bactériennes (HSVR 11, 99 et 149) en fonction du facteur de dilution _____	118
Fig. R.7 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm d'une gamme de dilution de la toxine Stx purifiée en fonction de la quantité de toxine _____	120
Fig. R.8 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm de 4 cultures bactériennes (HSVR 99, 121 et 149 et ATCC 43889) en fonction du facteur de dilution _____	122
Fig. R.9 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm d'une gamme de dilution de la toxine Stx purifiée en fonction de la quantité de toxine testée sur 2 lots différents _____	123
Fig. R.10 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches testées _____	125
Fig. R.11 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches testées _____	126
Fig. R.12 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches testées _____	127

Fig. R.13 :	Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches et du lecteur utilisé	128
Fig. R.14 :	Etude de l'expression de la toxine par HSVR 149 en BHI au cours de la croissance bactérienne	131
Fig. R.15 :	Etude de l'expression de la toxine par HSVR 99 au cours de la croissance bactérienne	133
Fig. R.16 :	Etude de l'expression de la toxine par HSVR 149 et 99 au cours de la croissance bactérienne avec dilution de l'échantillon	135
Fig. R.17 :	Etude de l'expression de la toxine par HSVR 82 au cours de la croissance bactérienne	136
Fig. R.18 :	Mesure de l'expression de la toxine pour les 50 souches en condition basale exprimé en ratio $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$	140
Fig. R.19 :	Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 149 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin	141
Fig. R.20 :	Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 91 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin	143
Fig. R.21 :	Etude de l'expression de la toxine par un panel de 50 souches en présence ou en absence d'enrofloxacin	146
Fig. R.22 :	Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 149 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin	150
Fig. R.23 :	Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 87 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin	152
Fig. R.24 :	HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou en absence d'enrofloxacin	164
Fig. R.25 :	HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou en absence d'acide nalidixique	168

INTRODUCTION

Escherichia coli est une espèce appartenant au groupe des Enterobacteriaceae, et qui a divergé de la lignée des salmonelles il y a environ 100 millions d'années. La plupart des souches d'*E. coli* sont des bactéries commensales constituant environ 80% de la microflore aérobie. Toutefois, certaines souches peuvent se révéler pathogènes pour leur hôte. Ces souches, associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales, sont classées selon leurs facteurs de virulence et les symptômes qu'elles induisent. On distingue actuellement 6 groupes d'*E. coli* pathogènes pour l'homme, dont les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC).

Les EHEC se caractérisent par la production de toxines dites vérotoxines (VT) car elles ont un effet cytotoxique sur les cellules Véro (cellules rénales du singe vert d'Afrique). Ces vérotoxines sont aussi appelées "shiga like toxins" (Stx) en raison de l'homologie des séquences, la similarité d'activité biologique et les réactions antigéniques croisées observées entre la principale cytotoxine extracellulaire de *Shigella dysenteriae* sérotype 1 et la toxine Stx1 d'*E. coli* (O'Brien, LaVeck et al. 1982; O'Brien, Lively et al. 1983; Calderwood, Auclair et al. 1987). Par extension, les toxines Stx d'*E. coli* sont aussi appelées shiga toxines.

Toutefois, les *E. coli* producteurs de shiga toxines ou STEC ne sont pas tous pathogènes pour l'homme, le terme d'EHEC regroupant les STEC hautement pathogènes pour celui-ci. Les EHEC possèdent généralement, en plus des gènes de toxines Stx, d'autres marqueurs de virulence favorisant la colonisation de l'intestin et une hémolyse des cellules endothéliales au niveau intestinal, voire rénal et cérébral. Les formes les plus graves se manifestent par un syndrome hémolytique et urémique (SHU) entraînant des séquelles rénales et possiblement le décès du patient.

1. Importance des EHEC en santé publique

1.1. Pathologies humaines à *E. coli*

1.1.1. Classification médicale des pathotypes d'*E. coli* chez l'homme

Les *E. coli* pathogènes pour l'homme sont classés en 6 groupes en fonction de leur pathogénicité. On distingue : les *E. coli* entéropathogéniques (EPEC), les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Les stratégies d'infection de ces pathogènes - colonisation des muqueuses, éventuelle invasion cellulaire, multiplication, échappement aux défenses de l'hôte et dommages causés - sont liés à la présence de gènes de virulence et d'adhésion cellulaire différant d'un groupe à l'autre (Nataro and Kaper 1998).

1.1.1.1. Les EAEC

Ils entraînent un retard de croissance, des infections urinaires et des diarrhées persistantes dans les pays en développement et les pays industrialisés (Amieva 2005). Ils se caractérisent par une adhésion agrégative, grâce aux adhésines AAF, entraînant des nécroses à l'apex des villosités. L'entérotoxine EAST1 agit sur les cellules intestinales en perturbant le cytosquelette et les mécanismes de sécrétion (Nataro and Kaper 1998; Amieva 2005).

1.1.1.2. *Les ETEC*

Les ETEC sont l'agent étiologique le plus fréquent des diarrhées de l'enfant dans les pays en développement et des voyageurs arrivant dans les zones endémiques ("diarrhée de Mexico") (Jothikumar, Reddy et al. 2000) ; Amieva 2005). Ces diarrhées sont aqueuses et généralement non sanguines, sans mucus ni pus. Sans conséquences graves pour les voyageurs, elles peuvent être fatales aux enfants malnutris (Amieva 2005). Les infections à ETEC nécessitent une forte dose infectieuse. En effet, 10^8 UFC sont nécessaires pour provoquer un taux élevé de malades chez des volontaires sains (Nataro and Kaper 1998). Des pili spécifiques appelées CFA ou CS (pour "Coli Surface antigen") confèrent aux ETEC une colonisation site-spécifique de l'intestin grêle (Nataro and Kaper 1998). Leur pouvoir pathogène est principalement associé à la sécrétion de toxines thermolabiles (LT), ayant la même structure et le même mode d'action que la toxine cholérique, et de toxines thermostables (ST) (Amieva 2005).

1.1.1.3. *Les EIEC*

Par invasion de la muqueuse du colon, les EIEC provoquent des diarrhées aiguës proches des diarrhées dysentériques, avec présence de mucus, sang et leucocytes dans les selles (Nataro and Kaper 1998). Ces *E. coli* ont été isolés dans quelques cas sporadiques de diarrhée aiguë. La virulence des EIEC est liée à la présence d'un plasmide très proche de celui connu chez *Shigella*.

1.1.1.4. *Les DAEC*

Les DAEC provoquent des diarrhées (aqueuses, éventuellement associées à du mucus) et des infections urinaires (Nataro and Kaper 1998). L'adhésine fimbriale et des protéines de la membrane extérieure codées par la bactérie sont à l'origine d'une adhésion diffuse.

1.1.1.5. *Les EPEC*

Les EPEC sont le principal agent causal de gastro-entérites chez les enfants de moins de 3 ans. Rares et avec une mortalité faible dans les pays développés, la fréquence des gastro-entérites à EPEC est de 30% dans les pays en développement (Senerwa, Olsvik et al. 1989; Amieva 2005). Les EPEC ne sont ni sécréteurs d'entérotoxine, ni entéro-invasifs. Par contre, ils provoquent des lésions histopathologiques caractéristiques dites d'attachement/effacement (lésions A/E) (Senerwa, Olsvik et al. 1989; Amieva 2005). Ces lésions sont caractérisées par l'effacement des microvillosités intestinales et l'adhérence des bactéries *via* une protéine membranaire, l'intimine, à la membrane cytoplasmique des entérocytes : on parle d'adhérence localisée (Nataro and Kaper 1998). Le principal gène de virulence responsable de ces lésions est le gène *eae* qui code l'intimine. D'autres facteurs que l'on retrouve chez les EHEC ou encore chez les EAEC interviennent également dans la pathogénicité des EPEC : les gènes *esc* et *sep*, ainsi que les gènes *espA*, *espB* et *espD* codant respectivement des facteurs du système de sécrétion de type 3 (TTSS pour "Type Three Secretory System") et ses effecteurs, ou encore le gène *astA* codant la toxine EAST1 typique des EAEC (Nataro and Kaper 1998).

1.1.1.6. *Les EHEC*

Ils causent une grande diversité de pathologies allant de simples diarrhées à des colites hémorragiques (CH). Ce tableau clinique plus ou moins sévère se caractérise par des crampes abdominales, une diarrhée aqueuse et généralement sanglante, chez des patients généralement apyrétiques ou sub-fébriles. La durée d'incubation est de 2 à 10 jours avec une évolution favorable dans 90% des cas et une guérison totale en quelques jours (Panos, Betsi et al. 2006). Il n'existe pas de traitement spécifique si ce n'est l'arrêt de tout apport alimentaire et la mise en place d'une nutrition parentérale.

Ce tableau clinique diarrhéique peut se compliquer par des manifestations systémiques, tel que le syndrome hémolytique et urémique (SHU) qui touche surtout

les enfants de moins de 3 ans, et le purpura thrombocytopénique (PTT) uniquement chez les adultes (Senerwa, Olsvik et al. 1989; Amieva 2005).

Le SHU apparaît généralement après une diarrhée prodromique sanglante. Ce syndrome est caractérisé par une anémie, un taux de plaquettes bas (thrombocytopénie) et une insuffisance rénale, avec un taux de létalité compris entre 2 et 10% et des séquelles à long terme comme des lésions rénales ou neurologiques, ou de l'hypertension dans 12 à 30% des cas (Amieva 2005). Le SHU est d'ailleurs la première cause d'insuffisance rénale chez les enfants de 1 à 36 mois avec un pronostic rénal défavorable dans 1/3 des cas. L'atteinte du système nerveux central (SNC) est, quant à elle, la principale cause de décès avec un taux de mortalité <5% (Nataro and Kaper 1998). Chaque année, aux Etats Unis, on compte environ 110 000 cas d'infections à EHEC avec environ 4% des patients qui développent des SHU (Mead, Slutsker et al. 1999). En France, l'incidence des SHU est d'environ 0,7/100 000 chez les enfants de moins de 15 ans.

Syndrome touchant essentiellement l'adulte, le PTT est considéré comme une variante de SHU entraînant des atteintes neurologiques (Hussein and Bollinger 2005). Il se caractérise par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, de la fièvre et des troubles neurologiques avec insuffisance rénale. Le PTT dure généralement de quelques jours à quelques semaines, parfois plusieurs mois. Si la maladie progresse, elle atteint le SNC et les reins, pouvant conduire au décès du patient. Les signes neurologiques sont associés dans 90% des cas à une évolution fatale.

La pathogénicité de ces *E. coli* est liée à la production des shiga toxines mais aussi d'autres facteurs de virulence (Senerwa, Olsvik et al. 1989; Amieva 2005). Parmi ces facteurs, on retrouve l'intimine, et les protéines EspA, B et D entraînant le phénotype A/E caractéristique des EPEC. Les doses minimales infectieuses des EHEC, de <50 à 100 UFC pour *E. coli* O157:H7 (Gyles 2006), favorisent la transmission de personne à personne et complique la détection et la prévention des épidémies.

Fig. I.1 : Classifications des pathotypes d'E.coli

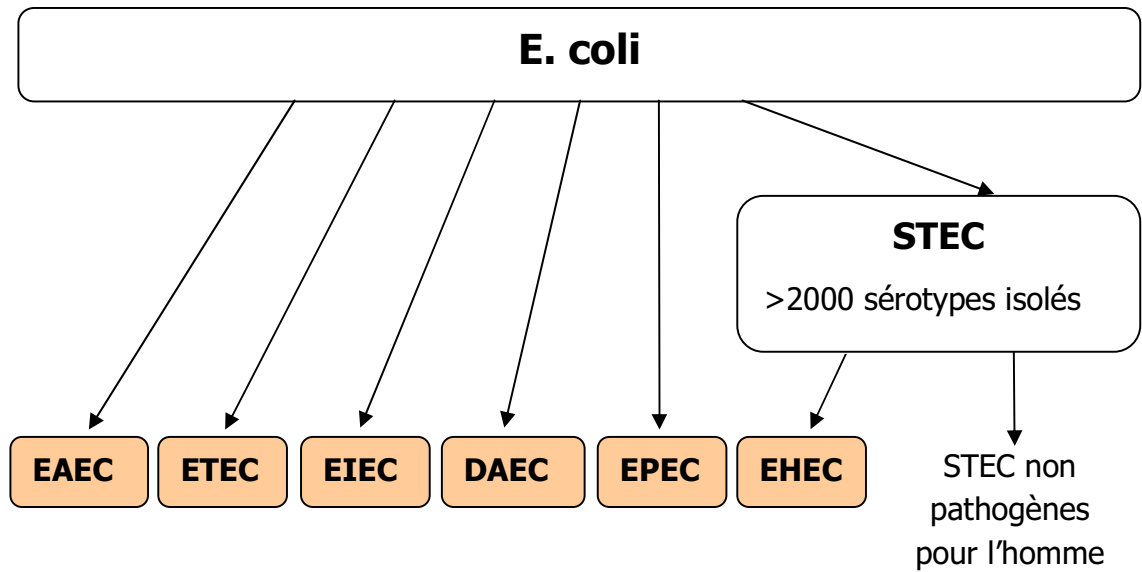
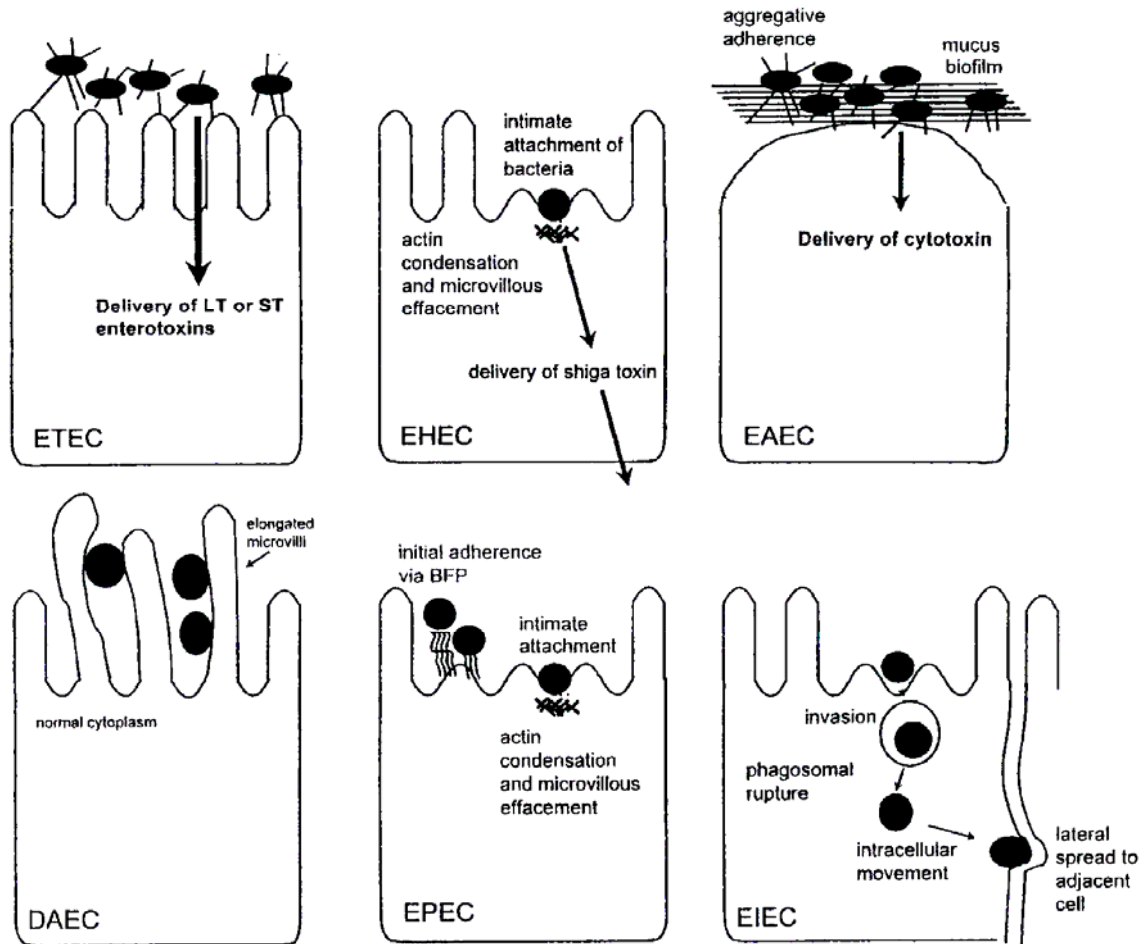


Tableau I.1 : Les principales caractéristiques des pathotypes d'E. coli

Pathotypes	(Familles de) gènes	Facteur (fonction)	Pathologies associées
EAEC	astA LT AAF	Entérotoxine EAST1 Toxines thermolabiles <i>Pili</i> (adhésion agrégative)	Retard de croissance Infections urinaires Diarrhées persistantes
ETEC	ST LT CS/CFA	Toxines thermostables Toxines thermolabiles <i>Pili</i> (colonisation)	Diarrhées de l'enfant Diarrhées du voyageur
EIEC		Plasmide de virulence	Diarrhées aiguës "dysenterie-like"
DAEC	Afa/Dr	Adhésine fimbriale (adhésion cellulaire) Protéines de la membrane extérieure (adhésion diffuse)	Diarrhées aqueuses Infections urinaires
EPEC	eae/tir sep et esc espA, B et D BFP	L'intimine et son récepteur (adhésion localisée) Système de sécrétion de type 3 et ses effecteurs <i>Pili</i>	Gastro-entérites
EHEC	stx eae/tir ehxA espP rfl	Toxines Stx L'intimine et son récepteur (adhésion localisée) Entérohémolysine Sérine protéase Antigène O157	Diarrhées aqueuses à sanglantes CH PTT SHU

Fig. I.2 : Mécanismes d'interaction des différents pathotypes d'*E. coli* responsables de diarrhées (d'après Nataro and Kaper 1998)



Les différents pathotypes d'*E. coli* sont représentés fig. I.1 et leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau I.1. Les modes d'interaction des différents pathotypes avec leur hôte sont représentés fig. I.2.

1.1.2. Sérotypage des STEC

La classification la plus utilisée par les microbiologistes se base sur le sérotype (ce dernier étant défini par la combinaison des antigènes somatiques O et flagellaires H) ou le séro groupe (caractérisé par l'antigène somatique seul). Les antigènes O sont des antigènes lipo-polysaccharidiques de paroi, les antigènes H sont quant à eux protéiques. Les entérobactéries, et les STEC en particulier, possèdent tous des

antigènes de paroi (antigènes O), mais seuls les STEC mobiles possèdent des antigènes de flagelle (antigènes H). Enfin, certains possèdent également un antigène d'enveloppe ou antigène K.

Le typage des isolats s'effectue généralement par séro-agglutination (Gyles 2006), la plupart des laboratoires ne disposant que des sérums pour les antigènes O et H les plus courants en clinique humaine (O157, O26, O145, O111, ..., H7...).

Cependant, certaines souches peuvent perdre leur mobilité, l'antigène H n'est alors plus exprimé et ces souches sont classées comme non motiles (NM ou H-). Une technique de sérotypage moléculaire a donc également été développée pour déterminer la présence du gène *fliC* codant la flagelline (tout comme pour l'antigène O157 codé par le gène *rfpE*) (Liu, Gilchrist et al. 2008). Les parties N et C terminales de la flagelline sont très conservées et c'est donc la partie médiane, plus variable, qui donne la spécificité de l'antigène H. Les *E. coli* non motiles possèdent le gène *fliC* mais sont incapables de synthétiser un flagelle fonctionnel. Après amplification et restriction du gène *fliC*, il est possible de typer l'antigène H en comparant le profil obtenu à une base de données de profil-type (Machado, Grimont et al. 1998).

Outre ces différences de types antigéniques, les STEC ont d'autres caractéristiques permettant de les différencier. Une corrélation est souvent observée entre sérotype et expression de facteurs de virulence tels que les shiga toxines ou des adhésines favorisant la fixation des STEC aux microvillosités intestinales. Ainsi, certains sérotypes sont plus virulents que d'autres, et sont plus souvent incriminés dans des pathologies humaines graves. A ce jour, des STEC de plus de 2000 sérotypes différents ont été isolés chez l'homme, l'animal, dans la nourriture, l'eau ou l'environnement (Doyle and Schoeni 1987; Muniesa and Jofre 1998; Mora, Blanco et al. 2005).

Le sérotype le plus étudié, mais aussi le plus fréquemment retrouvé lors d'infections dues à des STEC est *E. coli* O157:H7. Mais plus de 100 sérotypes de STEC non-O157

sont également connus pour être pathogènes : O26:H11, O91:H10, O103:H2, O111:H8, pour n'en citer que quelques uns (Hussein 2006).

1.1.3. Pathogénie de l'infection humaine par les STEC

1.1.3.1. *Processus pathogénique de l'infection*

L'infection se fait le plus souvent après ingestion d'un aliment contaminé. Les STEC colonisent le tube digestif en se fixant aux cellules épithéliales intestinales *via* des molécules d'adhésion (dont la mieux caractérisée est l'intimine). La perturbation de la barrière mucoale, surtout au niveau du colon, provoque tout d'abord une diarrhée aqueuse. Si les toxines endommagent la paroi des vaisseaux sanguins du colon, le patient présente alors une diarrhée sanglante. La progression de la maladie se ferait alors par le passage systémique des toxines qui, en atteignant d'autres organes, provoquerait les complications rénales et neurologiques observées en cas de SHU (Machado, Grimont et al. 1998). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par le système immunitaire de l'hôte ainsi que l'action des toxines sur les endothéliums provoquent une microangiopathie thrombotique, associée aux syndromes SHU et PTT (Amieva 2005).

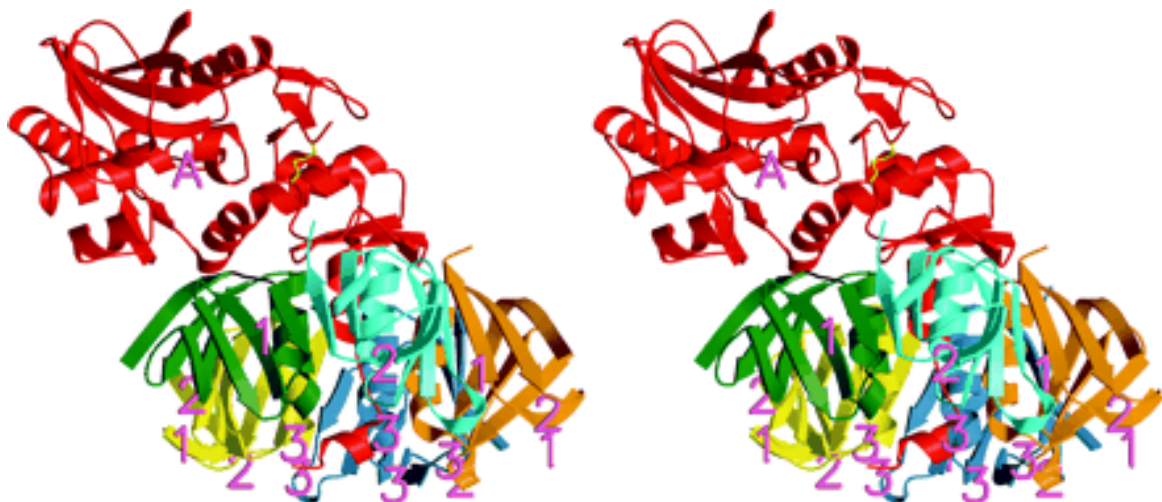
1.1.3.2. *Structure moléculaire et mode d'action des shiga toxines*

Ce sont des toxines de type AB₅ comme la toxine cholérique, la toxine pertussique et la cytotoxine subtilase qui a été récemment découverte chez certaines souches de STEC (Paton, Beddoe et al. 2006). Les toxines Stx sont constituées d'une sous-unité A de 33 kDa à activité enzymatique couronnée par l'anneau formé par l'homopentamère B₅ (hétéropolymère AB₅ de 70 kDa) (Stein, Boodhoo et al. 1992; Kitov, Sadowska et al. 2000). Ce dernier permet la reconnaissance d'un récepteur glycolipidique spécifique (globotriosylcéramide Gb₃ ou plus rarement globotetraosylcéramide Gb₄ selon la forme isotypique de la toxine) présent à la surface des cellules cibles (Jacewicz, Clausen et al. 1986). Certains types cellulaires

humains, comme les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les cellules épithéliales, en particulier au niveau du colon et des glomérules rénaux, sont riches en récepteurs Gb3.

Les deux types de sous-unités des toxines, StxA et StxB, sont codés par 2 cadres de lecture en tandem (opéron de 1230 bp) situés dans la partie centrale d'un bactériophage lambdaïde chez *E. coli* O157:H7 (Huang, Friesen et al. 1987). En effet, les toxines Stx sont codées par des gènes portés par des bactériophages tempérés insérés sous forme de prophage dans le génome d'*E. coli*, mais également d'autres espèces bactériennes (Schmidt, Montag et al. 1993; Paton and Paton 1996; Strauch, Lurz et al. 2001; Grotiuz, Sirok et al. 2006). C'est la sous unité B qui possède une affinité pour les récepteurs Gb3 ou Gb4, et qui permet la fixation des toxines au niveau des cellules cibles (O'Brien, Marques et al. 1989). La structure moléculaire de la toxine Stx2 est représentée fig. I.3.

Fig. I.3 : Stéréogramme représentant la structure moléculaire en 3D de la toxine Stx2 dessinée avec MOLSCRIPT et RASTER3D (d'après Fraser 2004 J Biol Chem)



La sous unité A est représentée en rouge et les 5 sous-unités B en jaune, orange, bleu, vert et turquoise. Le site actif de la sous unité A est indiqué par la lettre A, quant aux chiffres 1, 2 et 3, ils correspondent aux différents sites de liaison de la toxine à son récepteur, Gb3. Les chaînes latérales des résidus cystéine reliant les peptide A1 et A2 sont matérialisées par une ligne jaune (à droite du site actif A).

Par convention, les structures en hélices alpha sont représentées sous la forme de rubans en tir-bouchon et les feuilletts bêta sous la forme de flèches.

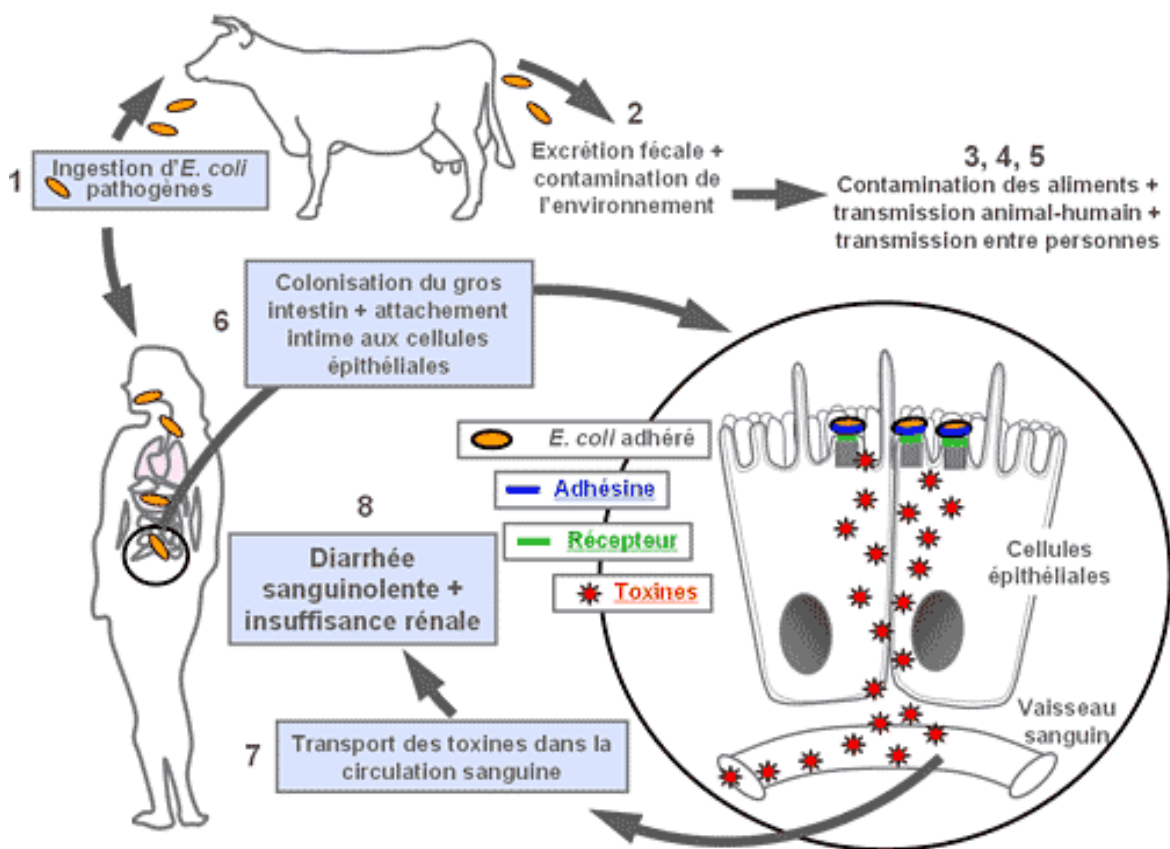
La liaison au récepteur Gb3 joue un rôle primordial dans la pathogénicité des STEC, elle représente l'un des principaux facteurs de risque de développement d'une complication sévère, le SHU. C'est la structure de la partie lipidique du récepteur Gb3 qui serait responsable de la fixation des toxines Stx à ce récepteur. L'augmentation de sa longueur, favoriserait par exemple la fixation de Stx1. Suite à leur fixation au récepteur Gb3 (ou Gb4 pour Stx2e), les toxines pénètrent dans la cellule cible (entérocyte, par exemple) par endocytose. Après transport rétrograde de l'appareil de Golgi à la lumière du réticulum endoplasmique, les toxines sont transloquées dans le cytoplasme de la cellule grâce à la protéine chaperonne du lumen HEDJ/Erdj3 (Yu and Haslam 2005). A ce stade, elles sont protéolysées, la sous unité A est clivée en 2 peptides reliés par un pont disulfure, A1 et A2 (Gyles 2006). Le peptide A1 agit telle une rRNA *N*-glycosidase sur la sous-unité ribosomale 60s des cellules eucaryotes (Endo, Mitsui et al. 1987) en provoquant la dépurination d'un résidu adénine au niveau de l'ARNr 28S, ce qui bloque la fixation des tRNA au ribosome et ainsi inhibe la synthèse protéique (Endo, Tsurugi et al. 1988; Melton-Celsa, Kokai-Kun et al. 2002). Suite à cette inhibition, la réponse de stress ribotoxique conduirait à l'apoptose de la cellule (Gyles 2006).

De plus, il est possible que l'attachement de la bactérie puisse favoriser le transit épithélial des toxines Stx. La liaison des EHEC pourrait faciliter la toxémie en augmentant la perméabilité mucosale ou *via* un processus de sécrétion de type III dépendant TTSS. Alternativement, l'attachement de ce type de bactéries aux cellules

épithéliales induisant l'apoptose entraînerait une augmentation du turn-over cellulaire qui pourrait compromettre la barrière mucoale.

Enfin, l'étendue des manifestations cliniques induites par les toxines Stx (diarrhée, insuffisance rénale, troubles neurologiques) chez l'homme s'explique par la répartition large des récepteurs Gb3 dans différents tissus (endothélium vasculaire, colon, parenchyme rénal, SNC) et au passage dans la circulation sanguine des toxines. La figure I.4 illustre la diffusion des toxines Stx dans l'organisme humain.

Fig. I.4 : Diffusion des toxines Stx chez le patient



Les bactéries potentiellement pathogènes sont ingérées par les veaux et les autres ruminants (1) et colonisent le tractus intestinal, sans toutefois causer de maladie. Les bactéries sont excrétées par les fèces et contaminent ainsi l'environnement, dont l'eau potable et les cours d'eau pour la baignade (2). Il peut également y avoir une contamination de divers aliments tels que des fruits, des légumes (notamment les

choux de Bruxelles et la laitue), du lait cru et des jus (3). La carcasse de l'animal peut aussi être contaminée lors de l'abattage. La bactérie peut ainsi se retrouver dans la viande hachée. Les personnes en contact direct avec l'animal, dont celles travaillant dans les fermes ou les abattoirs, peuvent également être contaminées par la bactérie (4). Finalement, la transmission de la bactérie peut aussi se faire entre personnes (5). Chez l'humain, ces bactéries colonisent généralement le gros intestin et causent des lésions d'attachement et d'effacement semblables à celles décrites pour les EPEC (6). Les bactéries produisent leur propre récepteur spécifique qui est injecté dans la cellule épithéliale hôte par le moyen d'une seringue moléculaire. Une adhésine bactérienne produit ensuite un attachement intime entre la bactérie et les récepteurs de la cellule. Les signaux de la bactérie stimulent l'effacement des microvillosités, ou des bordures en brosse, et la réorganisation du cytosquelette de la cellule. La bactérie adhérente produit alors une toxine qui est transportée à travers les cellules épithéliales jusqu'à la circulation sanguine (7). Cette toxine agit sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, provoquant une diarrhée, pouvant être sanguinolente ou non, et des crampes abdominales (8). En complication, un syndrome urémique hémolytique est également possible, pouvant entraîner une insuffisance rénale, particulièrement chez les enfants.

1.2. Importance du réservoir bovin des STEC

Les EHEC sont les principaux *E. coli* pathogènes à caractère zoonotique (Riley, Remis et al. 1983). En effet, les STEC colonisent le tube digestif des animaux, et bien que des STEC aient été isolés chez d'autres espèces animales, telles que le pigeon (Schmidt and Hensel 2004), le cheval, certains primates non humains (Bauwens, De Meurichy et al. 2000), le cochon (Gannon and Gyles 1990) et le mouton (Ramachandran, Hornitzky et al. 2001), les bovins constituent un réservoir majeur, sinon le réservoir principal, des STEC (Caprioli, Morabito et al. 2005). Ce réservoir bovin s'intègre à l'évidence plus largement dans celui constitué par les ruminants domestiques, qui inclut en particulier l'espèce ovine. Ainsi, la forte prévalence de

certaines gènes stx, dont le gène stx2d chez des *E. coli* isolés de moutons sains, et la mise en évidence d'isolats humains des mêmes sérotypes, suggère que le mouton puisse être un réservoir plus spécifique de ces STEC stx2d+. Plusieurs épisodes d'épidémies associées à des STEC d'origine ovine ont d'ailleurs été rapportés dans le monde, dont un en France en juin 2002 et lié à une souche STEC de sérotype O148:H8 provenant de viande de mouton.

Chez les bovins, l'infection est généralement asymptomatique, et le terme de portage sain apparaît généralement plus adapté que celui d'infection. En effet, les récepteurs vasculaires Gb3, spécifiques de la majorité des toxines Stx, étant absent de l'iléum et du gros intestin des bovins, ces derniers ne sont pas affectés comme peut l'être l'homme (Pruimboom-Brees, Morgan et al. 2000). La muqueuse de la jonction recto-anale serait le site de colonisation préférentiel chez les bovins (Grauke, Kudva et al. 2002; Naylor, Low et al. 2003). Toutefois, chez des veaux sevrés, des diarrhées modérées et transitoires semblent avoir été reliées à une infection par des STEC (Pruimboom-Brees, Morgan et al. 2000).

1.3.1. Disponibilité et qualité des données de prévalence du portage et de l'excrétion des STEC chez les bovins

De très nombreuses études ont visé à déterminer la prévalence des STEC chez les bovins, mais en raison de différences de méthodologie et d'échantillonnage, il est largement peu aisé d'en comparer les résultats (Gyles 2006). A titre d'exemple, chez des bovins destinés à la production de viande, la prévalence des STEC O157 a pu être estimée à hauteur de 0,3 à 19,7% des animaux pour les troupeaux destinés à l'engraissement et de 0,7 à 27,3% pour ceux maintenus au pâturage (Hussein 2006). Pour les STEC non-O157, les prévalences étaient, dans cette étude, respectivement de 4,6 à 55,9% et de 4,7 à 44,8% (Hussein 2006). En élevage laitier, les proportions d'animaux excréteurs de STEC O157 et non O157 ont pu être estimées à hauteur de 0,2 à 48,8%, et de 0,4 à 74% des animaux, respectivement (Hussein and Sakuma 2005). S'agissant de bovins à viande, ces proportions ont été estimées à hauteur de

0,2 à 27,8% et de 2,1 à 70,1%, respectivement (Hussein and Bollinger 2005). L'ensemble de ces résultats est présenté tableau I.2.

Tableau I.2 : Prévalence des STEC

Bovins	STEC O157	STEC non-O157	référence
pour l'engraissement	0,3 à 19,7%	4,6 à 55,9%	Hussein 2006
en pâturage	0,7 à 27,3%	4,7 à 44,8%	
bovins laitiers	0,2 à 48,8%	0,4 à 74%	Hussein and Sakuma 2005
bovins à viande	0,2 à 27,8%	2,1 à 70,1%	Hussein and Bollinger 2005

La durée de l'excrétion fécale chez les bovins semble également variable, d'une semaine à plus d'un an (Grauke, Kudva et al. 2002), un mois représentant une durée moyenne retrouvée dans plusieurs études (Besser, Hancock et al. 1997; Sanderson, Besser et al. 1999; Grauke, Kudva et al. 2002).

La quantité de STEC excrétée par les bovins, élément de l'exposition au danger, peut constituer aussi un facteur de risque important d'infection de l'homme (Hussein 2006). A nouveau, et à titre d'exemple, la quantité de STEC retrouvée dans les fèces varie grandement d'un animal à un autre, allant, par exemple, de 10^2 à 10^5 UFC d'*E. coli* O157:H7/g de fèces sèches d'après Zhao *et al.* (Zhao, Doyle et al. 1995). L'existence d'animaux "super excréteurs" au sein des troupeaux a également été décrite, favorisant la persistance et la contamination de l'environnement par les STEC. En effet, certains bovins auraient un potentiel de diffusion des STEC plus élevé que leurs congénères, en raison d'une persistance de l'excrétion fécale, de l'excrétion de plus grandes quantités d'*E. coli* O157:H7 ($>10^4$ UFC/g de fèces sèches) ou d'une combinaison de ces différents facteurs (Callaway, Anderson et al. 2004). Ogden *et al.* ont montré que des animaux "super excréteurs", bien que ne représentant qu'une faible proportion des bovins testés (9%), sont responsables de la plus grande partie des isollements de STEC (96%) (Ogden, MacRae et al. 2004). Cobbold *et al.* ont

étudié l'impact de la présence d'animaux "super excréteurs" au sein de groupes de bovins (Cobbold, Hancock et al. 2007). Ils ont montré qu'en présence de "super excréteurs", le niveau d'excrétion fécale et de colonisation intestinale est plus important chez les bovins parqués en présence, plutôt qu'en absence, de "super excréteurs" dans un groupe. Ces "super excréteurs" représenteraient donc un facteur favorisant la contamination et la persistance des STEC au sein des élevages.

Au final, si l'importance du réservoir bovin des STEC n'est pas contestée, elle apparaît se fonder principalement sur différents éléments indirects, tels que la fréquence d'association entre pathologie humaine à EHEC et origine animale de l'aliment incriminé, ou la grande facilité d'isolement bactériologique de STEC à partir de prélèvements d'origine bovine. Au plan épidémiologique, il apparaît au contraire que les données de prévalence sont très généralement contrariées par la faiblesse et la multiplicité des approches méthodologiques, conduisant à une variabilité des résultats dont il est difficile d'extraire une vision affinée et fiable. Il en résulte qu'on peut raisonnablement considérer qu'à ce jour, le portage et l'excrétion fécale des STEC par les bovins reste largement mal quantifiée.

1.3.2. Facteurs d'impact sur le portage et le niveau d'excrétion des STEC par les bovins

En revanche, si les données épidémiologiques de portage et d'excrétion fécale sont fragmentaires et difficilement comparables, plusieurs démarches expérimentales visant à identifier les facteurs pouvant favoriser ou défavoriser le portage bovin et l'excrétion fécale ont été conduites. A ce jour, plusieurs facteurs d'impact semblent avoir été identifiés, qui incluent les pratiques d'élevage (regroupement des animaux, usage d'antibiotiques), le stress subi par les animaux (transport, parturition, parasitisme), l'âge des animaux, leur alimentation et la nature des souches STEC concernées.

1.3.2.1. *Rôle de la physiologie digestive et de l'alimentation*

Dans une étude d'infection expérimentale de veaux non sevrés et de bovins adultes avec une souche d'*E. coli* O157:H7 (Cray and Moon 1995), l'excrétion fécale de STEC est apparue varier largement au sein des animaux d'une même cohorte d'âge, mais elle est significativement plus importante chez les veaux que chez les bovins adultes. De plus, elle persiste plus longtemps chez les jeunes par rapport aux adultes. Une autre étude a permis de montrer que l'excrétion fécale augmenterait nettement après le sevrage chez les veaux entre 2 et 8 mois par rapport aux veaux non sevrés et aux bovins adultes (Caprioli, Morabito et al. 2005). Le colostrum de la mère pourrait, en revanche, jouer un rôle protecteur chez les veaux non sevrés.

De façon complémentaire à ces résultats, une étude de Rasmussen *et al.* montre que les différences d'excrétion fécale observées entre jeunes et adultes pourraient être dues, au moins en partie, au niveau de maturation du système digestif. En effet, le compartiment pré-stomacal des adultes (rumen), caractérisé par un pH faible et une forte concentration en acides gras hyper volatils (VFA), contribuerait à inhiber (ou limiter) la multiplication des *E. coli* O157:H7 (Rasmussen, Cray et al. 1993). D'après Grauke *et al.*, la persistance d'*E. coli* O157:H7 chez les bovins dépendrait, en fait, de sa capacité à survivre dans la partie postérieure de l'intestin et non dans le rumen (Grauke, Kudva et al. 2002). Cobbold *et al.* ont également mis en évidence qu'une alimentation de faible pH, riche en VFA et en lactate, entraînait une plus faible colonisation de la muqueuse intestinale par les STEC (Cobbold and Desmarchelier 2004). Ce point reste controversé puisque d'autres auteurs ne remarquent, en revanche, pas d'effet de la diète – qui entraîne une augmentation du pH et une diminution de la concentration ruminale en VFA - sur le taux digestif des STEC (Harmon, Brown et al. 1999).

Plusieurs études ont tenté de comparer l'effet de divers types d'alimentations sur le portage et l'excrétion fécale. Les acides phénoliques contenus dans les plantes fourragères ainsi que certaines préparations de graines (Jacob, Fox et al. 2008) joueraient un rôle bénéfique sur la diminution de l'excrétion fécale d'*E. coli* O157:H7.

Outre le type d'alimentation, le fait de favoriser une compétition exclusive en ajoutant des bactéries exogènes non pathogènes au tractus intestinal des bovins ou en favorisant le développement de bactéries commensales permet de réduire la colonisation et/ou le nombre de bactéries pathogènes (Callaway, Anderson et al. 2004). Ainsi, les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques, existant naturellement dans la flore microbienne bovine, pourraient avoir un effet probiotique inhibant la prolifération des STEC au niveau du tractus digestif des bovins réduisant ainsi le portage des STEC (Gough, Conlan et al. 2006).

1.3.2.2. *Rôle des conditions d'élevage et de l'environnement*

Les conditions d'élevage, et en premier lieu le niveau général d'hygiène et la promiscuité des animaux, semblent affecter également la persistance des STEC chez les bovins (Fairbrother and Nadeau 2006). La prévalence de l'excrétion fécale de STEC O157:H7 chez les bovins à l'engraissement et maintenus dans des enclos au sol humide et boueux est supérieure à celle de bovins élevés dans des enclos bien entretenus avec un sol sec (Smith, Blackford et al. 2001). Les abreuvoirs sont également un réservoir environnemental de STEC et source de contamination et de recontamination des bovins (Callaway, Anderson et al. 2004). Le cas particulier détaillé plus haut d'animaux "super excréteurs" au sein du troupeau, peut enfin constituer un facteur zootechnique additionnel aux conditions strictes d'élevage.

Par ailleurs, dans une étude récente, la proportion de fermes laitières françaises contaminées par les STEC serait estimée à 20% (Fremaux, Raynaud et al. 2006), à comparer avec les taux de 14,1% pour les Etats Unis (Rahn, Renwick et al. 1997) et et 4,1% pour l'Australie (Cobbold and Desmarchelier 2000). Mais encore une fois, du fait de la diversité des protocoles d'isolements bactériens, des pratiques d'élevage par pays et de nombreux autres facteurs, la significativité de la comparaison entre études reste faible. L'étude française souligne le rôle potentiel joué par les pis et mamelons chez les vaches comme sources de contamination et de recontamination des bovins laitiers, avec un risque important de contamination du lait (Fremaux, Raynaud et al.

2006). Egalement, Fukushima *et al.* ont mis en évidence une survie de 1 à 8 semaines dans des fèces de bovins à 15°C de STEC O157, O26 et O111 (Fukushima, Hoshina et al. 1999). Quant à la détection des STEC dans les eaux de surface, les difficultés techniques (méthodologie laborieuse, longue et peu fiable) semblent responsables du peu d'informations disponibles sur cette source de contamination (Heijnen and Medema 2006).

1.3.2.3. *Rôle de la diversité des souches de STEC bovines*

Widiasih *et al.* ont mesuré la durée et la magnitude de l'excrétion fécale de STEC de sérogroupes O157 et O26 chez des veaux d'élevage japonais naturellement infectés (Widiasih, Ido et al. 2004). Ils ont constaté que la durée et l'importance de l'excrétion fécale dépendaient du séro groupe des souches testées, les STEC de serogroupe O157 étant excrétés plus longtemps (1 à 10 semaines *versus* 1 à 3 semaines) et en plus grande quantité (4 à >110000 CFU *versus* 3 à 2400 CFU) que les STEC de séro groupe O26. Dans les élevages testés, l'infection par les STEC O157 semble également persistante tandis que celle par les STEC O26 est transitoire.

1.3.2.4. *Rôle de la saisonnalité du portage bovin*

Chez l'homme, un effet de saisonnalité a été observé, la plupart des infections humaines à *E. coli* O157:H7 étant rapportées de mai à novembre (Fairbrother and Nadeau 2006). On peut se demander si cet effet peut être lié à une différence de portage ou d'excrétion fécale des STEC chez les bovins en période estivale. Même si plusieurs études mettent en évidence une augmentation de l'excrétion fécale en été (Chapman, Siddons et al. 1997; Hancock, Besser et al. 1997; Bonardi, Maggi et al. 1999; Van Donkersgoed, Graham et al. 1999; Hancock, Besser et al. 2001), d'autres observent une augmentation hivernale (Synge, Chase-Topping et al. 2003; Ogden, MacRae et al. 2004), voire n'observent pas de pic saisonnier (Alam and Zurek 2006). Les différences observées selon les études pourraient être dues à des facteurs climatiques, lieux de prélèvement (en élevage ou à l'abattoir), le type de bovins

(laitiers, à viande) et leur âge (adultes ou veau) et/ou des pratiques d'élevage différant selon les pays où ces études ont été réalisées.

1.4. Principales voies d'infections humaines à EHEC

La transmission des EHEC à l'homme survient par 4 voies principales : les aliments, l'eau de boisson ou de baignade, le contact de personne à personne et le contact avec les animaux infectés.

1.5.1. Voie alimentaire

Il s'agit de la principale source de contamination humaine et elle représente près de la moitié des épidémies à STEC (Fairbrother and Nadeau 2006). Les pathogènes sont généralement introduits dans la chaîne alimentaire par contamination des carcasses au cours du processus d'abattage, ou éventuellement au cours des étapes ultérieures de transformation de la viande. L'origine de la contamination peut être liée, par exemple, à une rupture accidentelle de la paroi ruminale avant éviscération, conduisant à une mise en contact des germes digestifs avec la viande. Ces pathogènes sont alors retrouvés dans les produits carnés qui, en cas de cuisson insuffisante de la viande, ne sont pas détruits par la chaleur et peuvent alors infecter le consommateur (Riley, Remis et al. 1983; Hussein and Sakuma 2005). D'autres aliments que les produits carnés peuvent être contaminés et responsables d'infections humaines, tels que le lait et les produits laitiers non pasteurisés, possiblement souillés à partir de matières fécales au cours de la traite (Morgan, Newman et al. 1993). Les fruits et légumes crus peuvent également être source d'infection pour l'homme, après avoir été contaminés par diverses souillures environnementales, telle que l'eau d'irrigation.

1.5.2. Transmission par l'eau

Elle se fait par l'ingestion d'eau de boisson ou de baignade. Aux États Unis, entre 1997 et 2004, près de 10% des épidémies étaient d'origine hydrique. L'eau de boisson peut provenir de sources privées ou d'eau de distribution non traitée, et est plus souvent impliquée dans des cas d'infections sporadiques. Toutefois, des cas d'épidémies ont également été rapportés, comme celle de forte gravité (2300 cas dont 7 mortels) reliée à la consommation d'eau de boisson souillée par des fèces contaminées par *E. coli* O157:H7 en mai 2000 au Canada (Hrudey, Payment et al. 2003). L'ingestion d'eau de baignade dans des étendues d'eau naturelles ou de piscine est, elle, plus souvent rapportée dans les cas d'épidémies que lors d'épisodes sporadiques.

1.5.3. Transmission inter-humaine

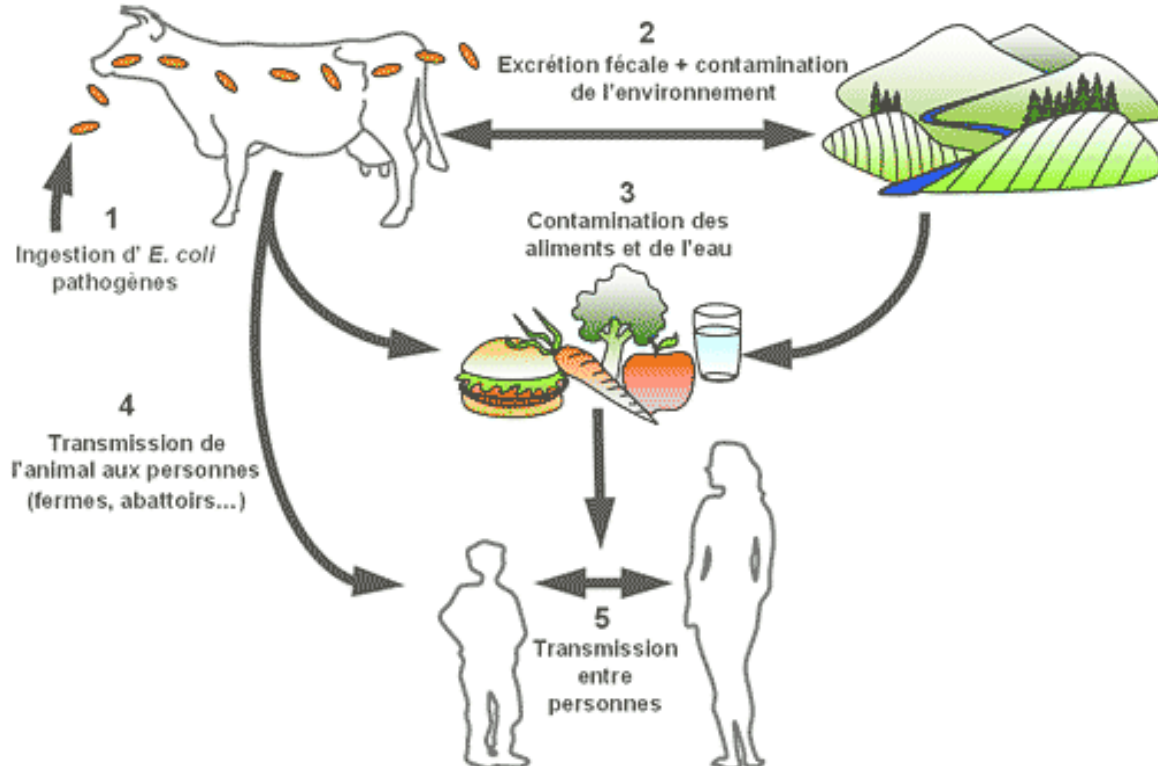
Dans la majorité des cas de transmission inter-humaine, la contamination se fait entre malades au sein des établissements de soins ou des centres de rassemblements (crèches d'enfants, ...). La transmission par voie oro-fécale est alors prédominante, et généralement liée à un non respect des mesures d'hygiène de base (Fairbrother and Nadeau 2006). La durée moyenne du portage de la souche pathogène chez le patient, qui peut correspondre à la fenêtre de son statut contaminant, est estimée à 13 jours pour les colites hémorragiques et jusqu'à 2 mois pour les SHU (Panos, Betsi et al. 2006).

1.5.4. Contact avec les animaux porteurs

La contamination se fait généralement par contact direct avec les animaux de ferme et/ou leurs déjections. Le taux de porteurs sains est d'ailleurs plus élevé dans la population en contact permanent avec les animaux (Crump, Sulka et al. 2002). La contamination par les déjections des animaux a pu être largement documentée lors d'épidémies survenues au cours de festivals ou de campements d'adolescents (Varma, Greene et al. 2003; Durso, Reynolds et al. 2005). Dans ces cas de

transmission directe à partir de l'animal, la maladie peut tout autant s'exprimer sous une forme sporadique que sous une forme épidémique (Caprioli, Morabito et al. 2005). Les principales voies de transmission et leurs interactions sont représentées fig. I.5.

Fig. I.5 : Les principales voies de transmission des EHEC et leurs interactions



2. Définition, déterminisme et variabilité de la virulence des souches STEC pour l'homme (EHEC)

Au plan clinique, il est à ce jour classique de distinguer 2 types d'EHEC, les HI-STEC (pour "HUS-Inducing", induisant des SHU) et les DI-STEC (pour "Diarrhea-Inducing", induisant des diarrhées). Par contraste, les LP-STEC (pour "Low-Pathogenic", faiblement pathogénique, terme introduit au congrès EU-ENTERNET de septembre

2006 à Prague (Orth and Wurzner 2006)), comprennent des STEC n'ayant pas été impliqués dans des pathologies graves, contrairement aux HI-STECS et aux DI-STECS.

Ainsi, les diverses classifications utilisées au cours du temps montrent bien la complexité d'attribuer un niveau de virulence à une souche STEC donnée, selon les différents paramètres pris en compte pour le définir (gravité clinique, nature des gènes de virulence détectés, ...). La question de la nature des critères d'identification et de caractérisation d'une souche STEC potentiellement dangereuse pour l'homme reste donc pleinement d'actualité.

Au plan moléculaire, de nombreux gènes impliqués dans la virulence de ces germes sont connus, mais leur présence simultanée chez une souche n'est, à l'évidence, pas suffisante pour que celle-ci induise des pathologies graves. A ce titre, la simple détection de gènes de virulence chez une souche ne préjuge pas nécessairement de leur expression protéique. A l'inverse, certaines souches de virulence clinique avérée ne possèdent pas l'ensemble des gènes de virulence « attendus », comme, par exemple, le gène *eae*, qui code une protéine impliquée dans le phénotype d'attachement/effacement (intimine), et qui n'est pas systématiquement présent chez les souches cliniques humaines (Paton, Woodrow et al. 1999). Enfin, il est également connu que les différents types de toxines Stx ne sont pas associés aux mêmes niveaux de virulence, la toxine Stx2 étant plus souvent associée à des pathologies graves que ne l'est la toxine Stx1 seule ou en association avec Stx2 (Boerlin, McEwen et al. 1999); Donohue-Rolfe, Kondova et al. 2000).

2.1. Définitions actuelles de la virulence des EHEC

La virulence d'une souche pathogène implique une interaction délétère pour l'hôte liée à l'expression d'un ensemble de gènes bactériens, dans un contexte lié à l'organisme infecté et favorable à leur expression (Brown, Wickham et al. 2006).

Tableau I.3 : Les marqueurs de virulence des STEC et leur localisation

Localisation	Gènes	Protéines	Fonction/rôle
Prophages	stx	Stx	Toxine, principal facteur de virulence des STEC
Région chromosomique PAI LEE (5 opérons majeurs)	eae	Intimine	Adhésine intervenant dans le phénotype A/E
	tir	"Translocated Intimin Receptor"	Récepteur de l'intimine
	esc et sep	Translocateurs	Système de translocation des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte (TTSS)
	esp A, B (et D)	Effecteurs	Interviennent dans la cascade de signalisation induisant la formation du piédestal d'actine dans les lésions A/E
Plasmide	ehxA	Entérohémolysine	Lyse des hématies libérant du fer
	katP	Catalase-peroxydase	Enzymatique
Chromosomique	région rfb	Nécessaire à la synthèse de l'antigène O157	Chaîne polysaccharidique du LPS spécifique du séro groupe E. coli O157
Chromosomique	espP	Sérine protéase	Clive chez l'homme le facteur de coagulation V
Chromosomique	astA	Entérotoxine EAST1	Rôle probable dans l'initiation de la diarrhée aqueuse

Ces facteurs de virulence peuvent même, dans les définitions les plus larges, être inclus à l'ensemble de tous les facteurs conditionnant la survie et la prolifération des bactéries chez leurs hôtes, et regroupés sous l'appellation plus large de gènes de "fitness" (Brussow, Canchaya et al. 2004). Certains facteurs favorisent une augmentation de la tolérance aux environnements à pH acide en réponse à l'exposition à un environnement faiblement acide. De la même manière, des sidérophores et des facteurs impliqués dans une meilleure métabolisation du fer (*fur...*) peuvent favoriser la virulence de ces souches hémolytiques. Les marqueurs de virulence ainsi que leur localisation génétique sont indiqués dans le tableau I.3.

2.2. Les facteurs de virulence

La production des toxines Stx est le facteur essentiel de la pathogénicité des STEC, mais d'autres facteurs de virulence sont également présents chez les souches virulentes (HI- et DI-EHEC) (Caprioli, Morabito et al. 2005). Généralement, les souches pathogènes expriment aussi les gènes induisant un phénotype d'attachement/effacement et le gène de l'entérohémolysine (Karch, Schmidt et al. 1999).

Les principales différences génomiques entre les souches d'*E. coli* commensales et les souches EHEC sont attribuées aux séquences portés par des éléments génétiques mobiles, tels que les prophages (gènes *stx*), les plasmides (gène codant l'entérohémolysine), les îlots de pathogénicité (PAI) (gènes codant les protéines *eae*, *espA*, *espB* et *espD*...) (Brussow, Canchaya et al. 2004). Le transfert horizontal de matériel génétique aurait notamment présidé à l'acquisition des éléments génétiques exogènes porteurs du locus d'attachement/effacement et des gènes *stx*, deux étapes cruciales de l'évolution d'*E. coli* 0157 à partir d'un ancêtre à caractère commensal (Reid, Herbelin et al. 2000).

2.2.1. Les gènes *stx1*, *stx2* et leurs variants

Les toxines Stx sont considérées comme le principal facteur de virulence des EHEC (Caprioli, Morabito et al. 2005). Les gènes *stx* sont des gènes portés par des prophages lambdaïdes, et qui ne sont pas nécessaires au cycle viral des phages, mais sont plutôt considérés comme des séquences additionnelles d'ADN (Brussow, Canchaya et al. 2004). En revanche, la plupart d'entre eux sont des facteurs de virulence putatifs voire confirmés.

On distingue deux groupes de shiga toxines : les toxines de type Stx1, ne différant de la toxine Stx de *S. dysentéris* type 1 que par un seul acide aminé (Kozlov Yu, Kabishev et al. 1988; Strockbine, Jackson et al. 1988) et les toxines de type Stx2 présentant une similarité de séquence des acides aminés de 56% par rapport aux

toxines Stx1. La notion de groupe est liée à l'existence de nombreux variants de ces deux types de toxines, principalement pour le groupe Stx2 d'ailleurs. Plus d'une vingtaine de variants de Stx ont en effet été isolés à ce jour (Hussein and Sakuma 2005).

Les variants des gènes *stx1* (*stx1c*, *stx1d*) sont très proches dans leurs séquences et spécificités d'hôte, contrairement aux principaux variants de *stx2* (*stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) (Orth and Wurzner 2006). Ainsi, les variants *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* et *stx2f* présentent, au niveau de leurs séquences nucléotidiques respectives, 99,7%, 94,9%, 94% et 63,4% d'homologie pour la sous-unité A et 95,2%, 86,6%, 79% et 75,4% pour la sous-unité B, avec les gènes des sous-unités de Stx2 correspondantes (Friedrich, Bielaszewska et al. 2002). Les variants *stx2c* et *stx2d* ont été retrouvés chez l'homme, tandis que le variant *stx2e* est généralement associé à une pathologie porcine, l'œdème du porc, et n'est que très rarement isolé chez l'homme (Weinstein, Jackson et al. 1988; Gannon and Gyles 1990; Franke, Harmsen et al. 1995). La spécificité d'hôte des souches exprimant le gène *stx2e* s'explique probablement par le fait que la protéine Stx2e a une plus forte affinité pour le récepteur cellulaire Gb4 (exprimé chez le porc) que pour le récepteur Gb3, qui est le récepteur de Stx2 et de ses autres variants. Quant au variant du gène *stx2f*, il a été identifié chez des pigeons (Schmidt, Scheef et al. 2000).

2.2.1.1. 2.2.1.1. *La virulence d'un STEC dépend du ou des variants Stx exprimé(s)*

Les gènes codant Stx2 et les variants Stx2c et Stx2d_{activable} (variant Stx2d activable par l'élastase) sont plus souvent retrouvés dans les isolats cliniques de patients développant des pathologies graves (colite hémorragique, SHU, PTT) par rapport à ceux codant Stx1 et ses variants (Friedrich, Bielaszewska et al. 2002; Panos, Betsi et al. 2006). Ce résultat est en corrélation avec les niveaux de cytotoxicité observés *in vitro*, la cytotoxicité de Stx2 sur des cellules endothéliales rénales humaines étant 1000 fois supérieure à celle de Stx1 (Louise and Obrig 1995). Comme les souches possédant le gène *stx1*, celles codant Stx2d (Pierard, Muyldermans et al. 1998) ou

Stx2e sont également moins virulentes (Friedrich, Bielaszewska et al. 2002). De plus, Stx2e, tout comme Stx2d, sont généralement associées à des pathologies modérées, voire à un portage asymptomatique (Friedrich, Bielaszewska et al. 2002). Par RFLP PCR, Piérard *et al.* ont caractérisé les toxines produites par 359 souches de STEC isolées chez l'homme et chez l'animal, et montré que celles exprimant Stx2d sont moins souvent associées à des diarrhées ou des SHU (Pierard, Muyltermans et al. 1998). Des différences entre Stx2 et Stx1 au niveau du site actif de la sous unité A, de l'orientation de la sous unité A par rapport aux sous unités B et des sites de liaison de la sous unité B, ont également été mises en évidence par cristallographie. Ces différences pourraient, en partie, expliquer leur différence de virulence.

2.2.1.2. 2.2.1.2. *L'activation de Stx2d par l'élastase*

Une différence notable entre les toxines Stx2 et Stx2c d'une part, et Stx2d_{activable} d'autre part, est la substitution, chez cette dernière et au niveau de la sous-unité A, de 2 acides aminés (AA) (Phe291 et Lys297, substitués en Ser291 et Glu297). Ces différences conduisent à ce que, contrairement à Stx2 ou Stx2c, Stx2d_{activable} est activable par clivage du peptide A2. En effet, les résidus Ser291 et Glu297 appartiennent à un motif de reconnaissance pour l'élastase, enzyme présente dans le mucus intestinal. Cette enzyme clive la liaison peptidique reliant les AA Thr295 et Gly296. Le peptide A2 ainsi raccourci de 2 résidus AA interagit avec le pentamère de sous-unités B, produisant le phénotype activable (Kokai-Kun, Melton-Celsa et al. 2000; Melton-Celsa, Kokai-Kun et al. 2002). La cytotoxicité sur cellules Vero de Stx2d activée augmente d'un facteur 10 à 1000 quand la toxine est incubée avec du mucus d'intestin grêle de souris, dont l'élastase présente une forte homologie avec l'élastase humaine IIIB (Melton-Celsa, Kokai-Kun et al. 2002).

2.2.2. Les facteurs de virulence du PAI LEE

Généralement intégré à côté des *loci* pour les gènes de tRNA *selC*, *pheU* ou *pheV* (Schmidt, Zhang et al. 2001)(Zhang, Kohler et al. 2002), le PAI LEE comprend 3 modules fonctionnels codant le TTSS, les protéines effectrices EspA, B et D et

l'adhésine intimine (*eae*) et son récepteur Tir (pour "Translocated Intimin Receptor") (Caprioli, Morabito et al. 2005). L'expression des gènes du PAI LEE, responsables du phénotype d'attachement/effacement, est régulée par des facteurs environnementaux tels que la température, l'osmolarité et le quorum sensing (Lio and Syu 2004).

2.2.2.1. *Le phénotype d'attachement/effacement*

La plupart des EHEC colonisent la muqueuse intestinale *via* un mécanisme qui perturbe le fonctionnement normal des cellules épithéliales. Au niveau cellulaire, on observe la formation de lésions typiques dites d'attachement/effacement (A/E) (retrouvées aussi chez les EPEC) et visualisables sur des coupes histologiques de villosités intestinales (Frankel, Phillips et al. 1998). Ces lésions A/E se caractérisent par la destruction des microvillosités à bordure en brosse *via* la restructuration du cytosquelette sous-jacent par transduction de signal entre la bactérie et les cellules hôtes, l'adhésion intime de la bactérie à l'épithélium intestinal, la formation de piédestaux et l'agrégation d'actine polymérisée au site d'attachement bactérien (Moon, Baetz et al. 1983; Blanco, Schumacher et al. 2005). Les réarrangements du cytosquelette des cellules hôtes impliquant le recrutement de nombreux filaments d'actine sous la bactérie, le phénotype A/E est visualisable par la technique de FAS ("Fluorescent Actin Staining") (Knutton, Baldwin et al. 1989).

2.2.2.2. *Les gènes du système de sécrétion de type III*

Il s'agit d'un complexe composé de plus de 20 protéines qui agit comme une seringue moléculaire injectant des protéines effectrices du cytosol bactérien vers le cytoplasme de la cellule hôte à laquelle la bactérie adhère (Cornelis and Van Gijsegem 2000; Cornelis 2002). Parmi les gènes du TTSS, les mieux connus sont les gènes *esc*, *sep* (Perna, Mayhew et al. 1998). Le TTSS permet la libération dans le cytoplasme des cellules cibles de nombreuses protéines impliquées dans la pathogénicité des STEC, tels que les effecteurs Tir (qui permet l'adhésion cellulaire *via* l'intimine), Map, EspF, EspG et EspH (Caprioli, Morabito et al. 2005) et certains translocateurs comme IpaB

et SipB, des caspase-1 induisant l'apoptose, EspB et YopD (Cornelis and Van Gijsegem 2000; Cornelis 2002).

2.2.2.3. *Les gènes eae et tir*

L'intimine codée par le gène *eae* est une protéine de la membrane externe impliquée dans l'adhésion intime caractéristique des lésions A/E. Il existe au moins 17 variants de l'intimine (Tarr and Whittam 2002; Blanco, Blanco et al. 2004; Blanco, Schumacher et al. 2005) codés par des gènes *eae* se distinguant surtout par leurs régions 3', codant la région C-terminale de la protéine impliquée dans la liaison au récepteur Tir (Blanco, Schumacher et al. 2005). Cette hétérogénéité des variants serait responsable du tropisme cellulaire et de la spécificité d'hôte (Trabulsi, Keller et al. 2002; Mundy, Schuller et al. 2007).

Par exemple, l'intimine γ (gamma) restreint la colonisation à l'épithélium associé aux follicules des plaques de Peyer (Fitzhenry, Pickard et al. 2002), tandis que les intimines α (alpha) et β (beta) permettent de coloniser l'intestin grêle (Mundy, Schuller et al. 2007). D'après Zhang *et al.*, certains variants comme les intimines θ (thêta) η (netha) ι (iota) et κ (kappa) sont rarement retrouvées dans les souches isolées de selles de patients (Zhang, Kohler et al. 2002). D'autres, comme les intimines γ 1 et ϵ (epsilon), sont fréquemment associées aux souches humaines (Fitzhenry, Pickard et al. 2002; Gyles 2006).

Le récepteur de l'intimine, Tir, est injecté dans la cellule hôte *via* le TTSS, puis il est incorporé à la membrane plasmique où il interagit avec l'intimine incorporée à la membrane externe de la bactérie (Swimm and Kalman 2008). Cette interaction entraîne une cascade de transduction du signal impliquant l'intervention de tyrosine kinases et induisant les réarrangements du cytosquelette nécessaires à la formation des piédestaux d'actine. De plus, la présence de *eae* et/ou *tir* serait impliquée dans la survie des souches dans la jonction recto-anale des bovins (Sheng, Lim et al. 2006).

2.2.2.4. *Les gènes espA, espB et espD*

Les protéines effectrices EspA, EspB et EspD pénètrent, grâce au TTSS, dans le cytosol des cellules cibles où elles interviennent dans la cascade de transduction du signal aboutissant à la formation des piédestaux d'actine (Frankel, Phillips et al. 1998; Caprioli, Morabito et al. 2005).

2.2.2.5. *Cas des souches EHEC LEE- et autres facteurs d'adhésion*

Bien que les gènes du PAI LEE soient souvent mis en évidence chez les souches EHEC, leur présence n'est pas systématique. En Australie, par exemple, les STEC ne possédant pas de LEE sont la cause majeure de SHU et de diarrhées sanglantes (Gough, Conlan et al. 2006).

En effet, les EHEC LEE- (aussi appelés EHEC *eaē* en raison de l'importance de ce gène dans le phénotype A/E), ont été impliqués dans des cas sporadiques et des épidémies de faible envergure de colites hémorragiques et de SHU (Paton, Woodrow et al. 1999; Luck, Bennett-Wood et al. 2005). Parmi ces souches, on retrouve les sérotypes O113:H21 et O91:H21 appartenant au sérovar C.

Plusieurs équipes ont isolé des souches O113:H21 *eaē* capables d'adhérer à des cellules épithéliales intestinales humaines (lignées Henle 407 et HEP-2) *in vitro* (Paton, Woodrow et al. 1999; Dytoc, Ismaili et al. 1994). Luck *et al.* ont même pu mettre en évidence une invasion de cellules de lignées clonales humaines (HCT-8 et Caco-2) qui impliquerait des gènes chromosomiques, dont un homologue de *ipaC* (codant une invasine) (Luck, Bennett-Wood et al. 2005). Par ailleurs, Paton *et al.* ont identifié un facteur d'adhésion putatif, *saa* ("STEC Autoagglutinating Adhesin"), qui serait responsable de l'adhésion cellulaire des souches O113:H21 testées dans leur étude (Paton, Srimanote et al. 2001).

Il existe au moins 16 adhésines fimbriales ainsi que des adhésines non-fimbriales chez les EHEC O157:H7 (Low, Holden et al. 2006; Gyles 2006). De nombreux autres

facteurs dont ToxB, Sfp, Iha, Efa1/LifA, OmpA et LPF joueraient également un rôle dans l'adhésion cellulaire en présence et/ou en absence du PAI LEE (Caprioli, Morabito et al. 2005; Hussein and Bollinger 2005; Gyles 2006).

L'adhérence sur cellules CHO d'une souche *E. coli* O111:H- exprimant Efa1, est 7 fois supérieure comparée à la même souche mutée pour le gène *efa1* (Morabito, Tozzoli et al. 2003). De plus, Efa1 supprime l'expression de plusieurs cytokines : IL-2, IL-4 et l'interféron γ et inhibe la prolifération des lymphocytes en réponse à une stimulation mitogène (Klapproth, Donnenberg et al. 1995). Homologue des toxines A et B de *Clostridium difficile*, codé par pO157, ToxB participe à la colonisation intestinale en activant l'expression des gènes du TTSS et en inhibant l'activation des lymphocytes de l'hôte (Caprioli, Morabito et al. 2005; Gyles 2006).

Ainsi, le gène *eae*, bien que retrouvé dans une majorité de souches HI-STEC, n'est pas l'unique facteur d'adhésion impliqué dans les cas de SHU. D'autres gènes comme *saa* pourraient bien pallier l'absence du gène *eae* dans la pathogénicité des souches EHEC LEE- (Caprioli, Morabito et al. 2005).

2.2.3. Les facteurs de virulence plasmidiques

Tous les *E. coli* O157:H7 isolés de patients possèderaient le plasmide pO157 (Yoon, Lim et al. 2005). Plusieurs facteurs codés par ce plasmide sont suspectés d'intervenir dans la pathogénicité des EHEC, ainsi que dans la survie et la persistance des STEC chez les bovins et dans l'environnement. Du point de vue du "fitness" bactérien, pO157 comprend le gène *ecf4* dont l'homologue chromosomique, *lpxM*, code une lipide A myristoyl transférase impliquée dans le maintien de la structure et de l'intégrité de la membrane bactérienne *in vivo* et *ex vivo* (Yoon, Lim et al. 2005).

Parmi les facteurs de virulence putatifs de pO157, on trouve l'entérohémolysine E-hlya (*ehxA*), la catalase peroxydase KatP et la sérine protéase EspP, les facteurs (EtpC à EtpO) du système de sécrétion général de type II, l'adhésine toxB et StcE un inhibiteur de l'estérase C1 (Caprioli, Morabito et al. 2005; Yoon, Lim et al. 2005).

Dans la plupart des STEC non-O157, on retrouve des plasmides ressemblant à pO157 (Caprioli, Morabito et al. 2005). Ces plasmides portent généralement l'opéron *hly*, et dans 50% des cas, on retrouve également le système de sécrétion de type II, *katP* et *espP*. D'après Pradel et al., il pourrait exister une association préférentielle entre *eae* et le facteur de virulence plasmidique *KatP*, tant chez les isolats cliniques que bovins (Pradel, Bertin et al. 2008).

2.2.3.1. L'entérohémolysine E-hlyA

Différentes entérohémolysines ont été retrouvées chez les EHEC dont E-hlyA, codée par le gène *ehxA*, provoquant la lyse des érythrocytes. Homologue de l' α -hémolysine d'*E. coli* K12, E-hlyA s'insère dans la membrane cytoplasmique où elle forme des pores ce qui provoque la lyse osmotique des cellules (Pradel, Bertin et al. 2008). Le fer libéré par les érythrocytes favoriserait la prolifération des EHEC. Mais tous les EHEC isolés de patients ne sont pas forcément hémolytiques (Pradel, Bertin et al. 2008).

2.2.3.2. La sérine protéase EspP

La sérine protéase EspP clive le facteur V de la coagulation sanguine et la pepsine A. La dégradation du facteur V favoriserait le développement des colites hémorragiques suite à l'infection par des EHEC (Pradel, Bertin et al. 2008). On retrouve des anticorps dirigés contre EspP dans le sérum d'enfants convalescents suite à une infection à EHEC, mais l'implication exacte de ce facteur dans la pathogénicité n'est pas encore élucidée (Caprioli, Morabito et al. 2005).

2.2.4. Les différents sérotypes d'*E.coli* et leur implication dans les pathologies à STEC

Nonobstant le rôle des toxines Stx et des autres facteurs de virulence des EHEC, l'antigène O157, qui constitue la partie extracellulaire du LPS, aurait un rôle important dans la colonisation des cellules épithéliales de l'intestin. Certains auteurs ont montré

qu'une souche mutante pour l'antigène O157 est 100 fois plus sensible que la souche sauvage, à un peptide dérivé d'une protéine antibactérienne BPI ("Bactericidal Permeability Increasing protein") présentée à la surface des cellules épithéliales de l'intestin. De plus, la colonisation d'intestins de lapereaux est également extrêmement réduite en absence de chaîne métabolique d'expression de l'antigène O157. De manière plus générale, des différences au niveau du LPS existant d'un sérotype à l'autre pourraient être corrélées à des différences de virulence entre sérotypes (Pluschke and Achtman 1984).

Il existe, à ce jour, plus de 170 antigènes O (Gyles 2006) et 56 antigènes H, avec près de 500 sérotypes retrouvés chez l'homme (Bettelheim, Beutin et al. 2003; Beutin, Krause et al. 2004). Des isolats non sérotypables continuent d'être isolés à partir de la nourriture et de fèces d'animaux, ce qui souligne bien l'émergence régulière de nouveaux sérogroupes (Blanco, Padola et al. 2004).

Bien que plus d'une cinquantaine de sérotypes aient été isolés de patients, certains sont plus fréquemment incriminés en cas de pathologies graves, le sérotype O157:H7 étant le plus souvent en cause dans de nombreux pays de l'hémisphère Nord (Gough, Conlan et al. 2006). Dans certains pays, d'autres sérotypes sont plus fréquemment impliqués dans des cas graves comme O26:H11, O111:H- et O157:H- en Australie par exemple (Gough, Conlan et al. 2006).

On distingue ainsi 5 sérotypotypes d'EHEC (Gyles 2006):

- Le groupe A comprend des souches de sérotype O157:H7 et O157:NM.
- Le groupe B est constitué de souches des sérotypes O26:H11, O103:NM, O111:NM, O121:H19 et O145:NM, qui comme les STEC O157, sont responsables de pathologies sévères, mais de manière moins fréquente.
- Le groupe C englobe de nombreux sérotypes généralement associés avec l'antigène flagellaire H21, comme O113:H21 et O91:H21 (Caprioli, Morabito et al. 2005), ces sérotypes n'étant que rarement impliqués dans des cas sporadiques et non dans des épidémies.

- Le groupe D inclus de nombreux sérotypes impliqués dans des cas sporadiques de diarrhées.
- Enfin, le groupe E rassemble les nombreux sérotypes de STEC n'ayant pas été impliqués dans des pathologies humaines.

La très large majorité des STEC O157:H7 possèdent le gène *stx2* et les $\frac{3}{4}$ possèdent également le gène *stx1* (Ostroff, Tarr et al. 1989; Tarr, Neill et al. 1989; Jelacic, Wobbe et al. 2002). La majorité des *E. coli* non-O157:H7 sont *stx1+* et *stx2-* (Karch, Bohm et al. 1993; Koch, Hertwig et al. 2001; Teel, Melton-Celsa et al. 2002). Comme on l'a vu, des sérotypes du sérotypage C sont impliqués dans les cas de pathologies à EHEC LEE- (Luck, Bennett-Wood et al. 2005).

2.3. Variabilité de l'expression des shiga toxines

2.3.1. Activation du cycle lytique et de l'expression de Stx par le système SOS

Les STEC sont des bactéries lysogènes, c'est-à-dire qu'elles portent des phages maintenus quiescents dans le génome bactérien sous forme de prophages (Waldor and Friedman 2005). Lors de l'activation du cycle lytique, le phénotype de la bactérie est modifié par l'expression des gènes viraux (dont les gènes *stx*). Le maintien du cycle lysogène est assuré par des répresseurs viraux se fixant au niveau de sites opérateurs (O_L et O_R) contrôlant les promoteurs des gènes viraux précoces. Cette répression est incomplète car une faible fraction de lysogènes est induite par induction spontanée.

Au cours du cycle lytique, la répression est levée par activation du système SOS. Le système SOS est initié quand l'ADN est endommagé. L'interaction avec cet ADN endommagé active la protéine RecA, qui conduit à l'autoclivage du répresseur CI (Kimmitt, Harwood et al. 2000). Cette dérégulation stoppe temporairement la synthèse d'ADN et la division cellulaire et active un système de réparation de l'ADN

endommagé. Le clivage du répresseur CI est suivi par la transcription des gènes viraux précoces, puis précoces-tardifs (gène *rep* (pour répliation) et le gène codant la protéine N) et enfin tardifs (*stxA*, *stxB* et *lys* (pour gène de lyse)), aboutissant à la production de particules phagiques et à la lyse de la bactérie.

La protéine N agit au niveau du site NUT situé sur les transcrits ARN permettant à la transcription initiée au promoteur PR de se poursuivre au-delà des sites terminateurs situés en amont de *rep* et *Q*. La protéine Q permet la transcription de *stx* et *lys*. Elle modifie l'ARN polymérase au niveau du site *qut* situé en amont du gène *stx*, ce qui permet à l'enzyme de transcrire *stx* puis *lys*, ainsi que d'autres gènes tardifs impliqués dans la production des particules phagiques.

La comparaison de la production de Stx2 par des souches STEC O157:H7 et de souches isogéniques *recA*⁻ a permis de montrer que la mutation de *recA* entraîne la perte de la virulence de ces souches sur la majorité des souris testées (6 décès contre 76 avec *recA*⁺ sur 80 souris testées) et que cette absence de virulence est corrélée avec l'inhibition de l'induction des prophages (Fuchs, Muhldorfer et al. 1999). La trans-complémentation par un gène *recA* cloné dans les bactéries *recA*⁻ restaure la production de particules phagiques et l'effet cytolétal de ces souches sur les souris. Le système SOS et RecA, en particulier, jouent donc un rôle essentiel, non seulement dans l'induction du prophage, mais aussi dans l'expression de Stx (Wagner, Neely et al. 2001).

2.3.2. Les inducteurs de l'expression des shigatoxines

De nombreux inducteurs de l'expression des shigatoxines ont été identifiés. Il s'agit de facteurs activant le système SOS suite à un dommage provoqué dans l'ADN et/ou inhibant la répliation de l'ADN (Zhang, McDaniel et al. 2000). Mais l'existence d'autres mécanismes d'induction est envisagée, des inducteurs *a priori* sans lien avec le système SOS ou l'induction du cycle lytique ayant été mis en évidence (Teel, Melton-Celsa et al. 2002).

2.3.2.1. *Induction de Stx par quorum sensing*

Le *quorum sensing* (QS), mécanisme de communication intercellulaire entre bactéries (de Kievit and Iglewski 2000), intervient dans la régulation de l'expression des toxines à l'intérieur du tube digestif des patients infectés (Clarke and Sperandio 2005). Le système de QS, LuxS, identifié chez plus de 55 espèces bactériennes dont *E. coli*, code une enzyme impliquée dans le métabolisme de plusieurs autoinducteurs, dont l'autoinducteur 2 (AI-2) et 3 (AI-3). AI-3 active la transcription des gènes de virulence des EHEC, dont *stx*, alors qu'AI-2 intervient à différents niveaux dans la cascade de signalisation. Ces autoinducteurs étant produits par la flore microbienne, la plus forte densité bactérienne au niveau du colon (10^{11} à 10^{12} bactéries par ml) permet de dépasser le seuil critique de concentration en autoinducteur entraînant une activation préférentielle des gènes de virulence des EHEC au niveau de cet organe (Clarke and Sperandio 2005). L'activation des gènes de virulence, ainsi que celle des gènes de mobilité et de flagelle, se fait de manière séquentielle (gènes précoces, puis tardifs).

Parallèlement à ce mécanisme bactérien, il a été montré que la norépinéphrine et l'épinéphrine, 2 hormones humaines, stimulent la croissance bactérienne en facilitant l'acquisition de fer (Voigt, Fruth et al. 2006) et activent l'expression des gènes de virulence codés par le PAI LEE (Clarke and Sperandio 2005). Ainsi, les systèmes de signalisation AI-3/luxS et épinéphrine/norépinéphrine interagissent et interviennent dans la transcription des gènes de virulence de manière séquentielle, à différents stade de l'infection et de façon site spécifique dans le tractus digestif humain.

2.3.2.2. *Rôle des antibiotiques, en particulier des quinolones et des fluoroquinolones, dans l'induction de l'expression de Stx*

Le rôle des antibiotiques dans l'induction de l'expression des gènes *stx* peut être considéré par comparaison avec l'action inductrice largement documentée de la mitomycine C, qui provoque *in vitro* une augmentation significative de la production de Stx (Zhang, McDaniel et al. 2000). En effet, cette dernière est souvent utilisée

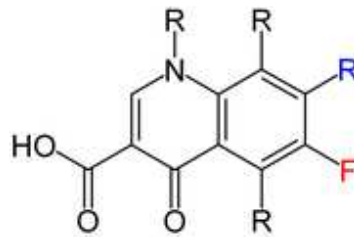
comme témoin positif de l'induction des prophages porteur de gènes *stx*, pour vérifier notamment l'effet de mutations spécifiques de gènes supposés intervenir dans l'induction du système SOS et/ou de *stx* sur la caractère inductible des souches ainsi mutées (Fuchs, Muhldorfer et al. 1999);(Kohler, Karch et al. 2000)

Sur la trentaine d'antibiotiques testés, c'est avec les quinolones et le triméthoprimé que Kimmitt *et al.* ont observé la plus forte induction de *stx2* fusionné à un gène rapporteur *lacZ*, et ce, quels que soient les milieux et les conditions de culture (aérobie, anaérobie ou microaérobie) (Kimmitt, Harwood et al. 2000). A des concentrations supérieures à celles nécessaires à l'inhibition de la réplication bactérienne, ils observent une augmentation de la transcription de *stx2* allant jusque 140 fois (en présence d'ofloxacine).

Les quinolones exercent une inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux topoisomérases de type II, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Hooper 1999) avec, chez la plupart des espèces bactériennes, une action préférentielle sur l'une ou l'autre de ces 2 enzymes (la gyrase pour les bacilles à gram négatif). Ces enzymes provoquent une coupure dans l'ADN double brin, font passer un autre brin d'ADN à travers cette ouverture, puis ressoudent l'ADN au niveau de la coupure initiale. La topoisomérase IV favorise la décaténation de l'ADN et l'ADN gyrase, son surenroulement. Les quinolones bloquent l'activité des topoisomérases de type II en stabilisant le complexe enzyme-ADN, ce qui empêche également le déplacement d'autres protéines telles que l'ADN-polymérase et l'ARN polymérase le long de l'ADN (Hooper 1999).

Les fluoroquinolones sont des dérivés des quinolones comprenant un atome de fluor et un cycle pipérazine. Elles possèdent un spectre d'action plus large et une plus forte activité antimicrobienne que les quinolones. Les fluoroquinolones ont en effet une action équivalente sur les 2 enzymes cibles, gyrase et topoisomérase. La structure moléculaire de plusieurs quinolones et fluoroquinolones est présentée fig. I.6.

Fig. I.6 : Structure chimique des quinolones et des fluoroquinolones et exemple de membres de ces familles



Structure de base des quinolones: le groupe R (bleu) est assez souvent un groupe pipérazine; si la molécule est liée à un fluor (rouge), il s'agit d'une fluoroquinolone.

Acide nalidixique	Ciprofloxacine
Enrofloxacin	

Ainsi, l'action des quinolones et fluoroquinolones au niveau de l'ADN explique leur capacité à induire le système SOS, et donc la transcription des gènes *stx*.

2.3.2.3. Autres facteurs induisant *Stx*

Par irradiation aux UV, O'Brien *et al.* ont induit la production des bactériophages d'*E. coli* O157:H7, H-19J et 933J, chez une souche d'*E. coli* K12, préalablement lysogénisée par ces 2 phages (O'Brien, Newland et al. 1984). Le peroxyde d'oxygène est également cité comme inducteur de la production de toxines *Stx*.

La mise en évidence de l'effet inducteur de certains facteurs résulte de leur utilisation dans la désinfection des surfaces et/ou des produits alimentaires. Ainsi l'irradiation au cobalt ^{60}Co , efficace dans l'élimination des STEC si elle est utilisée à forte dose (>1 kGy), induit à faible dose ($<0,15$ kGy) l'expression des shigatoxines, et ne suffit pas à éliminer les STEC présents sur les aliments traités (Yamamoto, Kojio et al. 2003). La haute pression hydrostatique utilisée dans le traitement du lait a également un effet inducteur sur l'expression des shigatoxines (Aertsen, Faster et al. 2005). Toutefois, la présence de gènes *stx* n'implique par forcément que ceux-ci soient inductibles. En effet, Koitabashi *et al.* ont isolé des souches possédant le gène *stx2*, mais ne produisant pas de toxine (Koitabashi, Vuddhakul et al. 2006). Egalement, Teel et al ont isolé une souche d'*E. coli* O91:H21 possédant deux allèles *stx2d1* et *stx2d2*, dont un seul est activable par induction du prophage (Teel, Melton-Celsa et al. 2002). Sur les 11 souches ayant le gène *stx2e* testées par Muniesa *et al.*, seule une souche avait un phage *Stx2e* inductible (Muniesa, Recktenwald et al. 2000).

Par ailleurs, dans leur étude citée précédemment, Fuchs *et al.* ont constaté que, chez les souches *E. coli* O157:H7 *recA-*, la production de Stx2 n'était plus induite par les UV ou la mitomycine C. Toutefois, la trans-complémentation avec le gène *recA* restaure un niveau d'expression de Stx2 similaire aux souches *recA+* parentes (Fuchs, Muhldorfer et al. 1999). Zhang *et al.* ont mis en évidence chez des souches STEC Stx2d ou Stx2e ne provoquant pas de symptômes chez l'homme, une absence d'induction par la mitomycine C, de la transcription des ARNm *stxA* ou *stxB* (Zhang, Bielaszewska et al. 2005). Chez des souches STEC entraînant des diarrhées, le nombre d'ARNm augmentait d'un facteur fois 100 après induction à la mitomycine C.

D'autres facteurs, comme RecA ou l'environnement génétique du gène *stx* peuvent aussi atténuer la virulence des souches STEC. Par ailleurs, il existe des mécanismes inhibant l'expression des toxines *in vivo*. Dans le cas de *stx1*, on observe une régulation négative de l'opéron codant StxA et StxB, en présence de fer, par le produit du gène *fur* (Calderwood and Mekalanos 1987). Lorsque la quantité de fer assimilée par la bactérie est suffisante, le complexe protéine Fur-Fer se lie sur un site opérateur d'une vingtaine de paires de bases (bp) à proximité du promoteur de *stx*.

Au final, tous ces exemples illustrent bien la distinction qui peut exister entre les souches STEC possédant un gène *stx*, et les souches STEC exprimant la toxine Stx.

2.4. Utilisation des antibiotiques, antibiorésistance et virulence des STEC

Les souches STEC présentant des résistances à certains antibiotiques représentaient un très faible pourcentage des souches isolées il y a quinze ans. Mais déjà en 1984, une souche de STEC 45:H2 résistante à l'acide nalidixique a été isolée chez un patient atteint de colite hémorragique (Bopp, Greene et al. 1987). Kim *et al.* ont testé l'antibiorésistance de 232 isolats cliniques d'*E. coli* O157:H7 récoltés entre 1984 et 1991 (Kim, Samadpour et al. 1994). Par antibiogramme en milieu gélosé sur les quinze antibiotiques testés, ils ont identifié treize souches (5.6%) résistantes à la streptomycine, au sulfisoxazole et/ou à la tétracycline. Toutes ses souches avaient été isolées entre 1989 et 1991. Une étude espagnole montre, quant à elle, qu'il y aurait une augmentation de la prévalence de souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones sur une période de dix ans (Garau, Xercavins et al. 1999). Par ailleurs, l'étude de Mora *et al.* (Mora, Blanco et al. 2005) a montré une corrélation entre profils de virulence, type de phages et résistance aux antibiotiques de souches STEC isolées d'humains, bovins, ovins et d'aliments. En effet, ils ont montré que chez les STEC non-O157, il existe une corrélation positive entre présence des gènes *eae* et *stx1*, et un niveau élevé de résistance à plusieurs antibiotiques. Sur les 141 STEC O15:H7, les phages PT21/28, PT23, PT34 et PT2 étaient associés à un plus grand nombre de souches résistantes.

2.4.1. Mécanismes de résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones

2.4.1.1. *Les mutations chromosomiques*

La résistance aux quinolones chez les Entérobactéries est principalement due à l'altération des enzymes cibles (Topoisomérase IV et/ou ADN gyrase) ou à la détérioration de l'accès aux cibles (altération des canaux de diffusion de la membrane externe et/ou augmentation des mécanismes d'efflux) (Hooper 1999). Ces deux types de résistance sont causés par des mutations chromosomiques.

Avec la plupart des quinolones, la sensibilité de l'ADN gyrase serait plus grande que celle de la topoisomérase IV, l'antibiotique interagissant avec l'enzyme la plus sensible indépendamment du niveau de sensibilité de l'autre enzyme (Heisig 1996). C'est pourquoi, les premières étapes de sélection de mutants résistants aux quinolones implique, chez *E. coli*, la mutation des gènes *gyrA* ou *gyrB*, codant l'ADN gyrase. Les mutations sont le plus souvent observées dans la région QRDR ("Quinolone Resistance Determining Region") de la sous unité GyrA, qui comprend les acides aminés 67 à 106, et correspond au site de liaison des quinolones au complexe ADN-ADN gyrase. Si une simple mutation de *gyrA* rend résistant à l'acide nalidixique, la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones nécessite des mutations supplémentaires dans *gyrA* et/ou *parC* (Cattoir, Lesprit et al. 2006). Des doubles mutations affectant Ser83 et Asp87 de GyrA ont été retrouvées chez des isolats d'*E. coli* résistants aux fluoroquinolones (Vila, Ruiz et al. 1996). La résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones est donc favorisée par une diminution de l'affinité de ces antibiotiques pour le complexe ADN-gyrase. Les mutations Asp426Asn et Lys447Glu au niveau de la sous-unité GyrB ont été mis en évidence chez des souches résistantes à l'acide nalidixique (Hooper 1999). Par contre, l'effet de ces deux mutations est différent pour la ciprofloxacine, Asp426Asn entraînant une faible augmentation de la résistance et Lys447Glu une augmentation de la sensibilité (Yoshida, Bogaki et al. 1991; Hooper 1999). Les mutations de la topoisomérase IV interviennent en deuxième lieu chez des souches dont l'ADN gyrase est déjà mutée.

Les sous-unités ParC et ParE de la topoisomérase IV sont les homologues respectifs de GyrA et GyrB avec des QRDR très fortement conservées (Heisig 1996), les mutations de ParC et ParE intervenant également dans les QRDR (le plus souvent au niveau de Ser80Phe/Tyr et Glu84Lys/Leu de ParC et Leu445His de ParE) (Hooper 1999; Vila, Ruiz et al. 1996; Ozeki, Deguchi et al. 1997).

La résistance aux quinolones impliquerait souvent un mécanisme de sélections successives de mutations ponctuelles, d'abord dans la cible primaire (l'ADN gyrase), puis dans la cible secondaire (la topoisomérase IV) (Heisig 1996). A la première étape de mutation, le niveau de résistance de la souche est fixé par la topoisomérase la plus sensible à la quinolone testée (ADN gyrase mutée ou topoisomérase IV sauvage) (Heisig 1996). Ainsi, à chaque étape, une simple mutation ponctuelle (fréquence 10^{-9} à 10^{-8} chez *E. coli*) entraînant une augmentation de la résistance à une quinolone en particulier et conférant un avantage sélectif à ce mutant, permet d'obtenir des STEC mutants résistants à des doses croissantes de quinolones (Ozeki, Deguchi et al. 1997).

Certains isolats cliniques d'*E. coli* résistants aux quinolones ont des altérations au niveau des protéines de la membrane externe, comme une diminution du nombre de porines (Hooper 1999). Les pompes à efflux (comme OmpF ou AcrAB) sont également impliquées dans les mécanismes de résistance aux quinolones (Heisig 1996). La surexpression du régulon *marA* (pour "Multiply Antibiotic-Resistant") et de son homologue *soxS* affecte la régulation de l'expression d'autres gènes conduisant au final à une diminution de l'expression du gène *ompF*, qui code l'une des 2 principales porines d'*E. coli*. En plus des mutations sur *gyrA* et *parC*, des isolats cliniques d'*E. coli* résistants aux quinolones possédaient également des gènes *marA* et *soxS* surexprimés (Oethinger, Podglajen et al. 1998). Par ailleurs, la sélection de souches *marA* mutantes pouvant survenir en présence d'autres antibiotiques que les quinolones ou les fluoroquinolones (tétracycline, chloramphénicol), il existe des risques de sélection de résistances croisées *in vivo*. Le gène *emrB*, un membre de la superfamille des facilitateurs de pompe d'efflux de multi-résistance aux antibiotiques, est inductible par l'acide nalidixique et non par les fluoroquinolones (Hooper 1999).

La mutation de ce gène ainsi que du gène *emrA*, codant une protéine de fusion membranaire, induit une résistance à l'acide nalidixique, mais non aux fluoroquinolones.

2.4.1.2. *Les plasmides de résistance*

Outre les mutations chromosomiques responsables de la très large majorité des phénotypes de résistance aux fluoroquinolones, des gènes de résistance plasmidiques ont également été décrits récemment chez les Entérobactéries. Le gène *qnr* constitue l'un d'entre eux et code une protéine (QNR) qui agit par inhibition de la fixation des quinolones / fluoroquinolones à l'ADN gyrase (Tran and Jacoby 2002). La contribution de ces gènes plasmidiques à la résistance globale aux fluoroquinolones des bactéries animales reste encore très mal documentée.

2.4.1.3. *Les bactéries tolérantes*

Par ailleurs, un mécanisme plus général de résistance existe : une sous population bactérienne, dite tolérante ou persistante, survit à des traitements antibiotiques ou d'autres traitements létaux sans mécanisme génétique particulier de résistance (Falla and Chopra 1998; Vazquez-Laslop, Lee et al. 2006). Dans les populations en phase exponentielle de croissance, des bactéries tolérantes apparaissent à une fréquence de 10^{-7} à 10^{-5} . Ce phénotype de persistance est sous le contrôle d'une toxine, Hip A, qui provoque le ralentissement, voire l'arrêt, du cycle cellulaire entraînant la mise en dormance des bactéries. De plus, les bactéries exprimant Hip A forment 10 à 1000 fois plus de bactéries tolérantes à la ciprofloxacine (Falla and Chopra 1998). Le couple toxine Hip A et antitoxine Hip B constitue l'un des nombreux modules toxine-antitoxine bactérienne, jouant un rôle dans l'augmentation de la fraction de bactéries en dormance dans la population totale.

2.4.2. Usage des antibiotiques - relation entre antibiothérapie, antibiorésistance et virulence

Différents dispositifs réglementaires, nationaux et européens, encadrent l'usage des antibiotiques chez les animaux. Leur évolution a été marquée par certaines étapes fondamentales comme l'interdiction de certaines molécules à des fins de promoteurs de croissance. Pour autant, il est essentiel de promouvoir en permanence la nécessité d'un usage prudent et raisonné des antibiotiques chez l'animal, et ce point constitue un véritable enjeu stratégique.

En médecine humaine, et depuis les premières utilisations massives d'antibiotiques (pénicilline G, par exemple), la proportion de souches résistantes à ces molécules ne cesse de croître, conduisant actuellement à certaines impasses thérapeutiques en l'absence de traitement alternatif. Des souches animales résistantes aux antibiotiques sont également identifiées à partir des différentes filières de production, en raison de la pression de sélection par l'usage devenue également très forte en pratique vétérinaire.

Cette pression de sélection s'applique à toutes les espèces bactériennes qui y sont soumises, et donc naturellement aussi aux souches de STEC de portage, en particulier bovines. Des cas de résistances acquises chez ces germes ont ainsi été décrits. Dans le cas particulier des STEC, il se trouve que ces molécules sont également inductrices de l'expression de certains facteurs de virulence (Stx), et ce double effet fonctionnel sur les souches STEC mérite d'être pris en considération. En effet, placées dans des conditions environnementales particulières (concentrations sub-inhibitrices en antibiotique), les souches STEC peuvent à la fois acquérir certains niveaux de résistance et de virulence accrue.

Ce lien entre antibiothérapie, antibiorésistance et virulence peut également s'illustrer largement chez l'homme, et devient particulièrement important lorsqu'on considère des germes pathogènes communs à l'homme et l'animal, comme c'est le cas pour les

STEC. A titre d'exemple, l'usage de la néomycine chez les bovins réduit l'excrétion fécale et le nombre d'*E. coli* O157:H7 (Callaway, Anderson et al. 2004). Bien que cet antibiotique ne soit pas utilisé en médecine humaine, il est proche d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides utilisés en médecine humaine, et peut donc induire des résistances croisées dans cette famille de molécules. Son utilisation n'est donc pas souhaitable si d'autres stratégies d'intervention sont disponibles (Callaway, Anderson et al. 2004).

Egalement, une étude menée sur 71 enfants de moins de 10 ans atteints de diarrhée à *E. coli* O157:H7 (Wong, Jelacic et al. 2000) montre que des cas de SHU se sont développés plus fréquemment chez les enfants traités avec des antibiotiques (céphalosporine, triméthoprime + sulfaméthoxazone ou amoxicilline). D'autres études montrent pour la plupart des antibiotiques et des souches testées, une augmentation de la production des toxines Stx lors de l'utilisation de ces antibiotiques (Walterspiel, Ashkenazi et al. 1992; Grif, Dierich et al. 1998).

Une synthèse bibliographique portant sur les études réalisées entre 1982 et 2005 traitant de l'effet de l'antibiothérapie sur les infections à EHEC O157:H7 a été réalisé par Panos *et al.* (Panos, Betsi et al. 2006). En raison notamment des insuffisances statistiques (échantillonnage trop faible, absence de contrôle ou de imprécisions des données), les auteurs ne concluent ni en faveur ni en défaveur de l'usage des antibiotiques pour le traitement des patients infectés par *E. coli* O157:H7. En revanche, une distinction peut être faite entre les différentes classes d'antibiotiques selon leur mode d'action impliquant ou non l'induction des toxines. Par exemple, la kanamycine et la tétracycline qui inhibent la synthèse protéique bactérienne, n'induisent pas la libération des toxines. Par contre, les quinolones entraînent dans la grande majorité des souches testées une augmentation de la libération des toxines. Kimmitt *et al.* ont ainsi montré que 3 quinolones, la ciprofloxacine, l'ofloxacine et l'acide nalidixique induisaient, après 3h30, une augmentation de 10 à 65 fois, de la production de Stx2 sur un isolat clinique EHEC O157 (Kimmitt, Harwood et al. 1999). Les plus hauts niveaux d'induction étaient obtenus à des concentrations au-dessus de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque quinolone.

Mais au-delà du fait d'administrer ou non des antibiotiques, il semblerait que le moment de cette administration (rapidement, dès déclenchement des symptômes ou plus tardivement) joue grandement sur l'évolution de la maladie. Suite à l'épidémie japonaise de Sakai survenue en 1996, une vaste analyse suggère que l'utilisation de la fosmycine, un inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane a réduit de manière significative le risque de SHU, mais uniquement pour les patients ayant reçu ce traitement le 2^{ème} jour de leur maladie (Ikeda, Ida et al. 1999).

La virulence de la souche, liée au type de toxine produite, semble aussi jouer sur l'effet d'un traitement antibiotique. Dans le cas de porteurs asymptomatiques, l'utilisation d'antibiotiques n'a pas été associée au développement de complications. Dans une étude danoise, des porteurs sains de souches STEC non-O157 *stx1+* majoritairement *stx2-* (sauf 2/9 *stx2-O188+*) ont été soignés par ciprofloxacine ou ampicilline sans qu'aucun ne développe de symptomatologie classique des EHEC (Jensen, Schiellerup et al. 2005).

Le traitement par antibiotiques, et tout particulièrement les quinolones, ne semble donc, de manière générale, pas recommandée en raison d'une libération possible de toxines pouvant prédisposer à un SHU/PTT (Phillips, Tyerman et al. 2005). A ce jour, aucun traitement optimal pour prévenir ou améliorer les SHU n'est connu.

2.5. Virulence comparée des souches bovines et humaines

Certaines analyses phylogénétiques distinguent 2 lignées évolutives d'*E. coli* O157:H7 (Kim, Nietfeldt et al. 1999) présentant des caractéristiques écologiques distinctes, la lignée I étant plus souvent associée avec des pathologies humaines, la lignée II étant limitée au portage bovin (Gyles 2006). D'autres études ont permis de mettre en évidence que chez les isolats de la lignée II, certains gènes sont plus

fortement exprimés, tels que *stx2*, ainsi que des gènes de virulence putatifs comme *toxB*, des gènes de capsule ou de flagelle (Dowd and Ishizaki 2006).

La comparaison de 63 souches STEC O157:H7 isolées chez des bovins et de 86 isolats cliniques humains a permis de montrer que seuls peu de STEC issus de bovins sont *stx2+* (Roldgaard, Scheutz et al. 2004). Les résultats de cette étude seraient en accord avec cette idée de l'existence de deux lignées distinctes, avec seulement une partie des souches bovines O157:H7 qui seraient impliquées dans les pathologies humaines.

Par ailleurs, Besser *et al.*, ont comparé les sites d'insertion des bactériophages codant Stx2 et/ou Stx1 chez 282 isolats cliniques humains et 80 isolats bovins d'*E. coli* O157:H7 (Besser, Shaikh et al. 2007). La majorité des isolats cliniques (95% d'entre eux) appartiennent à 3 groupes (1 à 3), les isolats bovins étant plus diversifiés, avec près de la moitié seulement appartenant aux groupes 1 à 3. Les isolats restants peuvent être classés dans 13 groupes : 4 comprenant des isolats humains et bovins, 7 des isolats bovins uniquement et 2 des isolats humains uniquement.

Les souches bovines pathogènes pour l'homme ne représenteraient donc qu'une sous population de l'ensemble des STEC retrouvés chez l'animal (Roldgaard, Scheutz et al. 2004; Besser, Shaikh et al. 2007). La différence de virulence entre ces 2 lignées pourrait être liée à la présence ou à l'absence de certains marqueurs génétiques comme *eae*, *ehx*, et à l'appartenance au sérotype O157 ou à un sérotype non-O157 (Ritchie, Wagner et al. 2003) ainsi qu'à l'environnement génétique des gènes *stx* (Besser, Shaikh et al. 2007).

2.6. Mobilité des gènes impliqués dans la virulence des STEC

Une grande majorité des facteurs de virulence des STEC est codée par des gènes acquis par transfert horizontal (transposons, plasmides ou phages) (Waldor and

Friedman 2005), et cette localisation sur des éléments génétiques mobiles soulève la question de leur transfert à d'autres bactéries et les conséquences que cela implique en termes de dangerosité.

Les toxines de nombreuses bactéries, qu'elles soient à Gram + ou à Gram -, sont codées par des bactériophages tempérés. La présence de tels gènes dans le génome de bactériophages entraîne un risque de dissémination de ces facteurs de virulence. Les phages contribueraient ainsi à l'évolution de la virulence des EHEC et à l'émergence de nouveaux clones (Caprioli, Morabito et al. 2005), ainsi qu'à la conversion de souches d'*E. coli* commensales en souches pathogènes (Kohler, Karch et al. 2000).

Dès 1966, une souche de *Citrobacter* atypique, ayant une activité cytotoxique sur cellules Vero, avait déjà été isolée (Schmidt, Montag et al. 1993). Depuis, de nombreuses études illustrent la production de shigatoxines par différentes espèces bactériennes : *Citrobacter freundii* (Schmidt, Montag et al. 1993; Tschape, Prager et al. 1995), *Enterobacter cloacae* (Paton and Paton 1996), *Shigella sonnei* ((Strauch, Lurz et al. 2001), *Shigella dysenteriae* I (Strockbine, Jackson et al. 1988), *Acinetobacter haemolyticus* (Grotiuz, Sirok et al. 2006).

Cette dernière souche d'*Acinetobacter haemolyticus* productrice de Stx2 a été isolée à partir de selles d'un nouveau-né de 3 mois souffrant de diarrhée sanglante (Grotiuz, Sirok et al. 2006). Paton et al ont isolé chez un enfant atteint de SHU, deux souches bactériennes identifiées comme *E. coli* OR:H9 et *Enterobacter cloacae* (Paton and Paton 1996). Ces deux souches possèdent chacune un gène codant Stx2. La toxine Stx2 d'*E. cloacae* similaire à celles de différentes souches d'*E. coli*, ne variait que de 3 résidus acides aminés par rapport à la toxine Stx2 isolée d'une souche d'*E. coli* O48:H21.

Schmidt *et al.*, quant à eux, ont mis en évidence la présence de souches de *Citrobacter freundii* portant des gènes codant Stx2 (Schmidt, Montag et al. 1993). Des filtrats de cultures primaires de ses souches étaient cytotoxiques pour les cellules

Vero. Par contre, après sous-culture en milieu liquide ou solide, l'activité cytotoxique était perdue dans 5 souches sur 7. Ceci était dû à la perte du gène *stx*. Cet exemple illustre bien la possibilité de transfert de gènes inter-espèces, mais il montre aussi à quel point les souches lysogènes sont instables.

Tout comme les gènes de résistance aux antibiotiques, les facteurs de virulence peuvent donc être transférés naturellement entre bactéries. De plus, l'usage des antibiotiques, chez l'animal comme chez l'homme contribue à augmenter le nombre de bactériophages dans le tractus digestif, et donc le risque de transfert, non seulement de gènes de résistance aux antibiotiques, mais aussi de gènes de virulence. La surveillance du réservoir bovin est donc primordiale pour essayer de limiter les risques de propagation de ces gènes.

3. Prévention et contrôle des infections humaines à STEC

3.1. Outils et méthodes disponibles pour la surveillance

La surveillance des infections à EHEC au niveau européen s'appuie sur les données collectées au niveau national au travers de la base de données du réseau international de surveillance des gastro-entérites aiguës (réseau Enter-net). Ces données sont ensuite compilées et exploitées par l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Les données de 24 Etats membres de l'Union Européenne, ainsi que de la Suisse, la Norvège et l'Islande, sont ainsi transférées dans une base de données commune. Au-delà de l'existence d'un recueil européen unique des données des différents pays, la question de la comparabilité de celles-ci entre elles mérite d'être posée. En effet, les méthodes d'identification des STEC, ainsi que les critères pris en compte pour la qualification des cas, peuvent largement différer entre Etats membres. Ainsi, malgré différents avis portés par l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (AESA) (voir Annexe 1), l'acuité globale du système de surveillance européen est encore largement perfectible.

Parmi les différentes techniques utilisées, on distingue celles qui permettent la détection, l'isolement ou l'identification des STEC. Les méthodes de diagnostic sont loin d'être simples à mettre en œuvre. De plus, selon le type de matrice (fécale, alimentaire ou environnementale) et le sérotype (STEC O157 ou non-O157) considérés, les approches ne sont pas les mêmes.

3.1.1. Les techniques de détection des STEC

On distingue 3 types d'approches principales pour la détection des STEC, il s'agit d'approches cellulaires, immunologiques et de biologie moléculaire.

3.1.1.1. *Utilisation de cultures cellulaires*

La technique de référence consiste à tester la cytotoxicité des toxines contenues dans un échantillon (fécal, alimentaire ou environnemental), ou encore à partir d'une culture bactérienne pure, sur culture cellulaire, généralement de cellules Vero ou parfois de cellules HeLa. Cette méthode permet de détecter les shigatoxines présentes dans des selles d'un patient pour mettre en évidence une infection à EHEC ou dans des milieux d'enrichissement inoculés avec des échantillons environnementaux, alimentaires ou fécaux pour identifier une contamination de l'échantillon par des STEC.

3.1.1.2. *Les méthodes immunologiques : ELISA et RPLA*

Les approches immunologiques sont basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les shigatoxines. Qu'il s'agisse de tests ELISA ou d'agglutination sur latex (RPLA), plusieurs formats différents existent, certains faisant l'objet d'une commercialisation, comme, par exemple, le kit ELISA ProSpecT[®] Shiga toxin (Oxoid). Ces techniques facilement utilisables en laboratoire, car peu onéreuses et relativement fiables, permettent de tester des culture pures ou des milieux d'enrichissement inoculés avec des échantillons alimentaires ou fécaux.

3.1.1.3. *Les méthodes basées sur l'ADN*

Il s'agit de rechercher des (fragments de) gènes de virulence (stx, principalement) et/ou des gènes spécifiques de sérotypes comme *rfbO157* pour les STEC O157. La détection de ces gènes cibles s'effectue par hybridation ADN-ADN sur laquelle est basées la PCR, les puces à ADN, les "dot blot" ou encore la technique NASBA ("Nucleic Acid Sequence-Based Amplification"). Ces techniques peuvent être utilisées sur des acides nucléiques issus de cultures pures ou de milieux d'enrichissement inoculés avec des échantillons alimentaires ou fécaux. Ces techniques ont l'avantage d'être rapides, plusieurs gènes peuvent être recherchés en même temps (PCR multiplexes, puces à ADN...). Par contre, un désavantage de ce type de technique est

qu'elles ne permettent pas de savoir si la séquence d'ADN mise en évidence provient de bactéries cultivables ou non.

3.1.2. Les techniques d'isolement des STEC

La majorité des infections humaines étant imputables à quelques sérogroupes en particulier, dont O157, des méthodes spécifiques ont été développées pour détecter les STEC O157. Il existe, de plus, des tests pour les sérogroupes O26, O111, O103, et O145.

Les méthodes utilisées sont basées sur :

- L'utilisation de milieux sélectifs ou de milieux différentiels, tels que le milieu gélosé sorbitol MacConkey (SMAC), qui peut être supplémenté en 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), permettant la mise en évidence des caractères biochimiques de non-fermentation du sorbitol et d'absence de l'enzyme β -glucuronidase propres à la majorité des STEC O157. Le milieu gélosé rhamnose MacConkey est, quant à lui, utilisé pour les souches STEC O26.
- Des procédures d'enrichissement qui utilisent des techniques d'immunocapture (IMS pour "Immuno-Magnetic Separation") *via* des billes magnétiques sur lesquelles sont fixés des anticorps dirigés spécifiquement contre le LPS de certains sérogroupes de STEC (O157, O26, O103, O111 ou O145).

3.1.2.1. *Isolement et enrichissement des STEC O157*

La sélectivité des milieux spécifiques pour les STEC O157 (comme le milieu SMAC) peut être améliorée par supplémentation en céfixime et en tellurite (CT-SMAC). Cependant, certaines souches STEC O157 étant sensibles à ces composés, elles ne sont donc pas détectables par ce milieu.

Les colonies suspectes isolées sur milieu sélectif sont ensuite testées avec un sérum anti STEC O157 ou par réaction biochimique d'agglutination sur latex.

En général, les échantillons de selles de patients peuvent être examinés par isolement sur milieu gélosé sans enrichissement préalable. En raison du faible nombre de STEC O157 contenus dans les échantillons alimentaires, environnementaux ou des fèces d'animaux, une étape préliminaire d'enrichissement est souvent nécessaire à l'isolement des STEC. Il s'agit d'une culture en milieu liquide en eau peptonée ou en milieu trypticase soja (TSB) généralement supplémenté par différents agents sélectifs, comme la novobiocine, le céfixime, la cefsulodine ou encore des sels biliaires. Les incubations sont réalisées à 37°C ou à 42°C, et de 6 à 18H en fonction du type de matrice.

3.1.2.2. *Isolement et enrichissement des STEC non-O157*

La présence de STEC non-O157 peut être effectuée à partir de colonies isolées sur milieu gélosé, qui sont ensuite testées par agglutination contre un ou des pools de sérums spécifiques de différents sérogroupes de STEC.

Les données disponibles sur les caractéristiques phénotypiques des STEC non-O157, ainsi que sur les différents agents de sélection, sont encore insuffisantes pour la production d'un milieu qui soit adapté à tous les STEC non-O157. On peut, toutefois, à partir de milieu gélosé MacConkey, dont le lactose est remplacé par du rhamnose, et avec une supplémentation en céfixime et en tellurite de potassium, isoler des STEC O26. La production d'entérohémolysine chez près de 90% des STEC O157 et 70% des STEC non-O157 permet d'isoler ces souches sur gélose au sang de mouton, les colonies entérohémolysine positives étant alors facilement identifiables en raison de la décoloration de la gélose en halo autour de la colonie produisant de l'entérohémolysine.

Par ailleurs, après enrichissement, des systèmes de détection basés sur l'IMS spécifiques de certains sérotypes (O157, O26, O103, O11 et O145) peuvent également être utilisés.

3.1.3. Les méthodes alternatives d'identification de sérotypes spécifiques

Mis à part les techniques d'IMS, il existe d'autres approches immunologiques telles que l'ELISA, les "dot blot" et les bâtonnets recouverts d'anticorps. Mais il existe très peu de tests ciblant spécifiquement des STEC non-O157. Il existe, de plus, des risques de réactions faussement positives en raison des réactions croisées avec d'autres antigènes provenant d'autres bactéries que les STEC. Des PCR spécifiques de certains sérogroupes ont également été mises au point pour les serogroupes O26, O103, O111 et O145.

3.2. Données de surveillance des infections humaines à EHEC

Au-delà de l'aspect purement technique du diagnostic, le contrôle des infections à EHEC dépend largement de l'acuité diagnostique des médecins, ainsi que de leur volonté de rechercher les EHEC. Les déclarations de cas sont généralement plus faibles pour des maladies que l'on traite principalement en consultations externes ou en ville. La stricte surveillance des SHU présente certaines faiblesses : l'information n'est recueillie que sur la fraction de patients ayant contracté l'infection à EHEC et développé un SHU et, souvent, le sérotype ne peut plus être déterminé parce que la plupart des patients cessent d'excréter la souche EHEC lorsque le SHU se développe. Cependant, comme les patients sont généralement hospitalisés, les données des cas de SHU sont plus faciles à recueillir et plus complètes.

3.2.1. Épidémiologie des SHU en France

Les chiffres disponibles proviennent du réseau de surveillance coordonné par l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS), et composé de néphrologues pédiatres volontaires qui recensent le nombre de cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans.

Le taux d'incidence des SHU est de $<0,7/100\ 000$ chez les enfants de moins de 15 ans et de $2,1/100\ 000$ chez les enfants de moins de 2 ans, la majorité des cas étant d'origine sporadique. Cinquante sept pour cent des cas de SHU pour lequel un sérodiagnostic d'infection à STEC a été réalisé, sont associés à une infection à STEC avec une prédominance du sérotype O157 (90% sur la période 1996-2003).

Les infections à STEC connaissent une recrudescence en été avec plus de la moitié des cas de SHU survenant de juin à septembre. Cette variation saisonnière est liée à différents facteurs, impliquant les animaux eux-mêmes et les habitudes humaines. Les pratiques d'élevage, comme la mise en pâture au printemps, mais aussi les cycles de reproductions des bovins et la mise bas des veaux au printemps, peuvent expliquer en partie la plus forte incidence des épidémies à STEC durant ces saisons. La période estivale est également propice au rapprochement des humains avec la nature et ainsi des animaux et de leur environnement ce qui augmente le risque et le nombre des contaminations.

3.2.2. Comparaison des données épidémiologiques en Europe

Les données dont nous disposons au niveau européen et mondial sont issues de sources et méthodes d'analyse différentes selon les pays, ce qui incite à la prudence quant à leur comparaison. Il existe trois catégories de source de données : la déclaration obligatoire de la maladie, la déclaration basée sur des réseaux sentinelles de laboratoires, d'hôpitaux ou de médecins sélectionnés, et les diverses sources à partir desquelles les données sur les infections à EHEC et les cas de SHU sont collectées ponctuellement. Les deux premières catégories sont considérées comme des systèmes de surveillance car elles sont basées sur un recueil systématique et continu de données permettant une analyse de tendances.

Quelques pays seulement parmi ceux possédant un système de surveillance utilisent une définition de cas pour les infections à EHEC, les chiffres officiels français provenant principalement du réseau identifié précédemment. Les termes de la

définition de cas sont en Finlande "l'isolement de EHEC" sans plus de spécifications et, en Suède et au Royaume Uni, "STEC O157 confirmé par laboratoire". La définition de cas aux Pays-Bas est l'isolement d'*E. coli* O157 avec mise en évidence d'une production de shigatoxines et de la présence d'un gène commun à tous les *E. coli* O157 (*eaeA*). En Belgique, il n'y a pas de définition de cas formelle, mais le nombre d'isolats de STEC est rapporté.

Le SHU n'est pas à déclaration obligatoire en Europe actuellement. L'Autriche, la France et la Suisse ont mis en place, depuis plusieurs années, des systèmes de surveillance sentinelle. Le Royaume-Uni et la République d'Irlande ont créé en 1997 un système de surveillance étendu et actif pour le SHU. En Italie, un système de surveillance sentinelle fonctionne depuis 1988. Six pays obtiennent les informations sur les cas de SHU à partir de sources *ad hoc* et trois pays ont déclaré ne pas recueillir de données sur les SHU.

Cinq pays parmi ceux qui possèdent des systèmes de surveillance sentinelle utilisent des définitions de cas qui englobent les trois caractéristiques suivantes : insuffisance rénale, anémie et taux de plaquettes bas. Trois pays ont inclus un âge limite (<15 ans en France, <16 ans en Irlande et au Royaume Uni). La seule variable uniformément spécifiée est l'anémie (hémoglobine <10 g/l plus fragmentation des globules rouges), les critères des autres paramètres sont variables.

Des recommandations pour le diagnostic bactériologique de routine des infections à EHEC existent dans certains pays et sont en préparation dans d'autres. La Finlande recommande la culture sur Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) et le Royaume Uni, la culture sur SMAC avec céfixime et tellurite (CT-SMAC). Comme rappelé précédemment, ces deux milieux détectent les souches d'*E. coli* O157:H7 sorbitol-négatif, mais pas les autres sérotypes. Au Danemark, on recommande d'utiliser des sondes d'ADN sur les colonies suspectes provenant de milieux entériques.

En France, en 2005, 108 cas d'infection à STEC (avec 20 cas de SHU) ont été reportés. Au moins 68% des cas ont été causés par des STEC O157, 19% par des STEC non-O157, et les 13% restants n'ont pas pu être sérotypés. On constate que

ces proportions varient d'un état de l'UE à l'autre. Si, en moyenne, *E. coli* O157 constitue le sérotype le plus fréquemment isolé chez les patients, d'autres sérotypes semblent prédominer dans certains pays. En Allemagne, par exemple, seuls 10% des 759 cas reportés en 2005 sont dus à des STEC O157. On constate parallèlement une relative faiblesse des cas de SHU sur le nombre total de maladies à STEC rapportées : 8/759 soit 1% en Allemagne contre 20/108 soit 18,5% en France. Notons toutefois que le diagnostic clinique de SHU peut être posé sans qu'il soit nécessairement associé à l'isolation ou à la confirmation d'une infection à STEC.

En outre, bien qu'une partie de ces variations entre pays soit imputable à la disparité de leurs stratégies de surveillance et de leurs méthodes de détection, il n'en reste pas moins que cela puisse également mettre en évidence des différences d'exposition d'un pays à l'autre. En effet, certains paramètres liés au réservoir bovin comme les pratiques d'élevage, les conditions d'abattage et de transformation ... varient d'un pays à l'autre.

3.2.3. Evolution de l'épidémiologie des infections à STEC

Dans les années 1980, la plupart des infections étaient associée à la consommation de denrées alimentaires d'origine animale. Depuis le milieu des années 1990, l'ingestion de végétaux et le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus souvent incriminés en clinique humaine (Caprioli, Morabito et al. 2005). Cette évolution pourrait avoir plusieurs origines :

- 1) Une recherche plus exhaustive des sources potentielles de contamination, les pathologies associées à l'infection par des STEC étant historiquement appelées "maladie du hamburger", reflétant la vision réductrice qui voulait que la viande de bœuf soit la cause principale, sinon unique, des épidémies à STEC.
- 2) La multiplication des élevages bovins intensifs entraîne un plus grand risque de contamination de l'environnement direct des fermes par l'infiltration dans

les sols, mais aussi plus largement *via* l'épandage de lisiers contaminés par des STEC.

- 3) Enfin, la modification des habitudes alimentaires, notamment l'augmentation de la consommation d'aliments crus (fruits, légumes...) dans les pays développés, peut expliquer la part plus grande des épidémies liées à ces denrées.

3.2.4. Principales épidémies humaines

Depuis les premières épidémies survenues aux États Unis en 1982 suite à l'ingestion de hamburgers insuffisamment cuits et contaminés par *E. coli* O157:H7 (Riley, Remis et al. 1983), des épidémies ainsi que des cas sporadiques continuent de survenir chaque année dans le monde.

En France, 9 ans après la mise en place de la surveillance des cas de SHU, a éclaté la première grande épidémie à *E. coli* O157 dans notre pays. En effet, en octobre 2005, 13 cas de gastro-entérites aiguës avec diarrhée sanglante et 13 cas de SHU, ont été rapportés dans 5 départements du sud-ouest (17 dans les Landes, 3 en Pyrénées Atlantiques, 1 en Haute Garonne, 4 en Lot-et-Garonne et 1 dans le Gers). Quarante-deux pour cent des patients (dont tous les cas de SHU) étaient des enfants âgés de 15 mois à 9 ans. Les 26 patients avaient consommé des steaks hachés surgelés provenant de la même enseigne. Pour 10 d'entre eux, une infection à *E. coli* O157:H7 a pu être confirmée, des isolats du même sérotype ont par ailleurs pu être extraits de plusieurs steaks hachés des lots suspectés.

Pour illustrer l'ampleur que peut prendre ce type d'épidémie, évoquons plus en détail le cas d'une épidémie qui a touché le Japon en juillet 1996.

Plus de 6 300 écoliers et 92 membres du personnel scolaire fréquentant 62 écoles élémentaires publiques de la ville de Sakai ont été infectées.

Tableau I.4 : Les principales épidémies à EHEC d'origine alimentaire ou environnementale de 1995 à 2008

Année	Pays	Source suspectée ou confirmée	Nombre de malades (nombre de SHU, nombre de décès †)	Sérogroupe STEC	Référence
1995	Australie	Saucisson	23 (23 SHU, 1 †)	O111:H-	Paton 1996
	Etats-Unis	Laitue	> 70 (1 SHU)	O157:H7	Ackers 1998
	Royaume Uni	Viande crue	14 (2 SHU)	O157	Stevenson 1996
1996	Etats-Unis	Laitue	61	O157:H7	Hilborn 1999
	Japon	Pousses de radis	9451 (12 †)	O157:H7	Michino 1999
	Royaume Uni	Viande de bœuf	512 (34 SHU, 17 †)	O157:H7	Cowden 2001
1996-98	Allemagne	Contact avec des bovins	17 (2 SHU)	O118	Beutin 2000
1997	Espagne	Eau de source privée	15	O157:H7	Pebody 1999
	Etats Unis	Germe de luzerne	108 (4 SHU)	O157:H7	Breuer 2001
	Finlande	Eau de lac	14	O157:H7	Paunio 1999
	Royaume Uni	Gâteau à la crème	37	O157:H-	O'Brien 2001
	Royaume Uni	Contact avec des bovins	15	O157:H7	Crampin 1999
1998	Etats-Unis	Fromage frais caillé	55	O157:H7	CDC 2000a
	Etats-Unis	Eau de puits non traitée	157	O157:H7	Olsen 2002
1999	Etats-Unis	Eau de distribution	775	O157:H7	Bopp 2003
	Etats-Unis	Eau de lac	11 (3 SHU)	O121:H19	McCarthy 2001
	Royaume Uni	Lait cru	60	O157	CDSC 1999

Année	Pays	Source suspectée ou confirmée	Nombre de malades (nombre de SHU, nombre de décès †)	Sérogroupe STEC	Référence
1999-2000	Etats-Unis	Contact avec animaux de ferme et fèces	326	O157:H7	Kennedy 2002

2000	Canada	Eau du réseau municipal	2300 (26 SHU, 7 †)	O157:H7	Hrudey 2003
	Espagne	Saucisse	181 (6 SHU)	O157:H7	Martinez 2001
	Etats-Unis	Contact avec des veaux	51 (8 SHU)	O157:H7	Crump 2002
	Etats-Unis	Viande de bœuf hachée	55 (4 SHU)	O157:H7	Proctor 2002 ; Smith 2002
	Royaume Uni	Lait non pasteurisé	6 (1 SHU)	O157	CDC 2000b
	Royaume Uni	Sol contaminé avec des fèces de mouton	20	O157:H7	Ogden 2002
2001	Canada	Lait de chèvre non pasteurisé	5 (2 SHU)	O157:H7	McIntyre 2002
2002	France	Salade de concombres	10	O157:H7	Duffell 2003
	France	Viande de mouton	11 (2 SHU)	O148:H8	Espié et Vaillant 2003
2004	Canada	Eau d'un parc	10 (1 SHU)	O157:H7	PHAC 2005
	Royaume Uni	Eau de rivière	7	O157:H7	Inekweazu 2006
2005	France	Camembert	16 (16 SHU)	O26	Espié 2006a
	France	Steaks hachés de bœuf	70 (17 SHU)	O157:H7	Mailles 2006 ; King Lisa 2007
	Irlande	Eau de source privée	18 (2 SHU)	O157:H7	Mannix 2005
2006	Etats-Unis	Epinards	199 (31 SHU, 3 †)	O157:H7	PHAC 2006

Des infections secondaires ont également touché 160 autres personnes, principalement des membres de la famille des écoliers infectés. Trois enfants sont décédés au cours de cette épidémie (Yoh, Frimpong et al. 1999). *E. coli* O157:H7 a été retrouvé dans des échantillons de selles de malades. L'enquête épidémiologique a révélé que des pousses de radis fraîches figuraient parmi les aliments consommés en commun par les écoliers. Il a également été trouvé que, lors de 4 autres épidémies s'étant déclarées à la même période, des pousses de radis provenant du même producteur avaient aussi été consommées.

En revanche, si les profils ADN des *E. coli* analysés sur des isollements des cinq épidémies étaient identiques, aucune trace de cette souche n'a cependant été trouvée parmi des échantillons de graines et de pousses de radis, ni au sein de prélèvements de sol et d'eau de la ferme concernée, et également pas dans les échantillons de selles recueillis chez les employés de cette ferme.

Cet épisode illustre bien l'ampleur que peut prendre ce type d'infections, avec près de 10 000 personnes malades au cours de ces 5 épidémies, mais aussi la difficulté à rechercher et confirmer la cause des épidémies. Les principales épidémies à EHEC sont listées dans le tableau I.4.

3.3. Surveillance du réservoir animal et des produits alimentaires en France et en Europe

3.3.1. Surveillance du réservoir animal

Bien que des sérotypes de STEC impliqués en clinique humaine aient été isolés chez des animaux domestiques, de compagnie et sauvages, ceux-ci ne semblent pas être le réservoir primaire mais plutôt des vecteurs passifs de ces bactéries à partir de l'environnement. En revanche, les ruminants, et les bovins en particulier, étant considérés comme le réservoir naturel des STEC et des STEC O157 plus

particulièrement, l'action de surveillance chez ces espèces est primordiale (Hussein & Bollinger 2005). Les petits ruminants (moutons, chèvre) constituent le deuxième plus important réservoir à surveiller. En raison des différences nationales, d'autres animaux comme le buffle, certains animaux sauvages pourraient également faire l'objet de surveillance. Les porcs et la volaille n'ont, en revanche, pas été identifiés comme des sources de STEC pathogènes en Europe.

La surveillance de la filière animale dans son ensemble en tant que réservoir des STEC est ainsi essentielle, et doit permettre de contribuer à une meilleure connaissance de leur prévalence dans les différents environnements des ruminants, ainsi que dans les aliments concernés.

La mise en application de la Directive zoonose à la surveillance des STEC chez les animaux et dans l'alimentation conduit à privilégier en premier lieu celle des STEC du serogroupe O157. La surveillance devrait ensuite être étendue à d'autres sérogroupes identifiés comme pathogènes chez l'homme, comme les serogroupes O26, O103, O91, O145 et O111. De plus, la caractérisation des STEC isolés chez les animaux, les aliments, dans l'environnement, mais surtout chez les patients, devrait comprendre, non seulement l'approche par sérotype, mais plus largement par sérotypage. Au plan moléculaire, il conviendrait d'enrichir le niveau de caractérisation par la mise en œuvre de techniques de typage phagique pour les STEC O157, ainsi que l'identification du variant *stx* et la détection du gène *eae* à l'aide de méthodes harmonisées entre les pays pour les souches de STEC en général. Le typage moléculaire, par électrophorèse en champ pulsé par exemple, compléterait le dispositif en permettant, de plus, de comparer les différents isolats d'origine humaine et non humaine.

3.3.2. Surveillance de la chaîne alimentaire

Au niveau de la ferme, et en raison du coût et des difficultés que demandent de telles études, la recherche d'informations sur la diffusion des STEC dans l'environnement

pourrait être centrée sur les situations à haut risque, comme les fermes visitées par les écoliers.

A l'abattoir, le respect de bonnes pratiques d'hygiène, s'il permet de réduire les risques de contamination par les STEC, ne garantit pas leur absence. A ce niveau de la chaîne de production de la viande, des plans d'échantillonnage standardisés à l'échelon international devraient faciliter la comparaison des données obtenues dans différents pays. Les échantillons devraient être prélevés au niveau des fèces des animaux (après abattage), des carcasses, des cuirs ou encore des toisons.

Les prélèvements de fèces devraient être prélevés au niveau du rectum. Les données quantitatives ainsi récoltées reflètent le type de STEC présents chez les animaux présentés à l'abattoir et peuvent mettre en évidence les animaux super-excréteurs. Le cuir des bovins et la toison des petits ruminants représentent aussi une des principales sources de contamination en abattoir. Les échantillons prélevés notamment au niveau des oreilles ou de la poitrine peuvent refléter le niveau de contamination durant le transport des animaux.

Les échantillons de carcasses, quant à eux, fournissent un indicateur du niveau de contamination des muscles de l'animal. Le protocole européen de prélèvement microbiologique s'appliquant aux STEC (décision de la commission européenne 2001/471 et règlement 2073/2005), indique les sites où le prélèvement peut être effectué par excision ou par écouvillonnage.

Lors du désossement de la viande, le prélèvement d'échantillons crus permettrait de déterminer la prévalence et la concentration des différents sérotypes de STEC présents à l'entrée de la chaîne alimentaire. A ce niveau, c'est la contamination ayant lieu lors du lavage, de la réfrigération mais également lors du désossement qui serait mise en évidence.

La contamination fécale des aliments représente également un risque avéré d'infection à STEC (cf. les épidémies incriminant ce type de contamination). Le

contrôle des indicateurs microbiologiques au niveau de ces produits est donc également recommandé. Parmi les produits à risque, on trouve :

- La viande crue en tranches et les préparations à base de viande.
- Les viandes fermentées prêtes à être consommées (saucisson...).
- Les produits frais telles que les salades, les fruits.
- Le lait cru non pasteurisé et les produits laitiers dérivés notamment les fromages au lait cru.
- L'eau et les sources environnementales.

3.4. Evaluation des risques pour l'homme liés aux STEC

Pour illustrer comment une évaluation du risque d'infection humaine par des STEC peut être faite, nous pouvons nous fonder sur les résultats d'un travail d'Appréciation Quantitative des Risques (AQR) publiée en octobre 2007 par l'AFSSA, et intitulée : "Appréciation quantitative des risques liés à *E. coli* 0157: H7 dans les steaks hachés surgelés consommés en restauration familiale en France par les enfants de moins de 16 ans".

Cette AQR s'appuie sur, et complète le rapport d'expertise "bilan des connaissances relatives aux *E. coli* producteurs de shiga toxines", publié en 2003 par l'AFSSA, visant à identifier le danger représenté par les STEC. Cette AQR s'appuie sur la démarche décrite dans le *codex alimentarius*.

Les principes ayant présidé à la définition de cette AQR réalisée par le groupe d'experts du comité "microbiologie" (AFSSA/DERNS) mandaté par l'AFSSA ont reposé sur les éléments suivants :

- 1) La viande hachée de bœuf insuffisamment cuite et contaminée par *E. coli* O157:H7 est l'aliment le plus souvent en cause dans la survenue de cas sporadiques et d'épidémies d'origine alimentaire.

- 2) La définition de trois classes d'âges ([0 ; 5 ans[, [5 ; 10 ans [et [10 ; 16 ans [) est justifiée par les données bibliographiques sur lesquelles s'appuient les experts et la sensibilité plus forte des très jeunes enfants (moins de 5 ans).

3.4.1. But d'une AQR en général

De manière générale, la démarche d'une AQR consiste à estimer, à partir d'un danger identifié, le nombre de cas de l'effet morbide étudié dans la population, c'est à dire le risque. Cette estimation du risque s'appuie sur l'appréciation préalable de l'exposition au danger (ici la quantité ou dose de STEC à laquelle le consommateur est exposé) et de ses conséquences ou effets (probabilité d'un effet morbide en fonction de la dose =dose-réponse).

3.4.2. Mesure des différents indicateurs pris en compte dans cette AQR

Les trois étapes de l'analyse du risque (appréciation de l'exposition, appréciation des effets et estimation du risque) ont été décomposées en plusieurs étapes constituant des modules de réflexion successifs ou parallèles. Plusieurs groupes de travail, impliquant différents intervenants en fonction de leurs domaines d'expertise, ont été constitués pour traiter les modules de l'AQR. Les experts impliqués dans cet AQR ont commencé par analyser les travaux existant dans la littérature scientifique internationale, puis ils ont obtenu les données manquantes par des études complémentaires (sur la survie des STEC lors de la cuisson des steaks hachés) et enquêtes terrain (sur les habitudes alimentaires des consommateurs). Enfin, le risque a été estimé grâce à des modèles probabilistes s'adaptant le mieux aux données de terrain (épidémie française de 2005 liée à la viande de bœuf, notamment).

Les données concernant l'amont de la filière (élevage, abattoir, transport et découpe) n'ont pas été intégrées dans l'AQR en raison de leur faible nombre ou de leur origine (données américaines non transposables au contexte français par exemple).

3.4.2.1. *Appréciation de l'exposition*

Cette étape se décompose en 4 modules :

- a) L'estimation de la prévalence et du niveau de contamination des viandes hachées de bœuf.
- b) la consommation de steaks hachés surgelés en restauration familiale,
- c) les habitudes de cuisson des steaks hachés consommés par les enfants de moins de 16 ans,
- d) la destruction thermique des STEC dans les steaks contaminés.

Le premier module s'est appuyé sur 3 enquêtes publiées pour définir la distribution de la taille des portions de steaks hachés consommés par les 3 classes d'âge étudiées. Puis, les effectifs de ces classes d'âge ont été estimés pour la population française à partir des données de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques.

Ce chapitre a permis d'estimer, à partir des données françaises, la prévalence des STEC dans la viande hachée industrielle de bœuf. En situation habituelle, la concentration moyenne des STEC dans les steaks hachés varie de 5.10^{-5} ufc/g à $1,8.10^{-3}$ ufc/g dans les mêlées contaminées. Dans le cas d'une épidémie, la concentration peut être nettement plus élevée, comme pour l'épidémie de 2005, où la concentration moyenne en STEC a été estimée à 5,9 ufc/g.

Les quantités de steaks hachés surgelés consommées au domicile en fonction de la tranche d'âge des enfants ainsi que le niveau de cuisson choisi ont pu être établies grâce à une enquête basée sur un questionnaire montrant des photos de steaks cru, saignant, rosé et à point, et réalisée auprès des parents.

L'effet assainissant de la cuisson a été déterminé spécifiquement pour le mode de cuisson le plus souvent utilisé en France, c'est à dire la cuisson à la poêle avec un retournement. Les résultats obtenus au cours de ces essais confirment l'existence d'une hétérogénéité de la température dans le steak avec des variations entre steak

ayant un même aspect visuel (saignant, rosé ou à point). Les résultats obtenus permettant néanmoins de définir des intervalles de destruction des STEC pour les différents niveaux de cuisson.

La répartition des niveaux de cuisson (cru, saignant, rosé et à point) sur les 3 intervalles d'âge ont ainsi pu être mis en relation avec le niveau de réduction décimale du nombre de STEC dans des steaks hachés artificiellement contaminés, en fonction du niveau de cuisson choisi. Ainsi, seule la cuisson à point des steaks hachés surgelés permet de réduire de plus de 94% la quantité de STEC présent dans la viande. Or la cuisson à point n'est choisie qu'à 50, 27,3 et 23,8% respectivement pour les 3 groupes d'âge 0-5, 6-10 et 11-15 ans.

3.4.2.2. *Appréciation des effets*

Les effets de cette exposition aux STEC ont été estimés en fonction d'une loi dose-réponse. Il s'agit d'estimer 3 probabilités conditionnelles liées à la dose de STEC ingérée : la probabilité de décès, découlant de la probabilité de maladie elle-même, dépendante de la probabilité d'infection. Ces probabilités ont été estimées grâce aux données disponibles sur plusieurs épidémies à STEC, ainsi que des études menées sur des volontaires sains avec d'autres souches d'*E. coli* (EPEC) ou de *Shigella*, ou encore sur des lapins. Une approche confirmatoire a consisté à trouver les modèles mathématiques se rapprochant le plus des données ainsi compilées. Les auteurs ont retenus 3 modèles pour estimer la probabilité d'infection en fonction de la dose ingérée. Pour ce qui est de la probabilité de développer un SHU (en cas de maladie) les estimations des auteurs sont les suivantes : 8 à 12% pour les moins de 5 ans et 2 à 5% des enfants de 6 à 16 ans. La probabilité de décès est estimée entre 0,5 et 1% pour l'ensemble des enfants malades de moins de 16 ans.

3.4.2.3. *Estimation du risque*

Cette dernière estimation s'appuie sur les résultats obtenus dans les 2 chapitres précédents (appréciations de l'exposition et des effets) et les modèles mathématiques

retenus sont ceux permettant la meilleure corrélation entre les données épidémiologiques d'épidémies récentes et les valeurs théoriques attendues par les modèles. Les modèles disponibles dans la littérature avaient tendance à sous-estimer le nombre de cas de SHU chez les enfants de moins de 10 ans. La plus grande sensibilité des jeunes enfants aux STEC, ainsi qu'un effet dose-réponse, ont été pris en compte pour établir de nouveaux modèles mieux adaptés à la situation française.

Le risque individuel moyen de SHU chez les moins de 10 ans est ainsi estimé à 10^{-2} fois la concentration de STEC par gramme de mûlée crue. Par exemple, pour 5 bactéries/g, l'ordre de grandeur du risque est de 5%. La faiblesse des doses infectieuses des STEC (comparativement à d'autres pathogènes), estimée autour d'une dizaine d'UFC par g, explique pourquoi même en appliquant des conditions d'hygiène et de vérifications exigeantes, il reste difficile d'enrayer totalement le risque de contamination et donc d'infection, de développement d'un SHU et de décès.

3.4.3. Recommandations

Les principales recommandations auxquelles aboutit cette AQR sont les suivantes :

- 1) Les consommateurs devraient s'assurer que les steaks hachés destinés aux jeunes enfants soient cuits à cœur.
- 2) Les agences de sécurité sanitaires doivent concentrer leur effort sur :
 - a) la collecte de données relatant les diverses manifestations de la maladie
 - b) la mise en œuvre de moyens pour y parvenir
 - c) la mise en œuvre d'action à visée d'éducation de la population et des professionnels, notamment sur la manière de cuire les steaks hachés.

3.5. Prévention des infections à EHEC

Des actions préventives peuvent également être utiles pour réduire les risques d'infection et/ou de contamination par les STEC.

3.5.1. Au niveau individuel

Concernant le risque de transmission inter-humaine ou par contact avec les animaux ou leurs déjections, le meilleur conseil que l'on puisse donner aux adultes est de veiller à ce que les enfants se lavent les mains et évitent de porter leurs mains à leur bouche après avoir caressé des animaux de la ferme.

3.5.2. Au niveau des élevages

En plus du respect des règles d'hygiène de base, des dispositions d'ordre organisationnel peuvent aider à réduire le portage et l'excrétion fécale. Par exemple, le fait de repérer les animaux super-excréteurs peut permettre de les isoler du troupeau. Mais cela n'est pas toujours aisé à mettre en œuvre, les traitements étant souvent appliqués à tous les animaux d'un troupeau (Callaway, Anderson et al. 2004).

Certaines approches s'appuient également sur l'utilisation de probiotiques, de stratégies vaccinales (basées sur l'injection d'antigènes, comme l'intimine ou des protéines du TTSS), ou encore sur le changement de l'alimentation des bovins (Callaway, Anderson et al. 2004; Caprioli, Morabito et al. 2005). Par ailleurs, le nettoyage à sec des sols des élevages est préférable à celui à grande eau, qui favorise l'infiltration des STEC dans le sol et non leur élimination.

De plus, les abreuvoirs constituant une source de contamination (et de recontamination) au sein des troupeaux, leur nettoyage doit être effectué scrupuleusement (nettoyages fréquents, ozonation, chloration,...) (Callaway, Anderson et al. 2004).

3.5.3. Au niveau des abattoirs

Le portage fécal des STEC parmi les animaux à l'abattoir étant corrélé avec la contamination des carcasses, le maintien d'un bon niveau d'hygiène, ainsi que la mise

en place et le respect des principes HACCP en abattoir, est donc crucial (Callaway, Anderson et al. 2004; Caprioli, Morabito et al. 2005).

INTRODUCTION AU TRAVAIL DE THESE

Nous avons souhaité inscrire notre travail de thèse en contribution à la question très actuelle des critères qu'il convient, ou non, de considérer pour la définition de souches STEC pathogènes pour l'homme. En effet, la diversité des niveaux de dangerosité de ces souches pour l'homme, ainsi que la diversité des mesures de gestion à mettre en œuvre, ont conduit la communauté scientifique à produire divers avis et recommandations portant sur la définition des souches STEC pathogènes pour l'homme et les stratégies adaptées de surveillance du réservoir animal.

Dans ce cadre, nous avons proposé de contribuer à une meilleure connaissance de la question de la dangerosité des STEC O157:H7 pour l'homme, en explorant la corrélation pouvant exister entre la présence du gène *stx* chez de telles souches d'origine bovine, et la réalité de son expression.

Le travail de thèse s'est articulé autour de 3 phases successives :

1. Le choix de l'outil permettant la quantification de l'expression des toxines s'étant porté sur un test ELISA commercial - le test ProSpecT® Shiga toxin (OXOID)-, nous nous sommes attachés en premier lieu à conduire un travail de validation préalable de ce test.

2. Nous avons ensuite évalué les différents niveaux d'expression du gène *stx2* présent chez des souches STEC d'origine bovine. Cette quantification a également été conduite sur ces mêmes souches soumises à des concentrations sub-inhibitrices d'enrofloxacin, dont l'effet inducteur sur l'expression du gène *stx2* pouvait être pressenti, et mimant ainsi des conditions pouvant être retrouvées *in vivo* chez les bovins en suite de traitement par voie orale aux fluoroquinolones.

3. Nous avons enfin évalué l'expression du gène *stx2* chez certaines souches STEC présentant une résistance acquise aux fluoroquinolones, statut également rencontré *in vivo* en suite de l'usage des fluoroquinolones en élevage bovin, afin d'apprécier si la résistance de souches STEC à une molécule inductrice modifiait le niveau d'expression de ses gènes codant les shiga-toxines.

MATERIELS ET METHODES

1. Souches bactériennes

Les principales caractéristiques des 46 *E. coli* O157:H7/H7- isolées en abattoir que nous avons étudiées sont listées en annexe 2. Quarante trois d'entre elles ont été isolées et caractérisées dans une étude précédente menée au laboratoire (Andral, Aspan et al. 2004), les 3 souches restantes (HSVR 148, 149 et 150) ont été isolées en 2002 à partir d'échantillons issus de fèces de bovins en abattoir après immunoconcentration (VIDAS-ICE, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et isolement sur gélose MacConkey supplémentées en sorbitol (Oxoid) et sur gélose chromogène O157:H7 ID (BioMérieux). Pour ces trois souches, des colonies représentatives ont été testées et caractérisées biochimiquement sur galerie API20E (BioMérieux), puis immunologiquement par un test d'agglutination contre un sérum anti O157 (Oxoid). Enfin, un test d'agglutination a permis de vérifier si les souches appartenaient au sérotype H7 (Pro-Lab). Les souches de référence *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (*stx1*-, *stx2*-), ATCC 43895 (EDL933)(*stx1*+, *stx2*+), ATCC 43889 (*stx1*-, *stx2*+) et CIP 105283 (*stx1*+, *stx2*-) ont été utilisées comme contrôles.

2. Conservation des souches bactériennes

2.1. Congélation

A partir d'une culture pure sur gélose Columbia + 5% sang de mouton, un écouvillonnage de la moitié de la boîte est inoculé dans un cryotube (Nalgène)

contenant 1,5 ml de bouillon cœur cerveau (BHI pour "Brain Heart infusion") + 15% de glycérol stérile. Les suspensions sont ensuite congelés à -80°C .

2.2. Lyophilisation

A partir d'une culture pure sur gélose Columbia + 5% sang de mouton, un écouvillonnage de la moitié de la boîte est inoculé dans un tube à hémolyse contenant 3 ml de bouillon trypticase soja (TSB pour "trypticase soja broth") + sérum de cheval filtré (dans un rapport 1:3). Puis 500 μl du bouillon ainsi obtenu sont distribués par flacon de 2ml à lyophiliser. Les suspensions sont ensuite congelés au minimum 2 H à -80°C avant d'être lyophilisés.

3. Cultures bactériennes à partir d'échantillons congelés ou lyophilisés

3.1. Culture à partir de souches congelées

Les géloses Columbia + 5% de sang de mouton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), sontensemées avec un inoculum prélevé dans la suspension congelée à l'aide d'une oese d'un μl . Les boîtes de géloses sont ensuite incubées 18 à 24 H à 37°C .

3.2. Culture à partir de souches lyophilisées

Les souches lyophilisées sont resuspendues dans 500 μl d'eau ultrapure, puis des géloses Columbia + 5% sang de mouton sontensemées à l'aide d'un écouvillon. Les boîtes de géloses sont ensuite incubées 18 à 24 H à 37°C .

4. Caractérisation des souches bactériennes

4.1. Identification des *E. coli*

Pour confirmer qu'une souche appartient bien à l'espèce *E. coli*, plusieurs tests biochimiques sont réalisés.

4.1.1. Détermination des caractères lactose-glucose-H₂S sur milieu Kligler-Hajna

La méthode consiste à tester les caractères : fermentation du lactose, du glucose et production de gaz et d'H₂S chez une souche bactérienne, les caractères attendus pour *E. coli* étant H₂S-, gaz+, glu+ et lac+.

4.1.1.1. *Principe*

Ce milieu contient du glucose, du lactose, thiosulfate de sodium et sulfate ferreux (1987). L'indicateur de pH, le rouge de phénol, donne au milieu à pH7.5, sa couleur rouge orangé d'origine. Lorsque le pH s'acidifie, lors de la fermentation d'un sucre par exemple, il vire au jaune.

4.1.1.2. *Méthode*

La souche à tester est inoculée par étalement en épuisement sur gélose au sang de mouton puis les géloses sont incubées de 18 à 24 H à 37°C. Une colonie est inoculée par piqûre au niveau du culot de la gélose en pente et à sa surface par stries serrées et parallèles, pour avoir une culture en nappe puis les tubes de gélose sont incubés de 18 à 24 H à 37°C.

4.1.1.3. *Interprétation*

L'interprétation des résultats est la suivante :

- Si la surface inclinée vire au jaune, le lactose est fermenté (lac+).
- Si le culot vie au jaune, le glucose est fermenté (glu+).
- S'il y a production de gaz, il est possible d'observer, soit seulement quelques bulles, soit une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu du fond du tube (gaz+).
- S'il y a production d'H₂S on observe un noircissement du milieu dans la zone anaérobie joignant le culot à la pente (H₂S+).

4.1.2. Détermination des caractères urée-indole

4.1.2.1. *Principe*

La méthode consiste à tester les caractères uréase et production d'indole chez une souche bactérienne. Le milieu contient de l'urée et du tryptophane. L'indicateur de pH, le rouge de phénol, donne au milieu sa couleur initiale jaune orangé. L'hydrolyse de l'urée, par l'uréase, produit du carbonate d'ammonium qui fait virer au rouge l'indicateur de pH. En ajoutant 4-5 gouttes de réactif de Kovacs à la surface du milieu après 24 h, une couleur rouge apparaît si de l'indole est produit à partir du tryptophane.

4.1.2.2. *Méthode*

La souche à tester est inoculée par étalement en épuisement sur gélose au sang de mouton, puis les géloses sont incubées de 18 à 24 H à 37°C. Une colonie est inoculée dans un tube à hémolyse contenant environ 250 µl de milieu urée-indole, puis les tubes sont incubés de 18 à 24 H à 37°C.

4.1.2.3. *Interprétation*

Si le milieu à viré au rouge, la souche est urée+, s'il est toujours jaune, elle est urée-. Si en ajoutant 4-5 gouttes de réactif de Kovacs, un anneau rouge se forme à la surface du milieu, la souche est indole+ ; dans le cas contraire, elle est indole-. Les caractères attendus pour une souche *E. coli* sont : uréase – et indole -

4.1.3. Galerie API 20 E

Cette galerie est utilisée spécifiquement pour identifier les Entérobactériaceae et autres bacilles à Gram- non fastidieux.

Le couvercle et le fond d'une boîte d'incubation sont superposés et 5 ml d'eau distillée sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La galerie est alors sortie de son emballage, puis déposée dans la boîte d'incubation. L'inoculum est préparé par remise en suspension dans 5 ml d'eau physiologique stérile d'une colonie à identifier. A l'aide d'une pipette, la suspension bactérienne est introduite dans chaque tube de la galerie en l'inclinant légèrement vers l'avant pour éviter la formation de bulles au fond des tubes. Pour 3 tests : CIT, VP et GEL (testant respectivement l'utilisation du citrate, la production d'acétone et la diffusion dans de la gélatine), les tubes doivent être remplis au maximum, jusqu'à la cupule. Pour les autres tests, seuls les tubes sont remplis. Pour créer une anérobiose pour les tests ADH, LDC, ODC, URE et H₂S (testant respectivement la présence de l'activité enzymatique de l'argine D-hydrolase, de la lysine décarboxylase, de l'ornithine décarboxylase et de l'uréase, et la production d'H₂S), la cupule est remplie d'huile de paraffine. Une fois la boîte refermée, la galerie est incubée 18 à 24H à 37°C. La lecture s'effectue à l'aide des informations du fournisseur concernant l'interprétation de chaque test, en attribuant un chiffre pour chacun des tests, les chiffres sont ensuite additionnés par groupe de 3 ou de 2 permettant l'obtention d'un nombre à 7 chiffres. Le nombre total ainsi obtenu est interprété grâce au guide fourni par bioMérieux pour identifier l'espèce bactérienne de l'inoculum testé.

4.2. Mesure de la croissance bactérienne

4.2.1. Calibrage de la mesure de la croissance bactérienne par mesure d'absorbance

Une colonie de la souche HSVR149 a été incubée en milieu BHI pendant 3 H sous agitation à 180 rpm, jusqu'à ce que la culture soit en phase exponentielle de croissance. L'absorbance de la culture passant de 0.01 à 0.414 unité de DO à $t=3$ H. Deux millilitres de la culture ont servi à réaliser une dilution en cascade d'ordre 2 jusqu'au $1/512^{\text{ème}}$. La mesure de l'absorbance est réalisée à chacun des 10 points de la gamme. En parallèle, on dénombre sur gélose Colombia + 5% de sang de mouton les colonies isolées à partir de 50 ou 100 μl des mêmes points de la gamme préalablement dilués au 10^{-6} .

4.2.2. Cinétique de croissance sans antibiotique

La croissance des souches d'*E. coli* a été testée en BHI et en TSB. Cent microlitres ($2,5 \cdot 10^9$ CFU) de culture bactérienne en bouillon (BHI ou TSB) ayant poussé une nuit à 37°C sous agitation (180 rpm), sont dilués dans 100 ml de bouillon (respectivement BHI ou TSB) dans des bouteilles de 500 ou 1000 ml. Les suspensions bactériennes ainsi obtenues sont incubées à 37°C sous agitation (180 rpm) et 1 ml est prélevé à intervalle de temps régulier (généralement toutes les demi-H). A chaque point de la cinétique de croissance, l'absorbance à 600 nm de la culture est mesurée, sur les 1 ml de culture prélevé, à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec[®] 1100 *pro*). Dans les cas où la production de toxines est suivie en parallèle de la croissance bactérienne, 300 μl de la culture sont dilués au tiers dans le diluant du kit ELISA ProsPecT[®] Shiga toxin (comme indiqué dans le protocole ELISA) pour mesurer par la suite la production de toxine. L'échantillon est congelé à -20°C et le test ELISA est réalisé le lendemain pour l'ensemble des points de cinétique.

4.2.3. Cinétique de croissance en présence d'antibiotique

Les croissances avec antibiotique se font selon le même protocole que précédemment avec adjonction d'antibiotique aux concentrations de 0.1, 0.25, 0.5, ou 1 µg/ml dans les 100 ml de bouillon.

4.3. Détermination de la résistance aux antibiotiques

4.3.1. Antibiogramme

Pour chaque souche, un nombre adéquat de colonies est mis en suspension dans 5 ml de bouillon Mueller-Hinton (MH) (BioRad) dans un tube en verre pour obtenir une turbidité comprise entre 0,5 et 1 Mc Farland. A partir de cette suspension, une dilution au 1/100 dans 3 ml de bouillon MH est effectuée, puis des géloses coulées dans des boîtes carrées de 12 cm de côté, préalablement séchées 15 min à l'étuve à 37°C, sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon. L'étalement est réalisé en trois fois en ensemencant la moitié de la boîte et en effectuant une rotation à 90° de celle-ci entre deux étalements et en réimbibant l'écouvillon à chaque fois.

Les disques d'antibiotiques sont déposés selon le schéma indiqué en annexe 3.

Les boîtes sont incubées 18 à 24 H à 37°. Les boîtes sont ensuite passées dans un lecteur d'antibiogramme (SIR Scan) qui permet de déterminer les diamètres d'inhibition pour chaque antibiotique.

4.3.2. Détermination de la CMI par Etest

Pour chaque souche, un nombre adéquat de colonies est émulsionné dans 5 ml d'eau physiologique pour obtenir une turbidité de 0,5 Mac Farland. Une gélose Mueller-Hinton est ensemencée en écouvillonnant doucement la surface de la gélose dans trois directions. Sur la gélose parfaitement sèche, la bandelette Etest (BioRad,

Marnes La Coquette, France), contenant un gradient d'antibiotique, est déposée *échelle de concentration en antibiotique vers soi*, en prenant soin que toute la bandelette soit en contact avec la gélose. Les boîtes sont ensuite incubées sur leur couvercle 18 à 24 H à 37°C. La CMI en µg/ml correspond à la valeur de l'échelle graduée se situant à l'intersection de l'ellipse d'inhibition de croissance et de la bandelette.

La valeur indiquée correspond à la CMI de la souche pour cet antibiotique. L'interprétation de la valeur ainsi obtenue est réalisée selon les recommandations du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

Une ou plusieurs souches de référence sont également incluses pour vérifier le bon fonctionnement du test. Les valeurs de CMI obtenues pour ces souches doivent être comprises dans une fourchette de valeurs indiquée par le fournisseur.

La souche de référence utilisée pour l'acide nalidixique est *E.coli* CIP 7624 (ATCC 25922) et les souches utilisées pour l'enrofloxacin sont *S. aureus* CIP 7625 (ATCC 29213) et *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

4.4. Détermination du profil de virulence : PCR *stx* commun, *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehx*, *uida*

4.4.1. Préparation des échantillons d'ADN bouilli

Un millilitre de culture bactérienne est centrifugé à 13 000 rpm pendant 3 min 30 puis après élimination du surnageant, le culot bactérien est repris dans 1 ml d'eau ultrapure. La suspension ainsi obtenue est ensuite portée à ébullition pendant 15 min sur un bloc chauffant. Cinq microlitres d'ADN bouilli sont utilisés pour réaliser la PCR.

4.4.2. Extraction d'ADN total par kit QIA quick (Qiagen)

L'extraction est réalisée à partir de 5 ml de culture bactérienne en bouillon BHI incubée 18 à 24 H à 37°C. A la première utilisation du Kit, 125 ml d'éthanol absolu sont ajoutés au tampon AW1 et 160 ml d'éthanol absolu au tampon AW2. Deux millilitres de la culture sont centrifugés dans un tube eppendorf 10 min à 5000 rpm. Après avoir éliminé le surnageant par renversement, le culot est repris dans 180 µl de tampon ATL. Vingt microlitres de protéinase K y sont ajoutés avant de vortexer l'ensemble, et d'incuber au bain-marie à 56°C jusqu'à l'obtention d'un liquide transparent (1 heure environ). Après mélange, 200 µl de tampon AL sont ajoutés, puis la suspension est mise à incuber pendant 10 min à 70°C. Puis, 200 µl d'éthanol absolu sont ajoutés et le mélange ainsi obtenu est vortexé avant d'être transféré dans une colonne de filtration fournie dans le kit. Cette dernière est centrifugée 1 min à 8000 rpm. Après avoir changé le tube sous la colonne, 500 µl de AW1 sont ajoutés. La colonne est à nouveau centrifugée 1 min à 8000 rpm. Après avoir changé le tube sous la colonne, 500 µl de AW2 sont ajoutés et la colonne est centrifugée 3 min à 13200 rpm. Après avoir vidé le tube sous la colonne, une centrifugation à vide de 1 min à 13200 rpm est effectuée.

Pour l'étape d'élution, la colonne est placée dans un tube eppendorf propre pour récupérer l'ADN. 200 µl de tampon AE sont ajoutés dans la colonne qui est alors incubée 1 min à température ambiante avant d'être centrifugée 1 min à 8000 rpm. Une seconde fois, 200 µl de tampon AE sont ajoutés dans la colonne qui est alors incubée 1 min à température ambiante avant d'être centrifugée 1 min à 8000 rpm. La concentration en ADN de l'éluat est calculée comme étant la mesure de l'absorbance à 260 nm X 50 exprimée en ng/µl. La pureté des acides nucléiques ainsi extraits est vérifiée en calculant le ratio de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280 nm. Pour des acides nucléiques purs, ce rapport est compris entre 1.7 et 1.9.

Cinq microlitres d'ADN total à 1 µg/ml sont utilisés pour réaliser la PCR comme indiqué ci-dessous.

4.4.3. PCR

Cinq microlitres d'ADN total à 10 ng/μl ou d'ADN bouilli sont utilisés pour réaliser la PCR. Les couples d'amorces utilisés ainsi que les programmes de PCR correspondants sont listés en annexe 4.

4.4.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

La vérification des PCR se fait par électrophorèse. Pour chaque échantillon et pour le marqueur de poids moléculaire, respectivement 10 μl et 5 μl sont ajoutés à 3 μl d'un tampon de charge au bleu de bromophénol 3X. Les échantillons et le marqueur de taille sont déposés dans un gel d'agarose TBE 1X à 0.8% d'agarose marqué au BET, la migration s'effectuant à 100 V durant 1 H 30. Après migration, le gel est révélé et photographié sous UV.

5. Quantification de la production de toxines Stx

5.1. Préparation des gammes de dilution d'antibiotique pour la culture en bouillon

Les gammes de dilution d'antibiotique sont préparées à partir de poudres diluées dans du NaOH à 1%.

5.1.1. Préparation de la gamme de dilution d'enrofloxacin

L'enrofloxacin en poudre (BioChemika) est pesée, puis dissoute dans 2,5 ml de NaOH à 20% + 47,5 ml d'eau ultra-pure stérile, de façon à obtenir 50 ml de solution mère de concentration égale à 2 mg/ml (pureté 98%, 102.04 mg). La gamme de

dilution est réalisée à partir de la solution mère comme indiqué en annexe 5. Des aliquots de ces dilutions sont conservés à -20°C .

5.1.2. Préparation la solution d'acide nalidixique

L'acide nalidixique en poudre est pesé, puis dissout dans 2,5 ml de NaOH à 20% + 47,5 ml d'eau ultra-pure stérile, de façon à obtenir 50 ml de solution mère de concentration égale à 20 mg/ml (pureté >99%, 1010,1 mg). La gamme de dilution est réalisée à partir de la solution mère comme indiqué en annexe 5. Des aliquots de ces dilutions sont conservés à -20°C .

5.2. Induction de l'expression des toxines par les antibiotiques

Pour chaque souche, une colonie est inoculée dans 2 ml de BHI. Les cultures bactériennes sont ensuite incubées 3 à 4 H à 37°C . Après avoir mesuré l'absorbance des cultures bactériennes à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec[®] 1100 *pro*), une dilution en BHI est effectuée à partir de chaque suspension, pour obtenir 2 ml d'une suspension en milieu BHI à $\text{DO} = 0.115$. Puis, 200 μl de culture sont distribués dans chaque tube de milieu + antibiotique, la suspension ainsi obtenue ayant une concentration en bactéries de 10^7 cfu/ml (soit $\text{DO} = 0.01$). Une suspension sans antibiotique est utilisée pour suivre la croissance bactérienne en absence d'antibiotique. Les cultures sont ensuite incubées 4 H ou 24 H à 37°C sous agitation à 180 rpm. L'absorbance à 600 nm est ensuite mesurée pour chaque souche et 250 μl de culture sont dilués au tiers dans la solution de dilution des échantillons bactériens du kit ELISA, puis congelés à -20°C pour être testés par ELISA le lendemain.

5.3. Protocole ELISA ProSpect® Shiga toxin à partir d'une suspension bactérienne en bouillon de culture

5.3.1. Préparation des échantillons pour l'ELISA

Après culture sur gélose Colombia + 5% de sang de mouton, 18 H à 37°C, une colonie de la souche bactérienne est inoculée dans 2 ml de bouillon BHI qui est alors incubé 4 H à 37°C. De ces 2 ml de culture, 300 µl sont utilisés comme indiqué précédemment dans le protocole ELISA.

5.3.2. Préparation des gammes de toxine purifiée pour l'ELISA

Les toxines Stx purifiées (Sigma Aldrich) sont à 100 ng/µl dans un tampon Tris 0.1 M pH 8.6 + NaCl 0.1 M. Les gammes de dilution sont effectuées dans le même tampon Tris + NaCl à partir d'aliquots de 3 µl congelés à -80°C.

5.3.3. 5.3.3. Réalisation du test ELISA

Nous avons utilisé le test commercial ProSpect® Shiga toxin ELISA kit (Oxoid, Dardilly, France) et suivi le protocole du fournisseur.

Les suspensions bactériennes ou la toxine purifiée sont dilués au tiers à l'aide du diluant pour échantillons bactériens fourni dans le kit (300 µl ou 250 µl de culture bactérienne dans 600 µl ou 500 µl de diluant). Pour chaque échantillon et les témoins négatif et positif fournis dans le kit, 200 µl sont déposés dans un puits de la microplaque, qui est ensuite couverte pour être incubée 1 H à température ambiante. Ensuite, les puits sont vidés par retournement et tapotement de la microplaque. Trois lavages de la plaque à l'aide de la solution de lavage 10X fournie diluée au dixième dans de l'eau ultra pure sont effectués. Puis, la plaque est tapotée sur papier absorbant pour éliminer le maximum de solution de lavage, le liquide résiduel est ôté des puits à l'aide de pipettes stériles. Quatre gouttes de conjugué enzymatique sont

ajoutées dans chacun des puits et la plaque est alors couverte et incubée 30 min à température ambiante. Une nouvelle série de 5 lavages est effectuées, suivie du séchage et de l'élimination des résidus de solution de lavage à la pipette. La révélation du test est ensuite effectuée en ajoutant quatre gouttes de substrat enzymatique dans chacun des puits. Après incubation 10 min à température ambiante, la réaction colorée est stoppée à l'aide d'une goutte de solution d'arrêt. La lecture de la plaque à 450/650 nm est effectuée immédiatement après avec un lecteur de plaque ELISA (Thermomax®). Le test est considéré comme valide lorsque l'absorbance est inférieure à 0.07 pour le témoin négatif et supérieure à 0.1 pour le témoin positif.

5.4. Variation de la production de toxine après élimination de l'enrofloxacin

Pour tester l'effet de la suppression de l'antibiotique dans le milieu sur l'expression de la toxine, 1.5 ml de chaque culture sont transférés dans un eppendorf de 2 ml. La suspension bactérienne est alors lavée 3 fois par centrifugations de 15 min à 4°C, puis le culot est repris dans du milieu BHI sans antibiotique.

Puis, 222 µl de cette suspension sont dilués dans 2ml de BHI, la suspension bactérienne étant ensuite incubée 3 H à 37°C sous agitation à 180 rpm. L'absorbance à 600 nm de chaque culture bactérienne est mesurée et 250 µl de chaque culture sont dilués dans 500 µl de diluant bactérien ProsPecT® Shiga toxin avant d'être congelés à -20°C pour être testés par ELISA le lendemain. Le restant des cultures est remis à incuber encore 13 H, à 37°C sous agitation à 180 rpm. L'absorbance à 600 nm de chaque culture bactérienne est mesurée et 250 µl de chaque culture sont dilués dans 500 µl de diluant bactérien ProsPecT® Shiga toxin avant d'être testés par ELISA en même temps que les échantillons de la veille mis à décongélés à température ambiante environ 30 min avant de réaliser l'ELISA.

6. Sélection de STEC résistants à l'acide nalidixique et à l'enrofloxacin

6.1. Préparation des milieux de sélection

6.1.1. Préparation des géloses

Trente quatre grammes de gélose M-H en poudre sont dissous dans un litre d'eau ultra-pure, puis portés à ébullition. La gélose est ensuite répartie par aliquots de 19 ml dans des tubes en verre. Ces derniers sont mis à autoclaver 15 min à 121°C. Une fois refroidis, les tubes de gélose sont stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation n'excédant pas une durée maximum de 2 semaines après stérilisation.

6.1.2. Préparation des gammes de dilution d'antibiotique pour la culture en gélose

Les gammes de dilution d'antibiotique sont préparées à partir de poudres diluées dans du NaOH à 1%.

6.1.2.1. Préparation de la gamme de dilution d'enrofloxacin

L'enrofloxacin en poudre est pesée (BioChemika), puis dissoute dans 2.5 ml de NaOH à 20% + 47.5 ml d'eau ultra-pure stérile, de façon à obtenir 50 ml de solution mère de concentration égale à 2 mg/ml (pureté 98%, 102.04 mg). La gamme de dilution est réalisée à partir de la solution mère comme indiqué en annexe 6. Des aliquots de ces dilutions sont conservés à -20°C.

6.1.2.2. *Préparation la solution d'acide nalidixique*

L'acide nalidixique est pesé, puis dissout dans 2,5 ml de NaOH à 20% + 47,5 ml d'eau ultra-pure stérile, de façon à obtenir 50 ml de solution mère de concentration égale à 20 mg/ml (pureté >99%, 1010,1 mg). La gamme de dilution est réalisée à partir de la solution mère comme indiqué en annexe 6. Des aliquots de ces dilutions sont conservés à -20°C.

6.2. Préparation des boîtes de gélose supplémentée en antibiotique

Les boîtes de gélose M-H avec antibiotique sont préparées le jour de leur utilisation à partir des tubes de gélose M-H mise à fondre au bain-marie à 95°C, puis maintenues en surfusion au bain-marie à 56°C jusqu'au moment de les couler.

Un millilitre de solution d'antibiotique à la concentration voulue est ajouté aux 19 ml de gélose Mueller-Hinton en surfusion à 56°C. Après avoir été bien homogénéisé, le tout est coulé dans une boîte de Petri de 9 cm de diamètre. Une boîte témoin est préparée à partir de 1 ml de solvant utilisé pour dissoudre l'antibiotique (NaOH 1%). Après avoir laissé solidifier la gélose sur la paillasse, les boîtes sont séchées 15 min à 37°C dans l'étuve (boîtes ouvertes renversées) ou sur la paillasse près du bec (dans le cône de stérilité) avant d'y étaler les bactéries.

6.3. Sélection des souches résistantes par repiquages successifs

Dix microlitres de la culture en bouillon BHI sont étalées sur milieu sélectif, puis les boîtes de gélose sont incubées 18 à 24 H à 37°C. Parmi les colonies ayant poussé sur le milieu sélectif, quelques unes sont repiquées individuellement dans 2 ml BHI et incubées pendant 3 à 4 H sous agitation (180 rpm) à 37°C. Une fraction du bouillon est étalée sur gélose au sang Columbia + 5% de sang de mouton pour pouvoir

congeler la souche ainsi isolée à -80°C , puis réaliser des Etest permettant de mesurer leur niveau de résistance à différents antibiotiques (enrofloxacin, acide nalidixique). Par ailleurs, 10 μl de la culture sont étalés sur la boîte à la concentration directement supérieure à celle du milieu ayant permis la sélection de la souche. Puis, les étapes sont répétées comme indiquées ci-dessus jusqu'à obtention de souches ayant les niveaux de résistance recherchés.

RESULTATS

Notre travail avait pour but d'adresser la question de la dangerosité potentielle de souches STEC d'origine bovine, et plus particulièrement de souches d'*E. coli* de sérotype O157:H7/H-, et ce dans le contexte de l'usage d'antibiotiques vétérinaires pouvant induire l'expression des shiga toxines Stx.

Nous avons choisi de quantifier l'expression des toxines par un test ELISA commercial détectant spécifiquement les shiga toxines, le test ProSpecT® Shiga toxin (OXOID). Nous présenterons dans une 1^{ère} partie l'ensemble des résultats de validation préalable de ce test (mise au point des conditions de culture et de croissance bactérienne, analyse des performances du test ELISA).

Nous exposerons dans une 2^{ème} partie les résultats de quantification de l'expression des toxines *in vitro* dans un panel de souches de choisis. Les niveaux d'expression en présence ou en l'absence d'induction, principalement par une fluoroquinolone vétérinaire, l'enrofloxacin, seront comparés.

Dans une 3^{ème} partie, nous présenterons les résultats concernant l'expression de ces toxines par des souches présentant une résistance acquise aux fluoroquinolones. Ces résultats concernent en premier lieu une recherche par PCR spécifique des gènes stx chez 113 souches d'*E. coli* résistants aux quinolones et/ou fluoroquinolones issues de diarrhées néo-natales de veaux. Cette recherche étant restée infructueuse, nous présenterons les résultats de sélection *in vitro* de mutants résistants à l'acide nalidixique et à l'enrofloxacin à partir de certaines souches de notre collection. Enfin, les résultats de l'effet de ces antibiotiques sur l'expression de la toxine chez ces souches résistantes seront détaillés et comparés avec ceux obtenus à partir des souches natives.

Ces résultats ont fait l'objet de 2 publications parues et d'une communication orale à la 29^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (Paris, 3-4 décembre 2009):

- 1) Characterization of inducible *stx2*-positive *Escherichia coli* O157:H7/H7- strains isolated from cattle in France (2008) **C. Maurer**, C. Lazizzera and J. Y. Madec, *Journal of Applied Microbiology*; 104 (6) : 1569-76
- 2) Shiga toxin Stx2 production is promoted by enrofloxacin in experimental in vitro-selected mutants of *Escherichia coli* O157:H7 resistant to fluoroquinolones (2009) **C. Maurer**, D. Meunier and J. -Y. Madec, *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (2): 257-259
- 3) Impact de l'antibiothérapie vétérinaire sur la virulence et la résistance d'*Escherichia coli*. (2008) **C. Maurer**, C. Lazizzera, P. Châtre, D. Meunier, J.-Y. Madec. 29^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris. Communication orale invitée.

1. Validation du test ELISA ProsPect[®] shiga toxin

La mise en évidence du niveau de production de la toxine Stx *in vitro* est principalement conditionnée par deux paramètres majeurs. Le premier est relatif aux conditions de culture de la cellule productrice, dans la mesure où la quantité de toxines exprimées dépend du milieu de culture choisi et de la phase de croissance des bactéries. Le second est lié aux performances intrinsèques du test, et en particulier aux niveaux de variabilité éventuels intra- et inter-lots.

1.1. Remarque préliminaire sur l'estimation de l'incertitude des mesures

Afin d'estimer la variabilité de nos résultats, nous nous sommes appuyés sur un indicateur, le coefficient de variation (CV). CV est une mesure de la dispersion relative des observations d'une variable quantitative. C'est le rapport de l'écart-type (ET) d'une distribution, sur la moyenne (Moy) des valeurs de cette distribution ($ET/Moy = CV$).

Sans unité et souvent exprimé en pourcentage, il permet de comparer facilement la dispersion de distributions ayant des échelles de mesure différentes (ce qui est le cas avec nos résultats). L'objectif du coefficient de variation est de fournir un indice quantitatif permettant cette comparaison. Cette mesure nous est apparue beaucoup plus pertinente à interpréter que l'écart-type parce qu'elle ne dépend pas de l'amplitude des observations, tout en donnant une bonne représentation de la réalité. Ainsi, le calcul du CV, plutôt que celui de la variance, a été utilisé pour l'analyse des résultats ci-dessous.

1.2. Cinétique de croissance bactérienne

Nous avons en premier lieu déterminé la cinétique de croissance des souches choisies en fonction de deux milieux de culture différents, puis et établi une calibration des mesures de turbidité des cultures bactériennes.

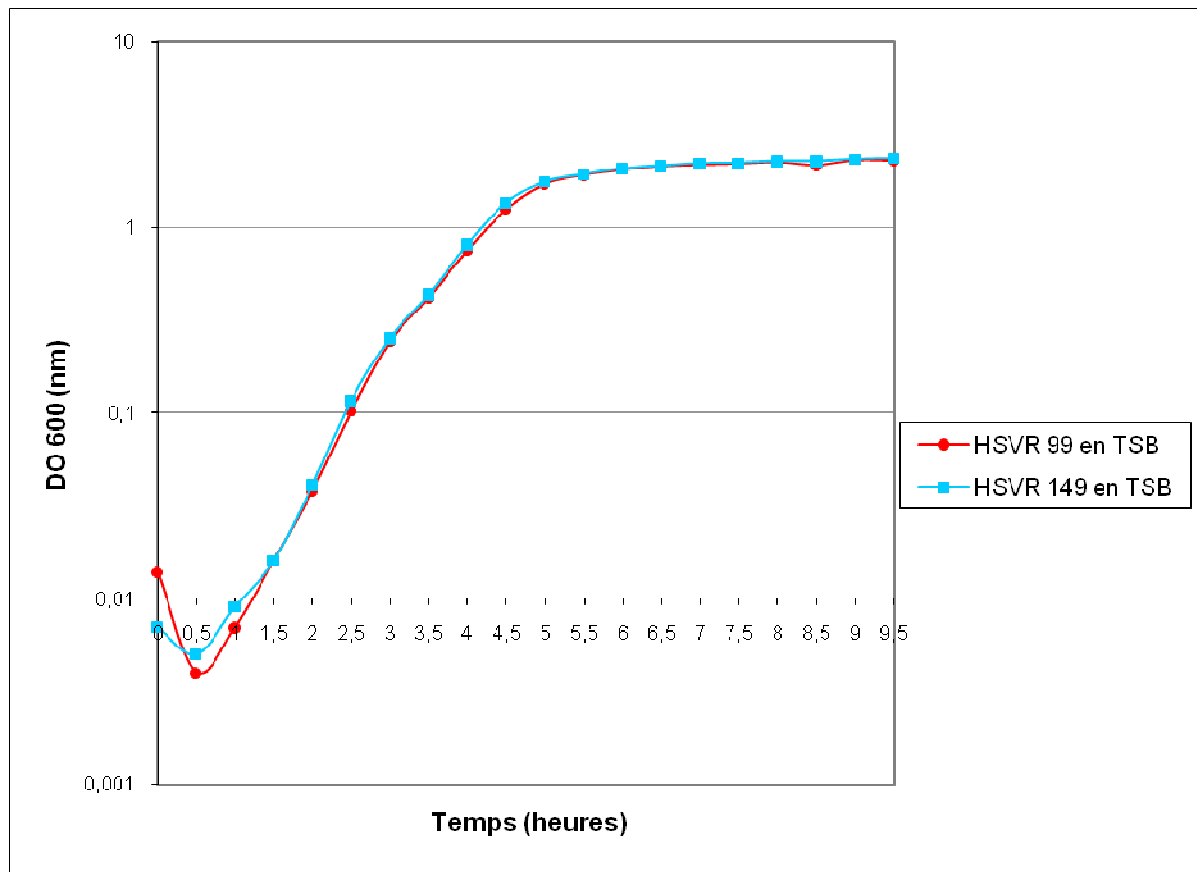
1.2.1. Effet du milieu de culture sur la croissance bactérienne

Afin de définir la durée d'incubation et le type de milieu nutritif à utiliser, nous avons tout d'abord effectué des cinétiques de croissance de plusieurs souches (dont les souches HSVR 99 et HSVR 149) sur deux milieux de culture classiques : BHI (cœur-cervelle) et TSB (trypticase soja).

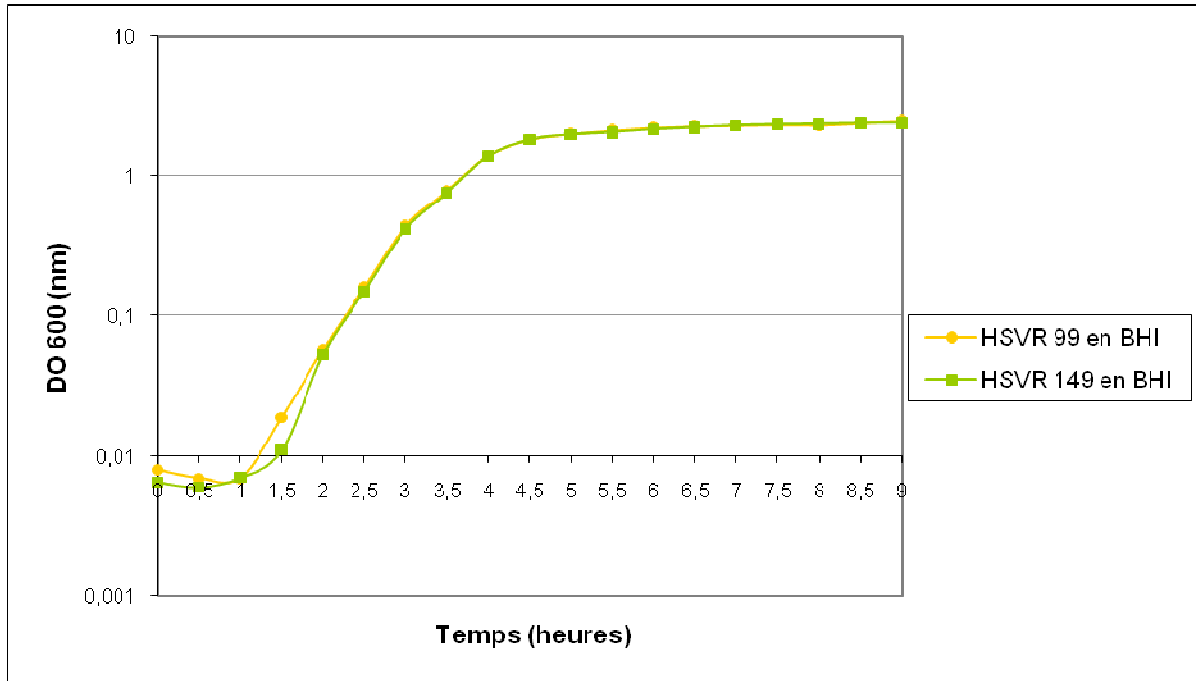
Plusieurs séries de cinétiques de croissance ont été réalisées, comprenant la culture d'une même souche dans 2 milieux différents (BHI ou TSB) et celle de 2 souches différentes cultivées dans le même milieu nutritif. Les courbes de croissance obtenues pour les souches HSVR 99 et 149 sont présentées fig. R.1

Fig. R.1 : Courbes de croissance

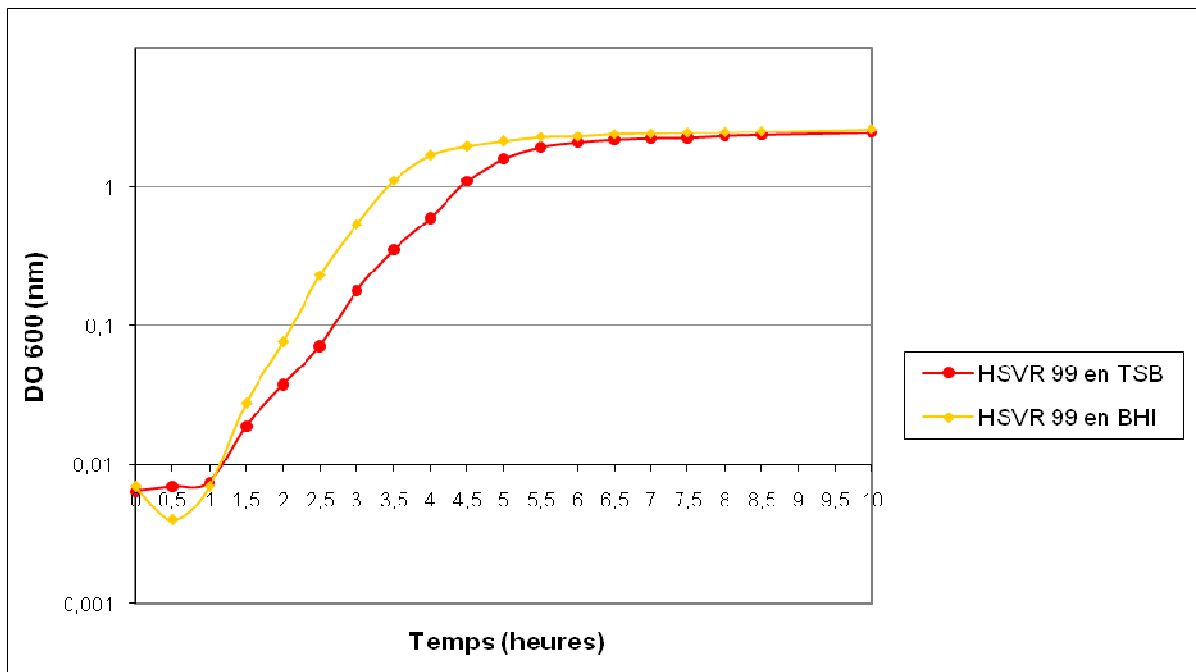
A. Courbes de croissance des souches d'*E. coli* 0157:H7 HSVR 99 et HSVR 149 en TSB à 37°C



B. Courbes de croissance des souches HSVR 99 et 149 en BHI



C. Courbes de croissance des souches HSVR 99 en TSB et en BHI



Pour un même milieu de culture (TSB ou BHI), sur le panel de souches testées, nous avons pu observer une croissance analogue (fig R.1 A et B). En revanche, pour une même souche (HSVR 99), sur les 2 types de milieux testés, un décalage de la courbe de croissance a été observé (fig R.1 C), la phase exponentielle de croissance étant atteinte plus rapidement en milieu BHI. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi ce milieu qui, à performances de croissance comparables, représentait un gain de temps pour l'exécution de nos expériences.

1.2.2. Calibration de la mesure de densité optique par rapport à la numération des cellules cultivables

Nous avons suivi la croissance bactérienne par mesure de la densité optique à 600 nm, qui constitue la méthode indirecte classique donnant l'évaluation la plus immédiate de la croissance. Pour obtenir des résultats fiables et exploitables, plusieurs aspects ont été considérés.

L'absorbance mesurée tenant compte de divers paramètres (taille des bactéries, état d'hydratation et agglutination éventuelle) et la turbidité étant inversement proportionnelle au volume de la cellule bactérienne, il apparaissait essentiel de se placer dans des conditions où le volume cellulaire moyen reste constant, cette condition n'étant obtenue qu'en phase exponentielle de croissance.

De plus, dans ces conditions de culture exponentielle, la proportion de cellules non cultivables est faible et la densité optique peut alors être considérée comme proportionnelle au nombre de bactéries avec une précision acceptable. Pour une cuve de spectrophotométrie donnée, cette relation de proportionnalité est définie par la loi de Beer Lambert comme suit :

$$A = \log (I_0/I) = k.C$$

A représente l'absorbance, I_0/I l'intensité de la lumière transmise/intensité du faisceau de lumière réfléchi, k le coefficient d'absorption en ml/bactérie et C la concentration en bactéries/ml.

Afin de déterminer la relation entre l'absorbance et le nombre de cellules bactériennes par unité de volume correspondant, et donc le coefficient k spécifique du spectrophotomètre utilisé au laboratoire (Ultra Spec 1100 Pro), la méthode de référence de numération des cellules cultivables a été utilisée. Pour ce faire, nous avons réalisé en parallèle, des mesures d'absorbance à 600nm et la numération des cellules viables pour chaque point d'une gamme de dilution d'une culture d'*E. coli*. Les résultats obtenus sont présentés Tableau R.1 et fig. R.2.

Tableau R.1 : Dénombrement d'*E.coli* HSVR 149 en fonction de l'absorbance mesurée en bouillon BHI

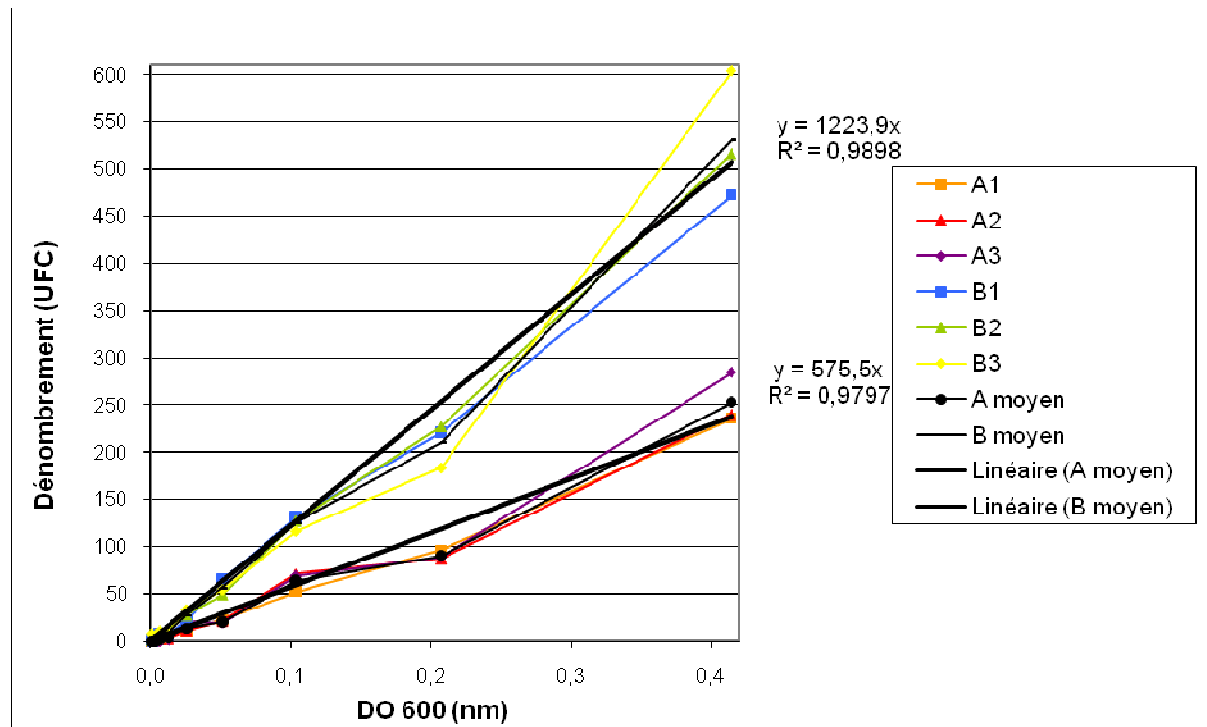
Dilution ordre 2	Valeurs de DO mesurées ou calculées					UFC/boîte (dilution au 10 ⁻⁵ , étalement A=50µl, B=100µl)								Moy UFC/ml DO _{600nm} = 1
	DO1	DO2	DO3	DO moy	DO théo	A1	A2	A3	A moy	B1	B2	B3	B moy	
1	0,430	0,411	0,402	0,414	0,414	235	240	284	253	472	516	604	531	1,25E+09
½	0,198	0,22	0,217	0,212	0,207	96	87	89	91	221	227	183	210	9,45E+08
¼	0,102	0,105	0,104	0,104	0,104	52	71	69	64	131	127	116	125	1,22E+09
1/8	0,050	0,046	0,044	0,047	0,052	22	21	19	21	65	49	54	56	9,40E+08
1/16	0,015	0,019	0,023	0,019	0,026	10	11	20	14	21	27	33	27	1,05E+09
1/32	0,005	0,005	0,006	0,005	0,013	6	3	2	4	7	12	9	9	6,44E+08
1/64	0,009	0,004	0,001	0,005	0,006	3	4	0	2	8	4	10	7	9,27E+08
1/128	0,008	0,005	0,003	0,005	0,003	1	1	0	1	3	6	4	4	8,75E+08
1/256	0,004	0,003	0,009	0,005	0,002	1	0	0	0	0	2	1	1	5,15E+08
1/512	0,004	0,008	0,003	0,005	0,001	0	1	0	0	1	1	7	3	2,27E+09
													Calcul	1,08 E+09
													Méthode graphique	1,19 E+09

moy = moyenne, théo = théorique

La DO_{600nm} théorique est calculée sur la base de la DO_{600nm} mesurée pour l'échantillon non dilué divisé par le facteur de dilution

En vert les mesures de DO prises en compte pour le calcul de la relation DO_{600nm}/nombre d'UFC

Fig. R.2 : Représentation graphique du nombre d'UFC par unité de DO_{600nm} théorique



Dans ce calcul, seuls ont été pris en compte les points de la gamme de dilution pour lesquels la DO_{600nm} mesurée est restée proche de la DO théorique attendue (valeur de la DO de l'échantillon non dilué divisé par le facteur de dilution) et pour lesquels le nombre de colonies sur boîte était supérieur à 10 UFC (jusqu'à la dilution au 1/16^{ème} inclus). Le calcul théorique permet alors d'obtenir la relation suivante : 1 unité de DO mesurée avec le spectrophotomètre Ultrospec 1100 Pro dans les conditions précitées (*E. coli* en phase exponentielle de croissance en bouillon BHI) correspond à environ 1.10^9 UFC/ml (et donc $k = 1.10^{-9}$ ml/UFC).

Pour l'ensemble de nos mesures d'absorbance à 600nm, nous avons tenu compte des recommandations du fabricant du spectrophotomètre et dilué les échantillons si nécessaire pour avoir une absorbance comprise entre 0,05 et 0,3. Le choix de diluer ou non un échantillon a été réalisé sur appréciation visuelle au cas par cas, la turbidité visible à l'œil nu correspondant environ à une absorbance à 600 nm de 0,2.

1.3. Analyse des performances intrinsèques du test ELISA ProsPecT[®] Shiga toxin

Une étape importante de notre travail a consisté à analyser les niveaux de performance intrinsèque de la technique que nous comptons utiliser pour notre étude, étape préalable indispensable à son utilisation pour quantifier l'expression des toxines Stx par des souches d'*E. coli* O157:H7/H-. Ces analyses préliminaires nous ont permis d'apprécier en particulier les conditions dans lesquelles ce test pouvait être considéré comme quantitatif et quel était son niveau de reproductibilité.

1.3.1. Préparation de l'échantillon bactérien pour le test ELISA

Le protocole de ce test, défini par le fabricant, s'applique à des échantillons fécaux dilués ou non dans un bouillon de culture. Nous avons donc voulu vérifier que nous pouvions obtenir des résultats exploitables avec des souches pures *E. coli* O157:H7 cultivées en milieu BHI. Pour cela, nous avons testé plusieurs souches stx+ de notre panel (HSVR 11, HSVR 99 et HSVR 149) et la souche de référence CIP 105283, ainsi que le témoin négatif stx- ATCC 43888 en suivant le protocole du fournisseur après dilution dans du bouillon BHI. L'échantillon bactérien est dilué au tiers dans le diluant fourni dans le kit du fabricant. Le résultat du test nous est donné par l'interprétation de la valeur d'absorbance mesurée à 450/650nm : un résultat $>0,1$ étant considéré comme positif, $<0,07$ comme négatif et les résultats se trouvant entre ces 2 bornes comme incertains. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau R.2.

Un résultat positif a été clairement obtenu pour les 4 souches *stx+* cultivées en bouillon BHI. Ce milieu ne semble donc pas créer d'interférence ou inhiber les réactifs du test ELISA. Les taux de toxines exprimées par les souches purifiées sont également suffisants pour être détectées. Par ailleurs, la souche de référence ATCC 43888, qui ne possède pas de gène *stx*, donne un signal négatif tel qu'attendu. Le milieu BHI ne semble pas créer non plus de réactions faussement positives.

Tableau R.2 : Evaluation de l'expression de la toxine Stx à partir de cultures bactériennes en bouillon BHI

N° HSVR/CIP	DO 600nm	DO 450/650nm (éch dilué DO _{600nm} = 1)
T+	sans objet	2,143
T-	sans objet	0,047
11	2,03	1,761
99	2,14	1,331
149	1,3	1,408
CIP 105283	1,93	0,896
ATCC 43888	1,75	0,031

Les données relatives aux souches donnant un résultat positif en ELISA (DO 450/650nm > 0,1) sont représenté sur fond jaune et celles donnant un résultat négatif (DO 450/650nm < 0,07) sur fond blanc

T - : témoin négatif fourni par le fabricant

T+ : témoin positif fourni par le fabricant

DO 600nm correspond à la DO de la culture bactérienne mesurée à la fin des 4 heures de croissance et **DO 450/650nm** à la mesure du test ELISA

éch dilué DO_{600nm} = 1 : signifie que les échantillons bactériens ont été dilués de telle manière que leur DO à 600nm soit de 1 unité de DO

Dans la suite de ce manuscrit, quand cela semblait contribuer à une meilleure visualisation des résultats obtenus, nous avons représenté sur fond jaune clair les résultats ELISA considérés comme positifs (DO_{450/650nm} > 0,1). Les valeurs sur fond blanc correspondent à un résultat négatif au test ELISA (DO_{450/650nm} < 0,07). Enfin, les résultats se situant dans la zone d'incertitude entre 0,07 et 0,1 unité de DO ont été représentés sur fond bleu.

Au final, pour la mise en œuvre du test ELISA sur souches pures, nos échantillons issus de cultures bactériennes en milieu BHI ont donc été préparés comme indiqué dans le protocole du fabricant selon la méthode du bouillon de culture.

1.3.2. Effet sur l'absorbance mesurée du volume de substrat enzymatique

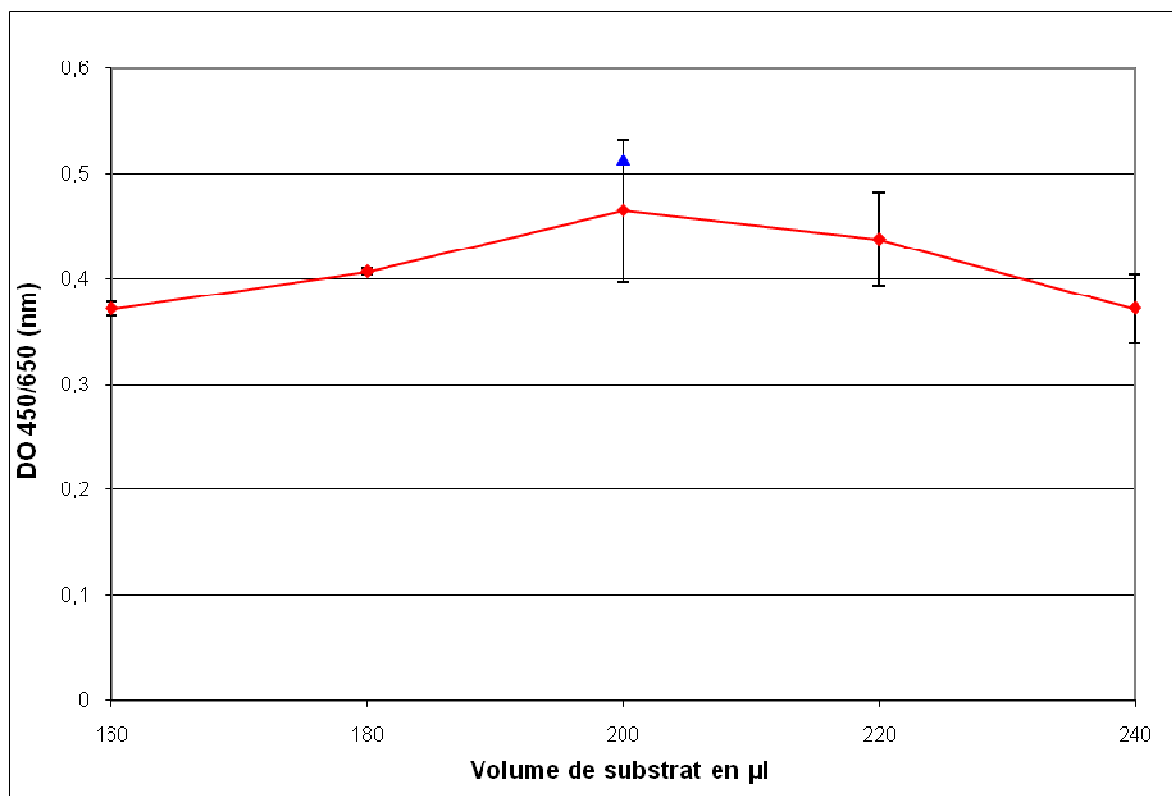
Nous avons aussi voulu vérifier si le volume de substrat ajouté pouvait modifier le niveau d'absorbance final. Les volumes réactionnels étant dosés par un flacon avec goutte à goutte, nous voulions savoir si les variations du volume distribué pouvaient influencer sur l'absorbance mesurée et si oui, dans quel ordre de grandeur. En effet, ce réactif étant sensible à la lumière, nous ne souhaitons pas transférer le substrat dans un autre récipient, qui aurait éventuellement permis un dosage plus précis du volume, mais pouvait risquer d'en altérer la conservation.

Nous avons pour cela testé en double une même suspension bactérien avec plusieurs volumes de substrat enzymatique : volume équivalent au 4 gouttes préconisées dans le protocole soit 200 μl , +/- 10% et +/- 20% soit respectivement 220, 180, 240 et 160 μl . Nous avons également réalisé 2 puits avec dosage à l'aide du compte goutte (4 gouttes comme indiqué dans le protocole). Pour éliminer un autre facteur de variabilité, les 50 μl de la solution d'arrêt (soit une goutte) ont été mesuré à la micropipette et non à l'aide du compte goutte. Le volume de conjugué enzymatique, quant à lui, a été mesuré au compte goutte. En effet, étant donné qu'il est utilisé en quantité saturante, nous avons considéré que l'incertitude de volume dû à son pipetage à l'aide du compte goutte n'avait pas d'impact sur ce que nous voulions mesurer ici. Les résultats sont présentés fig. R.3

On constate ainsi une variation de la valeur de l'absorbance mesurée, représentée graphiquement par une courbe concave avec une valeur maximale obtenue pour un volume de 200 μl de substrat. Comme attendu, la variation du volume de substrat modifie la valeur d'absorbance mesurée par le test. Le volume de 200 μl correspondant effectivement à la valeur d'absorbance optimale pour le test, l'incertitude des mesures étant de l'ordre de +/- 12.4% et de +/- 20% pour une erreur sur le volume du substrat de +/- 10% et +/- 20% respectivement. La variabilité de l'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la variabilité du volume de substrat ajouté. Ce niveau d'incertitude sur le volume de substrat ajouté

nous a paru préférable au fait de manipuler le réactif et de risquer de le dégrader à la lumière. Nous avons donc choisi d'utiliser le dispositif du kit tel que prévu par le fabricant.

Fig. R.3 : Evaluation de l'effet du volume de substrat enzymatique sur l'absorbance mesurée



En bleu la moyenne des absorbances obtenues avec 4 gouttes de substrat
En rouge la gamme des absorbances obtenues avec 160 à 240 µl de substrat

1.3.3. Effet sur l'absorbance mesurée du délai entre l'arrêt de la réaction enzymatique et la mesure d'absorbance

En raison de la séparation physique entre la pièce dans laquelle est réalisé l'ensemble des étapes du protocole ELISA et le lieu où est effectuée la lecture de l'absorbance de la plaque ELISA, deux options s'offraient à nous. L'une consistait à stopper la réaction enzymatique avant de rejoindre le lecteur de plaque ELISA, l'autre à stopper la

réaction après avoir rejoint le lecteur de plaque ELISA. La première condition expérimentale augmente la variabilité du délai entre l'arrêt de la réaction enzymatique et la lecture de l'absorbance mais limite les manipulations, la seconde condition présente l'avantage de réduire au maximum la variabilité du délai entre l'arrêt de la réaction et la lecture de l'absorbance mais ajoute une étape de manipulation à effectuer dans la pièce où se trouve le lecteur de plaque ELISA.

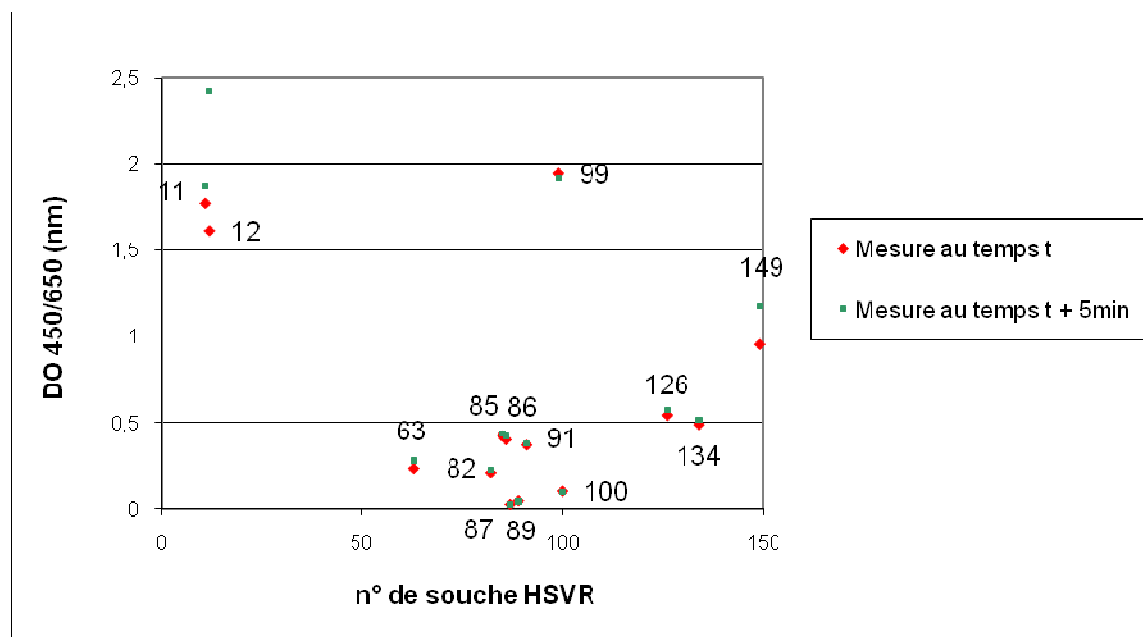
Nous avons donc voulu voir quel était l'impact du délai de lecture de la plaque sur la dispersion de la mesure. Une même plaque a ainsi été lue au temps t_0 et à $t_{+5\text{min}}$ (5 minutes correspondant au temps nécessaire pour rejoindre la salle où se trouve le lecteur de plaque) dans le but de détecter d'éventuelles variations d'absorbance. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.3 et fig. R.4

Tableau R.3 : Evaluation de l'effet sur l'absorbance mesurée en ELISA, du délai entre l'arrêt de la réaction enzymatique et la lecture

Echantillons	DO _{600 nm}	Lot P413710		Variation de la DO _{450/650nm} de t_0 à $t_{+5\text{min}}$
		DO _{450/650nm} à t_0	DO _{450/650nm} à $t_{+5\text{ min}}$	
T+	sans objet	2,066	2,192	0,126
T-	sans objet	0,039	0,032	-0,007
HSVR 11	1,84	1,772	1,874	0,102
HSVR 12	1,09	1,616	2,424	0,808
HSVR 63	1,82	0,234	0,278	0,044
HSVR 82	1,76	0,21	0,222	0,012
HSVR 85	1,64	0,424	0,431	0,007
HSVR 86	2,1	0,401	0,417	0,016
HSVR 87	1,57	0,024	0,022	-0,002
HSVR 89	1,66	0,045	0,039	-0,006
HSVR 91	1,95	0,37	0,378	0,008
HSVR 99	1,83	1,95	1,915	-0,035
HSVR 100	2,8	0,1	0,093	-0,007
HSVR 126	1,82	0,543	0,57	0,027
HSVR 134	1,93	0,49	0,513	0,023
HSVR 149	2,2	0,954	1,171	0,217

Tous les échantillons sont dilués à DO_{600nm} = 1 avant le test ELISA

Fig. R.4 : Absorbance à 450/650 nm en fonction du délai entre l'arrêt de la réaction enzymatique et la lecture



En moyenne, on constate une augmentation de l'absorbance à $t_{+5\text{min}}$ par rapport à t_0 (+0,09 avec 3/10 souches ayant une DO qui diminue de $-0,002$ à $-0,035$). Le délai avant la lecture ayant un effet sur l'absorbance mesurée, nous avons préféré procéder selon la deuxième option, ce qui permettait de réaliser nos expériences dans des conditions plus facilement reproductibles en ayant le même délai d'une expérience à l'autre entre arrêt de la réaction et lecture de la plaque.

1.3.4. Détermination de la zone de linéarité du test ELISA

1.3.4.1. Linéarité du test ELISA sur une gamme de toxine

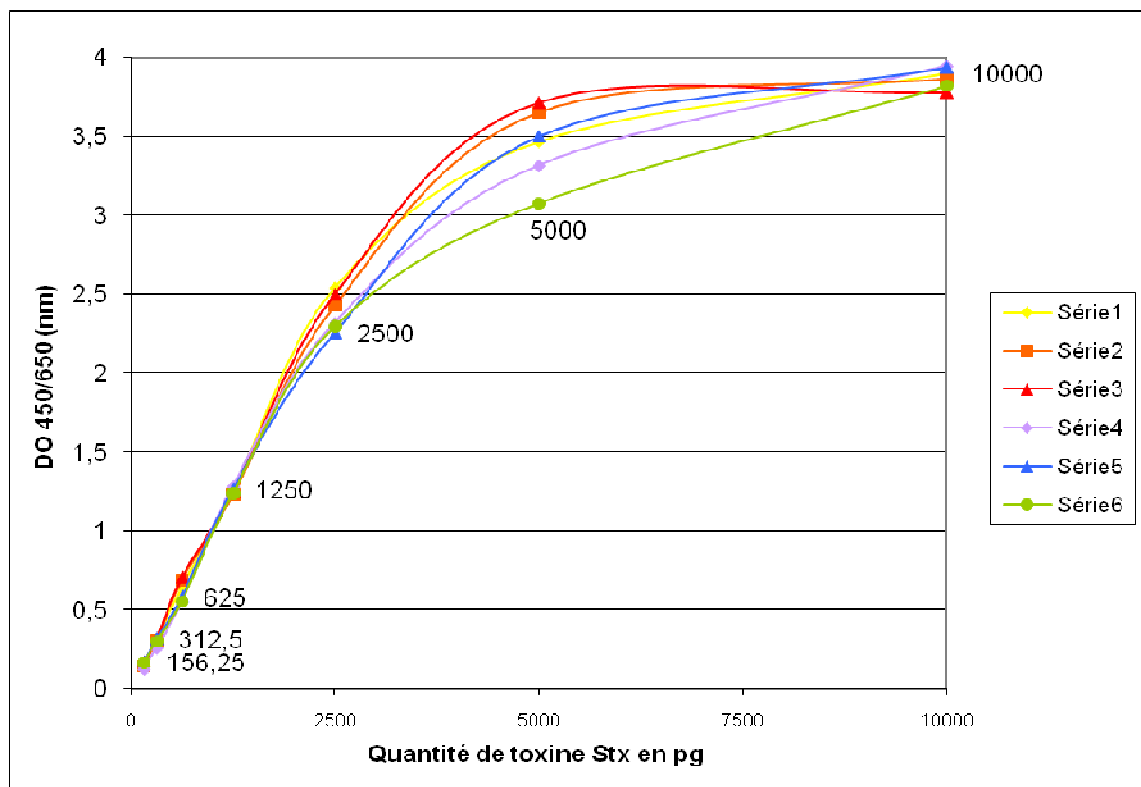
Le but de notre étude étant de quantifier la production de toxines, il nous fallait vérifier que le test ELISA était bien quantitatif et déterminer les conditions de proportionnalité entre quantité de toxine et absorbance mesurée.

Nous avons pour cela testé une gamme de dilution de toxine purifiée en triple sur 2 plaques ayant le même numéro de lot. La gamme de toxine a été réalisée à partir d'une dilution en cascade au 1/2 de 10 ng à 156.25 pg. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.4 et fig. R.5

Tableau R.4 : Evaluation de la linéarité du test sur une gamme de dilution de toxine

Quantité de toxine Stx en pg	1 ^{ère} plaque lot P844710			2 ^{ème} plaque même n° de lot		
	1 ^{ère} série	2 ^{ème} série	3 ^{ème} série	4 ^{ème} série	5 ^{ème} série	6 ^{ème} série
10000	3,9	3,866	3,779	3,944	3,932	3,82
5000	3,468	3,652	3,715	3,315	3,498	3,076
2500	2,542	2,43	2,501	2,32	2,256	2,297
1250	1,247	1,228	1,247	1,284	1,265	1,239
625	0,643	0,692	0,707	0,555	0,586	0,555
312,5	0,318	0,309	0,317	0,261	0,319	0,303
156,25	0,148	0,145	0,172	0,127	0,173	0,168

Fig. R.5 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm d'une gamme de toxine purifiée en fonction de la quantité de toxine



Toutes les mesures de $DO_{450/650nm}$ étant positives, nous avons utilisé un code couleur permettant de distinguer les 6 séries de mesure. On constate une linéarité des résultats jusqu'à des valeurs d'absorbance de l'ordre de 1,5 unités de DO, correspondant à un peu plus de 1,5 ng de toxine, la droite s'infléchissant au-delà de ces valeurs pour atteindre le niveau de saturation du lecteur de plaque à 4 unités de DO. On peut donc considérer que pour des absorbances comprises entre 0,1 et 1,5 unités de DO, il existe une relation de proportionnalité entre absorbance mesurée et la quantité de toxine. Au-delà de cette valeur de $DO_{450/650nm}$, la quantité de toxine détectée est sous estimée, d'abord faiblement puis plus fortement au fur et à mesure que l'on s'approche du seuil de saturation du lecteur de plaque.

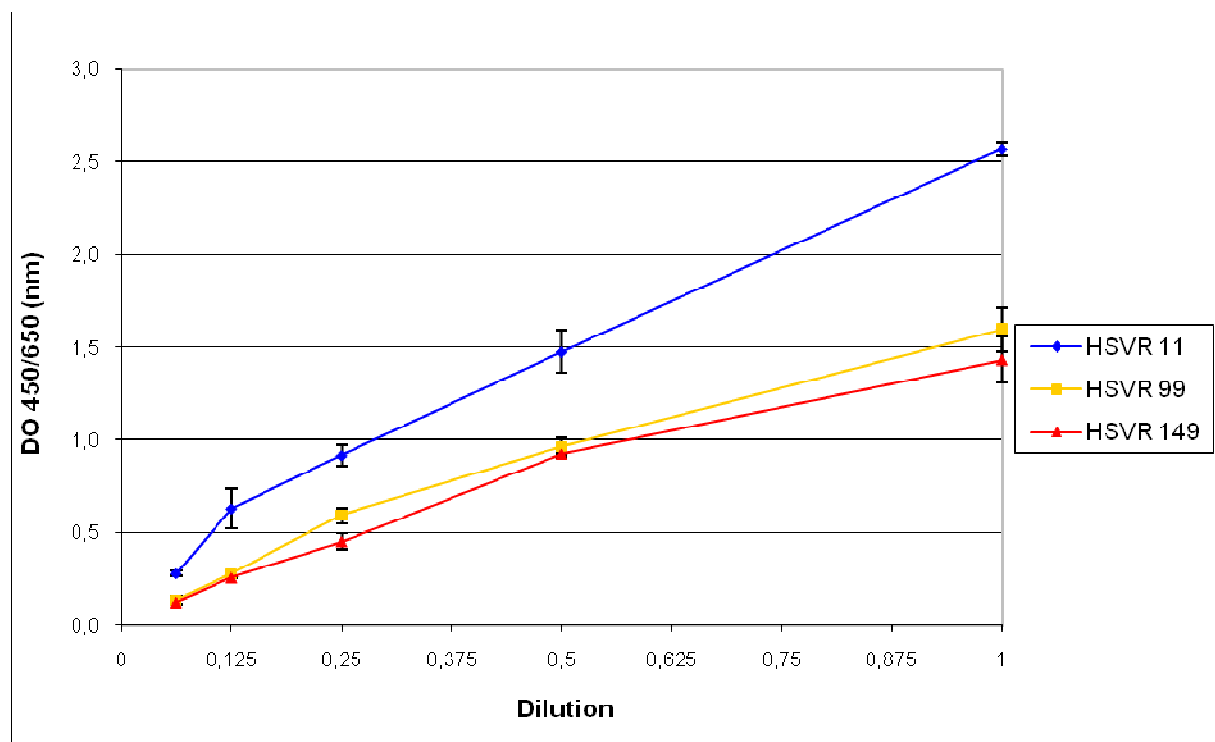
1.3.4.2. *Linéarité du test ELISA sur des gammes de dilution de cultures bactériennes*

Nous avons également testé la linéarité du test ELISA sur des dilutions en cascade au $\frac{1}{2}$ obtenues à partir de cultures bactériennes de 3 souches différentes (HSVR 11, HSVR 99 et HSVR 149). Les résultats obtenus sont présentés tableau R.5 et fig. R.6

Tableau R.5 : Evaluation de la linéarité du test sur des gammes de dilution de cultures bactériennes (HSVR 11, 99 et 149)

Souche HSVR	DO_{600nm}	Dilution	$DO_{450/650nm}$				
			Série 1	Série 2	Moyenne	Ecart type	CV
11	1,87	1	2,595	2,545	2,57	0,04	1,6%
	0,935	0,5	1,394	1,556	1,475	0,11	7,5%
	0,4675	0,25	0,877	0,955	0,916	0,06	6,6%
	0,23375	0,125	0,705	0,554	0,6295	0,11	17,5%
	0,116875	0,0625	0,29	0,27	0,28	0,01	3,6%
99	1,27	1	1,514	1,681	1,5975	0,12	7,5%
	0,635	0,5	1	0,923	0,9615	0,05	5,2%
	0,3175	0,25	0,62	0,563	0,5915	0,04	6,8%
	0,15875	0,125	0,274	0,275	0,2745	0,001	0,4%
	0,079375	0,0625	0,119	0,153	0,136	0,02	14,7%
149	1	1	1,343	1,521	1,432	0,13	9,1%
	0,5	0,5	0,928	0,923	0,9255	0,004	0,4%
	0,25	0,25	0,484	0,42	0,452	0,05	11,1%
	0,125	0,125	0,256	0,26	0,258	0,003	1,2%
	0,0625	0,0625	0,128	0,125	0,1265	0,002	1,6%

Fig. R.6 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm de 3 gammes de dilution de cultures bactériennes (HSVR 11, 99 et 149) en fonction du facteur de dilution



De façon analogue aux résultats obtenus avec la gamme de toxine, nous constatons que la proportionnalité entre quantité de bactéries, et donc de toxine, et absorbance à 450/650nm est relativement correcte. Deux autres gammes de dilutions sont également présentées fig. 1, publication n°1

1.3.5. Evaluation l'incertitude liée aux plaques ELISA et aux échantillons bactériens

Nous avons envisagé plusieurs facteurs de variabilité potentiels de nos mesures liés aux plaques ELISA. Deux sont directement liés aux plaques ELISA elle-mêmes et concernent la variabilité inter-lot et la variabilité intra-lot. Un autre paramètre lié à la préparation des suspensions bactériennes à tester doit aussi être pris en compte dans

la mesure où tous nos résultats n'ont pas été obtenus à partir d'un seul et même échantillon, chaque souche étudiée étant remise en culture pour toute nouvelle série de test ELISA. Nous évaluerons donc dans ce paragraphe la reproductibilité de nos résultats en fonction des kits utilisés et/ou des échantillons testés.

1.3.5.1. *Evaluation de l'incertitude intra-lot du test ELISA*

Nous avons d'abord évalué l'incertitude intra-lot du test ELISA sur une gamme de toxine purifiée. Sur un même lot, cette incertitude est inférieure à 10% (de 0 à 7,1% ou 9,1% si l'on tient compte de la valeur de $DO_{450/650nm}$ obtenu pour la série 2 à 50 pg). Les résultats obtenus sont présentés tableau R.6 et fig. R.7

Tableau R.6 : Incertitudes intra-et inter-lot du test ELISA à partir de gammes de dilutions de la toxine Stx purifiée

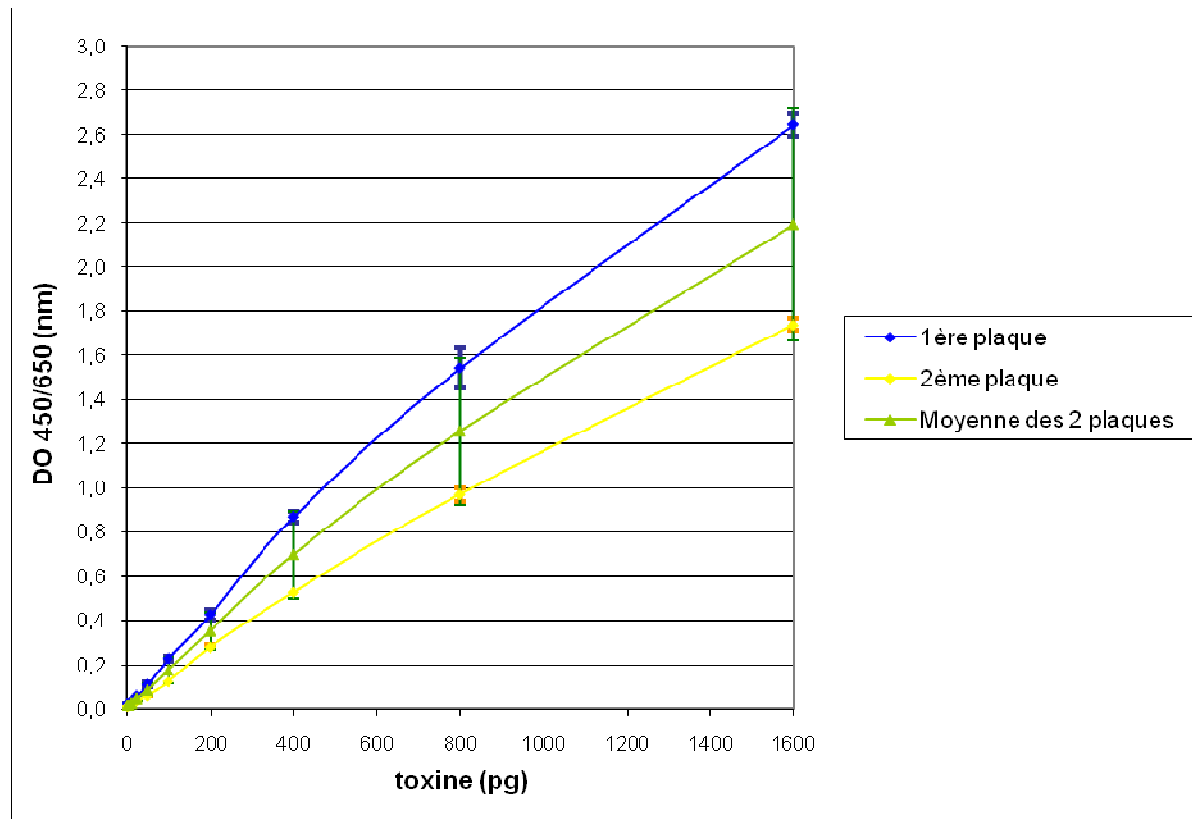
Toxine Stx2 purifiée (pg)	Plaque 1 lot P926610					Plaque 2 lot P926610					Sur les 4 séries de résultats		
	1 ^{ère} série	2 ^{ème} série	Moy	ET	CV	1 ^{ère} série	2 ^{ème} série	Moy	ET	CV	Moy	ET	CV
1600	2,68	2,609	2,65	0,05	1,9%	1,758	1,719	1,74	0,03	1,7%	2,192	0,524	24%
800	1,478	1,604	1,54	0,09	5,8%	0,993	0,949	0,97	0,03	3,1%	1,256	0,334	27%
400	0,886	0,849	0,87	0,03	3,4%	0,526	0,527	0,53	0	0,0%	0,697	0,197	28%
200	0,406	0,441	0,42	0,03	7,1%	0,272	0,284	0,28	0,01	3,6%	0,351	0,085	24%
100	0,232	0,219	0,23	0,01	4,3%	0,122	0,122	0,12	0	0%	0,174	0,06	34%
50	0,115	0,099	0,11	0,01	9,1%	0,061	0,058	0,06	0	0%	0,083	0,028	34%
25	0,056	0,056	0,06	0	0%	0,036	0,036	0,04	0	0%	0,046	0,012	26%
12,5	0,03	0,03	0,03	0	0%	0,018	0,018	0,02	0	0%	0,024	0,007	29%
6,25	0,02	0,019	0,02	0	0%	0,013	0,013	0,01	0	0%	0,016	0,004	25%
3,125	0,017	0,021	0,02	0	0%	0,011	0,011	0,01	0	0%	0,015	0,005	33%

Moy = moyenne

ET = écart type

CV = Coefficient de variation

Fig. R.7 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm d'une gamme de dilution de la toxine Stx purifiée en fonction de la quantité de toxine



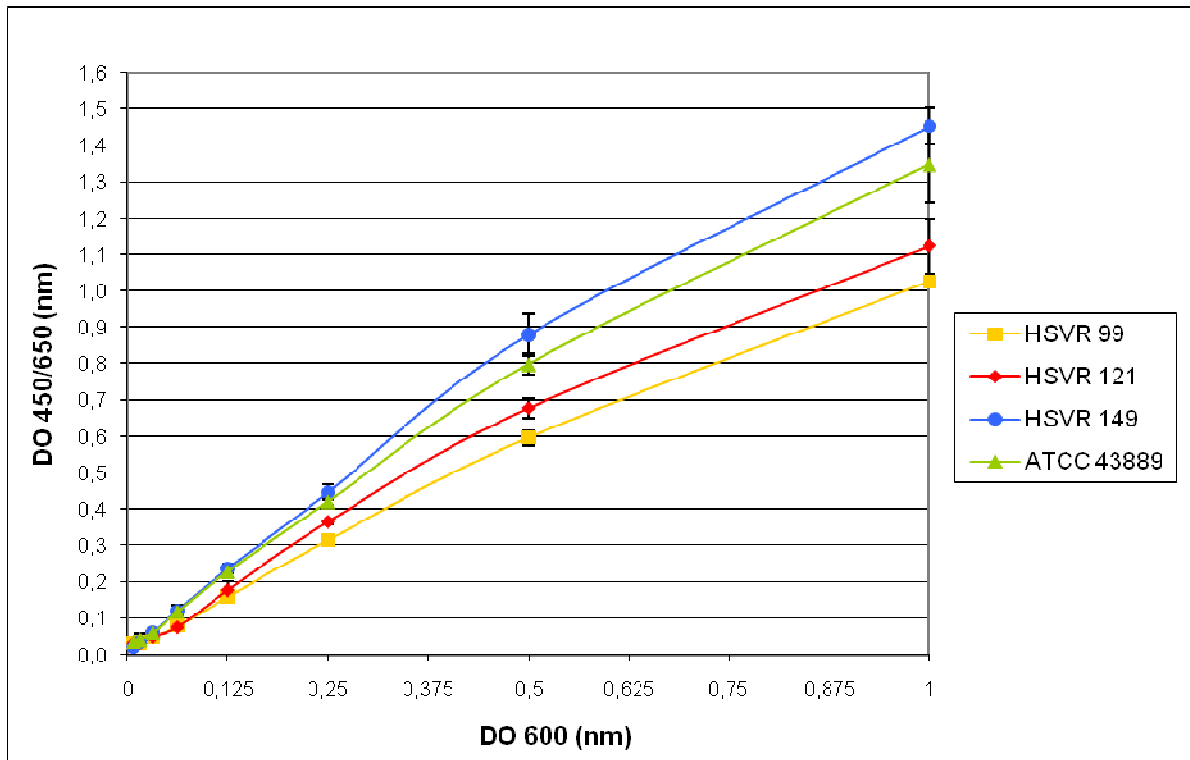
Nous avons ensuite évalué l'incertitude intra-lot du test ELISA sur 4 souches (HSVR 99, HSVR 121, HSVR 149 et ATCC 43889). Les échantillons ont été testés en double sur 2 plaques le même numéro de lot de fabrication. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.7 et fig. R.8

Les résultats obtenus présentent, selon les souches et les points de la gamme de dilution, une incertitude pouvant atteindre +/-14% (seules les valeurs dont la valeur de $DO_{450/650nm}$ est $>0,1$, sur fond jaune, sont prises en compte). Cette incertitude maximale est 2 fois supérieure à celle observée pour la gamme de toxine purifiée (+/-7,1%).

Tableau R.7 : Evaluation de l'incertitude intra-lot du test ELISA à partir de gammes de dilutions de 4 souches bactériennes (HSVR 99, 121, 149 et ATCC 43889)

	DO _{600nm}	DO _{450/650nm} (Lot P964410)		Moyenne	ET	CV
		1 ^{ère} série	2 ^{ème} série			
HSVR 99	1	1,024	1,027	1,026	0,2%	0,2%
	0,5	0,611	0,581	0,596	2,1%	3,6%
	0,25	0,31	0,319	0,315	0,6%	2,0%
	0,125	0,156	0,161	0,159	0,4%	2,2%
	0,0625	0,083	0,074	0,079	0,6%	8,1%
	0,03125	0,046	0,049	0,048	0,2%	4,4%
	0,015625	0,033	0,031	0,032	0,1%	4,4%
	0,0078125	0,025	0,036	0,031	0,8%	25,1%
HSVR 121	1	1,176	1,069	1,123	7,6%	6,7%
	0,5	0,658	0,696	0,677	2,7%	4,0%
	0,25	0,368	0,361	0,365	0,5%	1,4%
	0,125	0,159	0,194	0,177	2,5%	14,0%
	0,0625	0,075	0,074	0,075	0,1%	0,9%
	0,03125	0,042	0,055	0,049	0,9%	18,8%
	0,015625	0,037	0,025	0,031	0,8%	27,4%
	0,0078125	0,02	0,042	0,031	1,6%	50,2%
HSVR 149	1	1,418	1,488	1,453	4,9%	3,4%
	0,5	0,839	0,922	0,881	5,9%	6,7%
	0,25	0,461	0,433	0,447	2,0%	4,4%
	0,125	0,229	0,246	0,238	1,2%	5,1%
	0,0625	0,113	0,132	0,123	1,3%	10,9%
	0,03125	0,064	0,061	0,063	0,2%	3,4%
	0,015625	0,031	0,039	0,035	0,6%	16,2%
	0,0078125	0,022	0,024	0,023	0,1%	6,1%
ATCC 43889	1	1,273	1,424	1,349	10,7%	7,9%
	0,5	0,778	0,819	0,799	2,9%	3,6%
	0,25	0,427	0,414	0,421	0,9%	2,2%
	0,125	0,215	0,241	0,228	1,8%	8,1%
	0,0625	0,116	0,118	0,117	0,1%	1,2%
	0,03125	0,058	0,061	0,060	0,2%	3,5%
	0,015625	0,053	0,029	0,041	1,7%	41,4%
	0,0078125	0,036	0,034	0,035	0,1%	4,0%

Fig. R.8 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm de 4 cultures bactériennes (HSVR 99, 121 et 149 et ATCC 43889) en fonction du facteur de dilution



1.3.5.2. *Evaluation l'incertitude inter-lot du test ELISA*

L'évaluation de la variabilité inter-lot du test ELISA sur une gamme de toxine purifiée donne un CV (jusqu'à +/-19%) environ 2,5 fois plus élevé que celui observé en intra-lot (+/-7,1%). Les résultats obtenus sont présentés tableau R.8 et fig. R.9

Pour mesurer l'incertitude inter-lot du test ELISA, nous avons tout d'abord testé l'ensemble de nos 46 isolats avec le maximum de facteurs de variabilité : tests réalisés à partir d'échantillons différents, avec des kits de lots différents. Les suspensions bactériennes ont été diluées de manière à ce qu'elles aient une absorbance à 600 nm égale à 1 unité de DO. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.9 et fig. R.10

Tableau R.8 : Evaluation de l'incertitude inter-lot du test ELISA à partir d'une même gamme de dilution de la toxine Stx purifiée

Qte Stx en pg	DO _{450/650nm}		Moyenne	Ecart type	CV
	1 ^{ère} plaque	2 ^{ème} plaque			
	P844710	P926610			
1600	1,647	2,037	1,842	0,276	15%
800	0,864	1,124	0,994	0,184	19%
200	0,277	0,336	0,307	0,042	14%
100	0,177	0,166	0,172	0,008	5%
50	0,091	0,079	0,085	0,008	9%
12,5	0,056	0,033	0,045	0,016	36%
6,25	0,059	0,023	0,041	0,025	61%
3,125	0,026	0,017	0,022	0,006	27%

Fig. R.9 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm d'une gamme de dilution de la toxine Stx purifiée en fonction de la quantité de toxine testée sur 2 lots différents

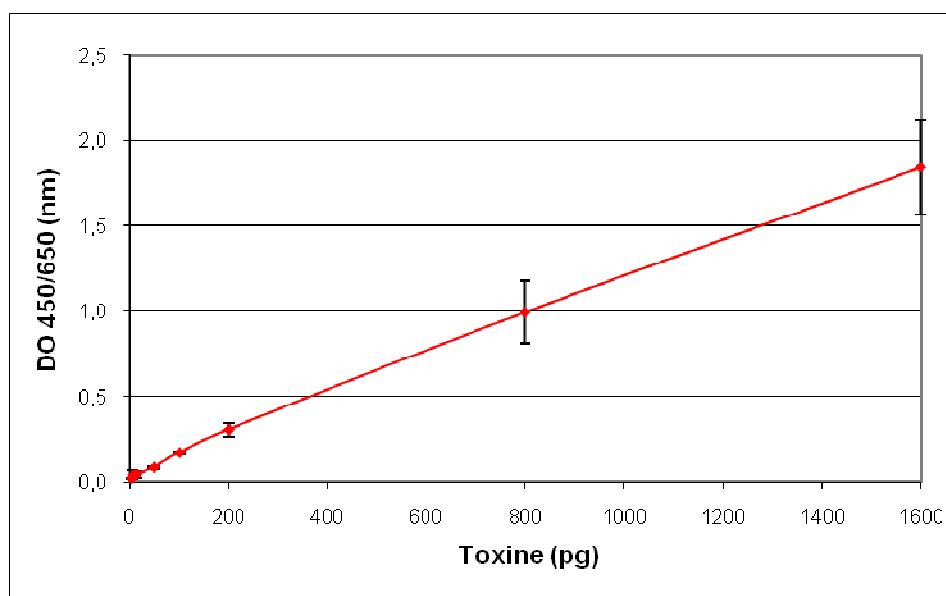


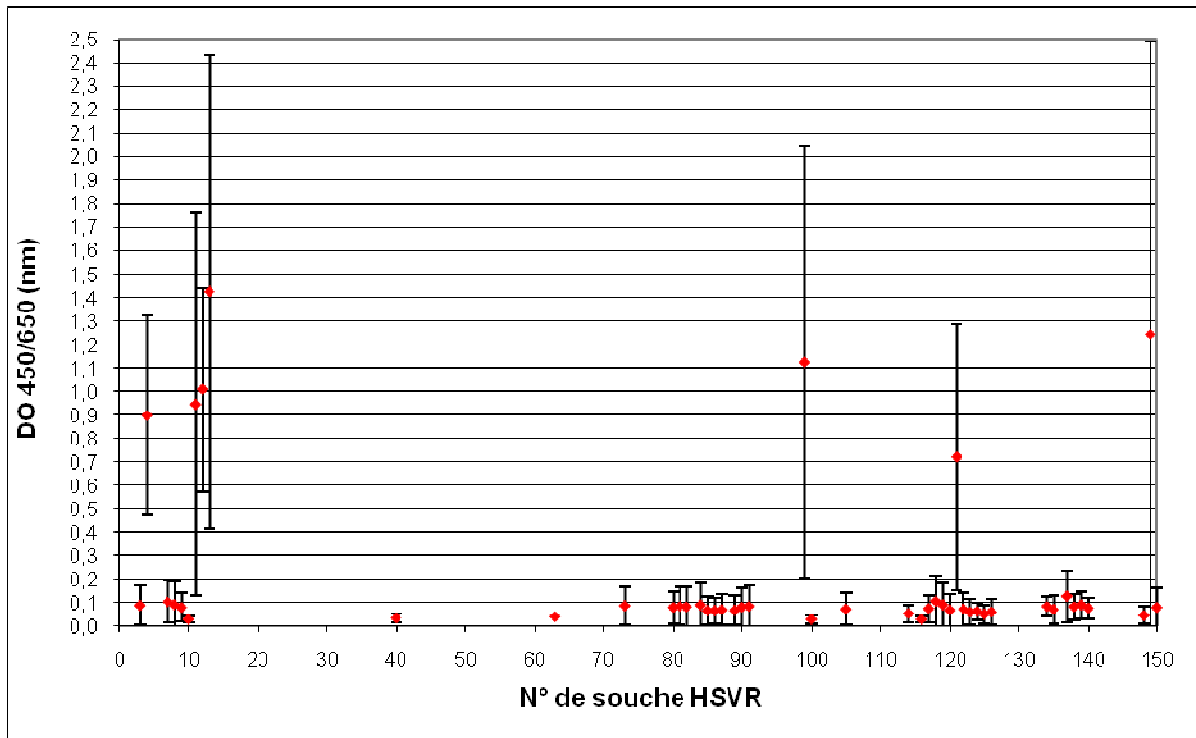
Tableau R.9 : Incertitude inter-lot du test ELISA à partir des 46 souches de la collection HSVR (kits et échantillons différents)

N° HSVR	DO _{450/650nm} (échantillons dilués DO _{600nm} = 1)		moyenne	ET	CV
	kit1	kit2			
3	0,028	0,147	0,09	0,08	93%
4	0,596	1,198	0,90	0,43	47%
7	0,04	0,166	0,10	0,09	89%
8	0,024	0,159	0,09	0,10	106%
9	0,036	0,122	0,08	0,06	76%
10	0,019	0,039	0,03	0,01	47%
11	0,369	1,52	0,94	0,81	87%
12	0,702	1,315	1,01	0,43	43%
13	0,711	2,138	1,42	1,01	71%
40	0,021	0,047	0,03	0,02	61%
63	0,04	0,04	0,04	0,00	0%
73	0,027	0,145	0,09	0,08	93%
80	0,03	0,129	0,08	0,07	88%
81	0,027	0,142	0,08	0,08	102%
82	0,023	0,141	0,08	0,08	104%
84	0,022	0,157	0,09	0,10	106%
85	0,021	0,11	0,07	0,06	90%
86	0,025	0,106	0,07	0,06	82%
87	0,023	0,115	0,07	0,07	93%
89	0,023	0,111	0,07	0,06	89%
90	0,023	0,138	0,08	0,08	102%
91	0,022	0,146	0,08	0,09	110%
99	0,473	1,775	1,12	0,92	82%
100	0,017	0,041	0,03	0,02	57%
105	0,024	0,12	0,07	0,07	97%
114	0,027	0,079	0,05	0,04	74%
116	0,019	0,038	0,03	0,01	45%
117	0,034	0,115	0,07	0,06	82%
118	0,029	0,182	0,11	0,11	98%
119	0,024	0,156	0,09	0,09	104%
120	0,019	0,116	0,07	0,07	98%
121	0,32	1,121	0,72	0,57	79%
122	0,022	0,123	0,07	0,07	102%
123	0,02	0,098	0,06	0,06	92%
124	0,037	0,088	0,06	0,04	60%
125	0,024	0,078	0,05	0,04	76%
126	0,021	0,098	0,06	0,05	91%
134	0,055	0,112	0,08	0,04	50%
135	0,027	0,114	0,07	0,06	88%
137	0,049	0,205	0,13	0,11	85%
138	0,043	0,122	0,08	0,06	70%
139	0,049	0,131	0,09	0,06	64%
140	0,046	0,106	0,08	0,04	53%
148	0,019	0,072	0,05	0,04	75%
149	0,359	2,127	1,24	1,25	101%
150	0,02	0,138	0,08	0,08	104%

Les cases colorées en jaune, en bleu et sur fond blanc correspondent respectivement à des absorbances à 450/650nm > 0,1, comprises entre 0,07 et 0,1 et < 0,07 (respectivement le seuil de positivité, la zone d'incertitude et le seuil de négativité du

test ELISA tels que définis par le fabricant). Pour chaque case de la première colonne, la couleur de fond correspondant au résultat moyen du test ELISA.

Fig. R.10 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches testées

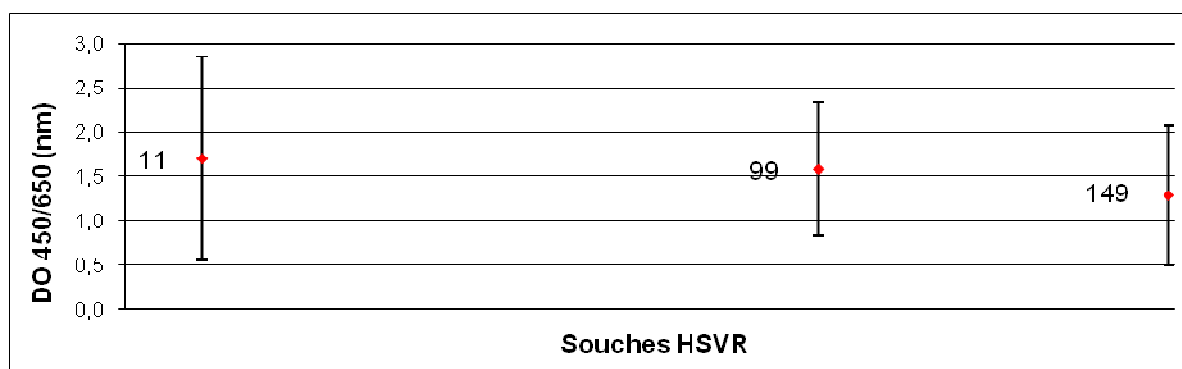


Nous avons constaté une forte variabilité entre les résultats obtenus, le coefficient de variation allant jusqu'à +/-110% pour la souche HSVR 91. De façon évidente, le CV calculé n'est pas interprétable pour des échantillons dont les résultats en ELISA sont négatifs ou dans la zone d'indétermination ($DO_{450/650nm}$ entre 0,07 et 0,1) lors des 2 tests (HSVR 10, 40, 63, 100...). Nous avons donc affiné notre évaluation en testant 3 des souches positives sur 4 kits de lots différents, à partir d'échantillons préparés à des dates différentes. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.10 et fig. R.11

Tableau R.10 : Evaluation de l'expression de 3 souches (HSVR 11, 99 et 149) sur 4 kits de 4 lots différents à des dates différentes

N° HSVR	DO _{450/650nm} (échantillons dilués DO _{600nm} = 1)				Moyenne	ET	CV
11	0,369	1,520	3,160	1,772	1,71	1,15	67%
99	0,473	1,775	2,136	1,950	1,58	0,75	48%
149	0,359	2,127	1,707	0,954	1,29	0,79	61%

Fig. R.11 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches testées



Ces résultats semblent confirmer que la variabilité est très grande (CV jusqu'à 67% pour HSVR 11) entre les manipulations.

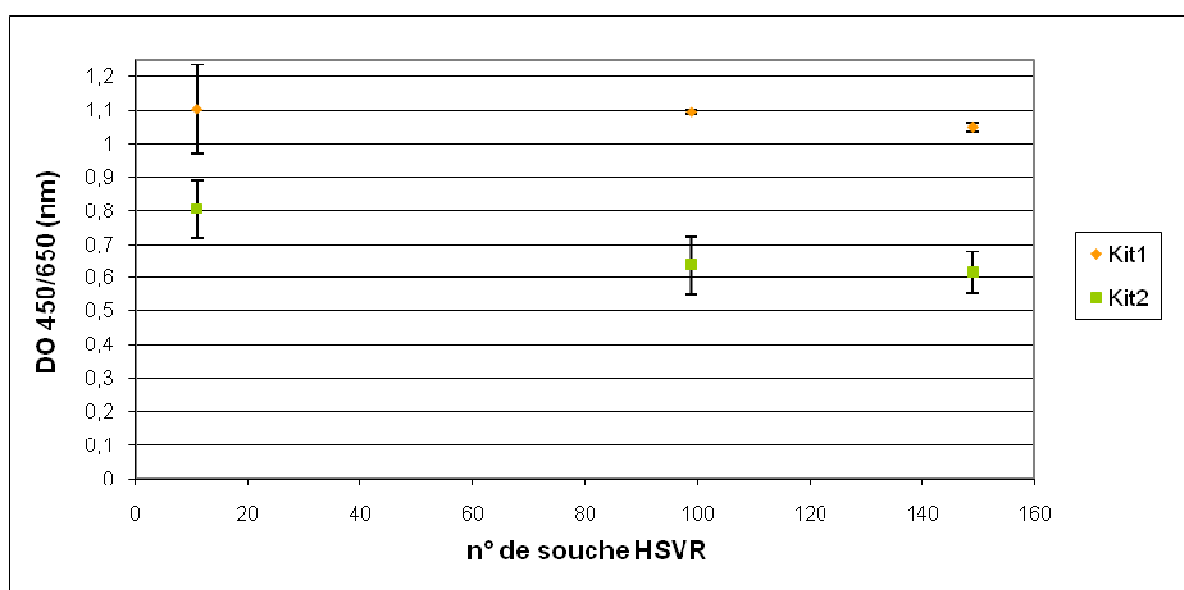
Ainsi, pour éliminer le facteur de variabilité dû au fait de faire le test à partir d'échantillons différents, c'est à dire préparés à des dates différentes, nous avons testé en duplicate, sur 2 plaques de lots différents, 3 souches bactériennes (HSVR 11, HSVR 99 et HSVR 149). Les résultats obtenus sont présentés tableau R.11 et fig. R.12

La variabilité entre 2 échantillons en duplicate et la variabilité entre 2 numéros de lot du kit ne sont pas du même ordre de grandeur : elle apparaît plus faible quand on compare les résultats pour les échantillons testés en duplicate sur un même lot (<19% pour 5 résultats sur 6, un des CV étant de 72%) et plus élevée quand on compare l'ensemble de résultats obtenus sur 2 lots différents (entre 20 et 31%).

Tableau R.11 : Evaluation de l'expression de 3 souches (HSVR 11, 99 et 149) en duplicate sur 2 kits

Echantillons	DO _{600nm}	DO _{450/650nm}										
		Kit 1		Moyenne kit1	CV kit 1	Kit 2		Moyenne kit2	CV kit 2	Moyenne interkit	ET interkit	CV inter kit
		Série 1	Série 2			Série 1	Série 2					
T+		1,331				1,762						
T-		0,03				0,066						
HSVR 11	1,1	1,008	1,194	1,101	0,7%	0,743	0,862	0,8025	72%	0,95	0,19	20%
HSVR 99	1,31	1,098	1,087	1,0925	1,2%	0,576	0,696	0,636	19%	0,86	0,27	31%
HSVR 149	1,32	1,038	1,056	1,047	0,0%	0,571	0,657	0,614	10%	0,83	0,25	30%

Fig. R.12 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches testées



Nous avons donc tenu compte de la variabilité observée entre lots et effectué chaque série de mesures avec des kits ELISA ayant le même numéro de lot. Toutefois, la variabilité liée aux échantillons n'a pas toujours pu être éliminée, certaines de nos manipulations nécessitant de réaliser des séries de 96 échantillons, ce qui, de plus, ne permettait pas systématiquement de tester chaque point en double ou en triple.

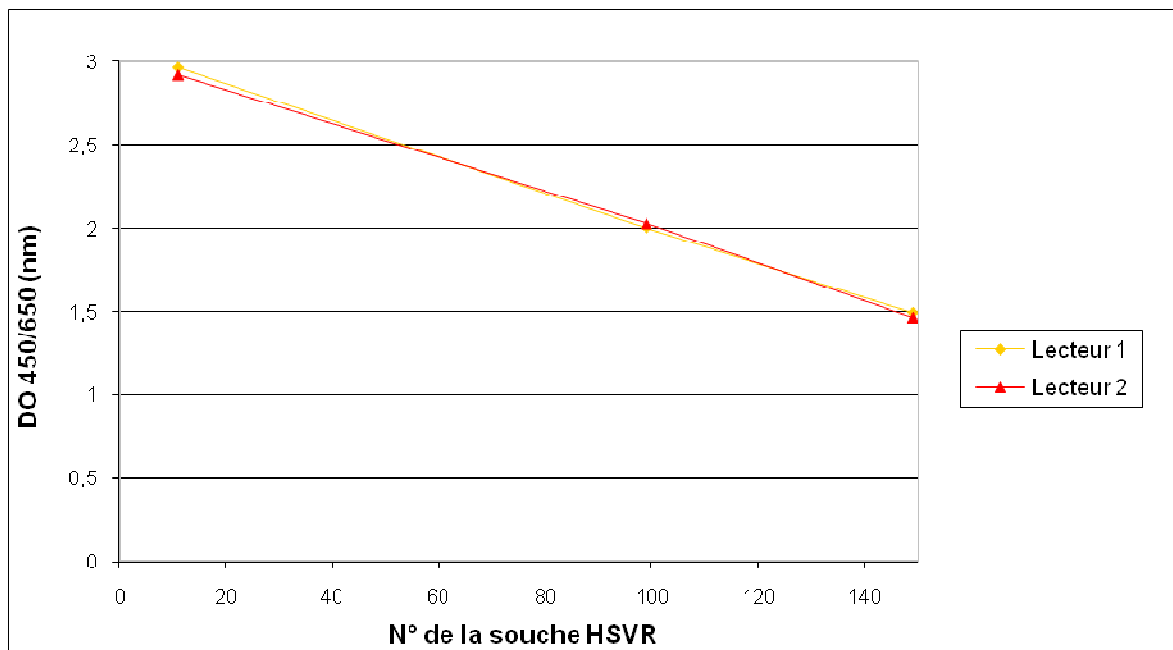
1.3.5.3. *Evaluation l'incertitude de la mesure en fonction du lecteur de plaque*

Le laboratoire disposant de 2 lecteurs de plaques ELISA, la lecture de mes plaques pouvait se faire indifféremment sur l'un ou l'autre des appareils. Nous souhaitons donc évaluer la variabilité de nos mesures en fonction de l'appareil utilisé. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.12 et fig. R.13

Tableau R.12 : Vérification de la variabilité entre 2 lecteurs de plaque

N° HSVR	Lecteur 1					Lecteur 2					global		
			moy	ET	CV			moy	ET	CV	moy	ET	CV
T+	1,861					1,84							
T-	0,09					0,087							
11	3,076	2,85	2,963	0,16	5,4%	3,015	2,82	2,92	0,14	4,7%	2,94	0,03	1,1%
99	2,152	1,85	2,003	0,21	10,5%	2,109	1,95	2,03	0,11	5,5%	2,02	0,02	0,9%
149	1,443	1,55	1,496	0,07	5,0%	1,384	1,546	1,47	0,11	7,8%	1,48	0,02	1,5%

Fig. R.13 : Mesure de l'absorbance à 450/650nm en fonction des souches et du lecteur utilisé



L'incertitude de nos mesures d'un lecteur de plaque à l'autre est très faible (entre 0,9 et 1,5%). Nous avons donc négligé ce facteur de variabilité et considéré le fait d'utiliser un lecteur de plaque plutôt que l'autre comme indifférent.

1.3.6. Effet de la congélation des échantillons à -20°C avant ELISA

L'ensemble des étapes du protocole (représentant plus de 12 heures de manipulation) étant difficilement exécutable sur une même journée, cela nécessitait de conserver nos échantillons avant de pouvoir réaliser le test ELISA. Nous avons donc voulu vérifier si la congélation à -20°C de nos échantillons, dilués au tiers dans le réactif du kit prévu à cet effet, n'empêchait pas la détection des shiga toxines. Nous avons testé plusieurs suspensions bactériennes obtenues à partir des souches HSVR 99 et HSVR 149. Les échantillons ont été testés en ELISA sans les diluer ou en les diluant pour les ramener à une absorbance à 600nm de 1 unité de DO et en les diluant au tiers dans le diluant du kit. Certains échantillons ont été préparés en duplicate, l'un d'eux étant congelé à -20°C puis décongelé pendant 1 heure, l'autre étant conservé sur la glace pendant ce temps. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.13

Tableau R.13 : Evaluation de l'effet de la congélation des échantillons sur l'absorbance mesurée

Echantillon	DO _{600nm}	DO _{450/650nm}	DO _{450/650nm} (ech dil DO _{600nm} = 1)
T+	sans objet	1,126	sans objet
T-		0,009	
HSVR 99	2,66	3,902	3,533
HSVR 99 congelé		NF	3,376
HSVR 99	1,79	1,351	0,779
HSVR 99 congelé		1,662	0,886
HSVR 149	2,512	3,794	3,051
HSVR 149 congelé		NF	3,439
HSVR 149	1,657	0,943	0,41
HSVR 149 congelé		1,063	0,336

NF : non fait

Les résultats obtenus pour des même échantillons congelés et non congelés sont ainsi similaires, la variabilité des résultats étant compatible avec celle observée entre deux échantillons traités en double.

1.4. Préparation de l'échantillon et réalisation du test

En tenant compte des éléments développés ci-dessus concernant la croissance des bactéries et les caractéristiques intrinsèques du test ELISA, nous avons enfin mené plusieurs expériences afin de déterminer précisément à quel moment de la croissance bactérienne nous devons réaliser le test ELISA.

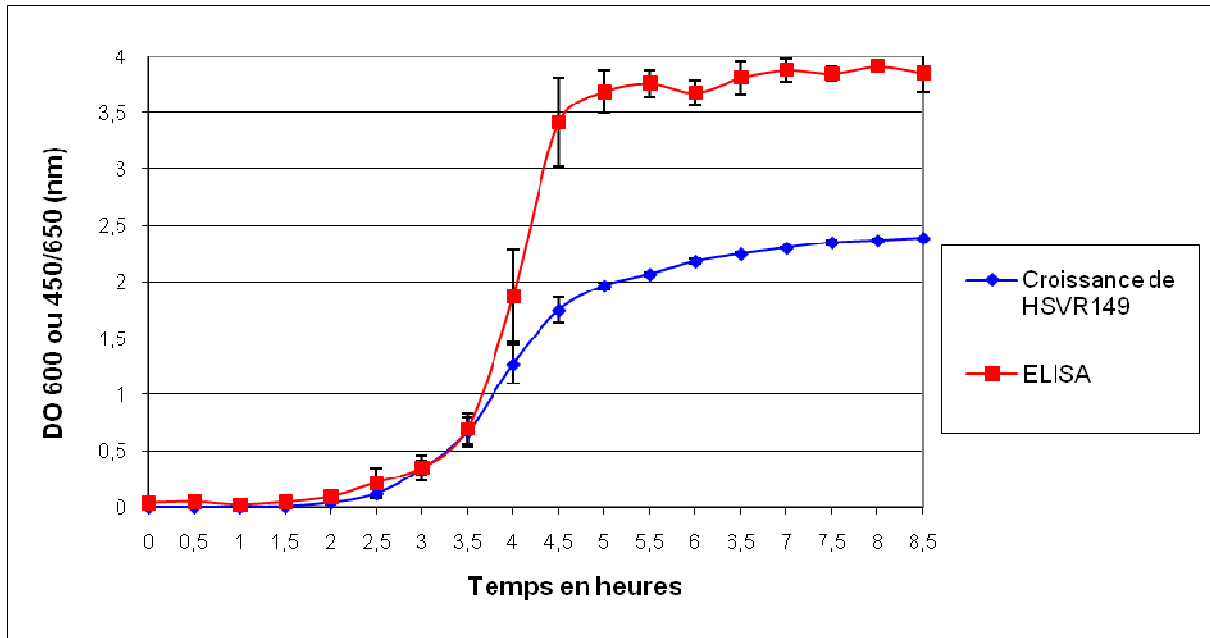
1.4.1. Etude en parallèle de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine

Afin de choisir un temps de croissance optimal pour effectuer le test ELISA et en tenant compte de tous les aspects précités, nous avons analysé en parallèle la croissance bactérienne et l'expression de la toxine. L'objectif de l'approche visait à déterminer le temps de culture conduisant à une quantité suffisante de bactéries dans le milieu pour permettre une détection éventuelle de toxines, sans pour autant atteindre la phase stationnaire, peu représentative des conditions naturelles de croissance bactérienne et d'expression de la toxine, en raison du phénomène de lyse cellulaire liée à l'épuisement du milieu. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.14 A

On constate que l'absorbance à 450/650nm augmente de façon exponentielle de manière concomitante avec l'absorbance à 600nm, entre 2 H et 4,5 H. Au-delà de 4,5 H, la $DO_{450/650nm}$ atteint le seuil de saturation du lecteur de plaque ELISA (entre 3,5 et 4).

Fig. R.14 : Etude de la synthèse de la toxine par HSVR 149 en BHI au cours de la croissance bactérienne

A. Expression de la toxine et croissance bactérienne au cours de la cinétique de croissance de HSVR 149

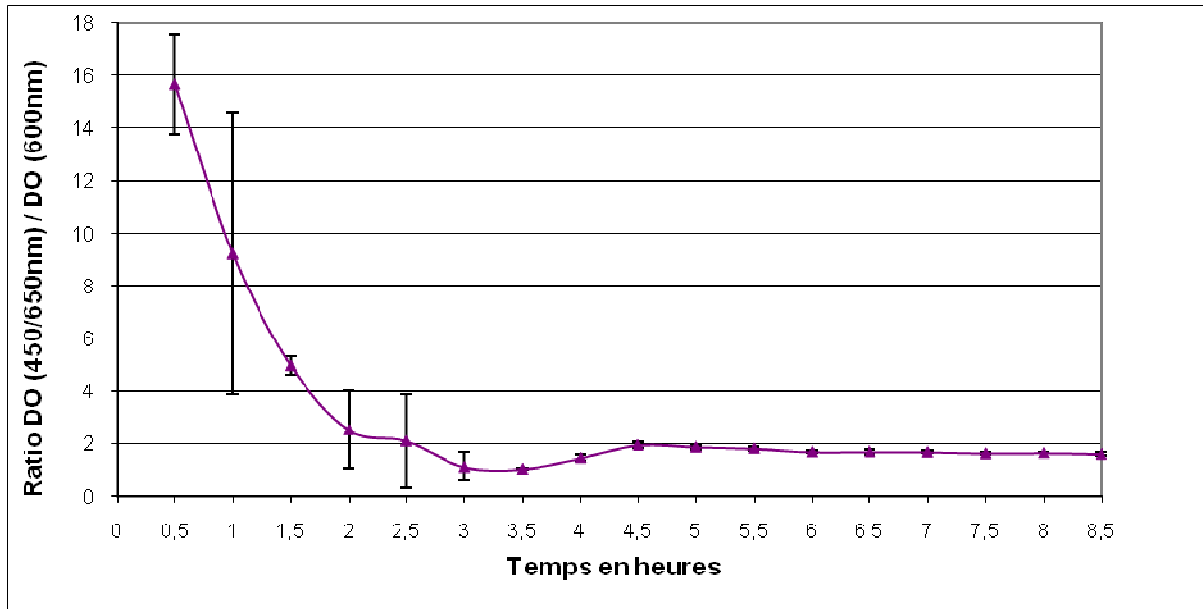


En raison du fait que la DO_{600nm} de chaque point de la cinétique varie et qu'en dessous d'un certain seuil on ne détecte pas la toxine nous avons représenté le niveau d'expression de la toxine sous la forme d'un ratio $DO_{450/650nm}$ divisé par DO_{600nm} . Ceci permet de normaliser les résultats obtenus par rapport à une quantité de bactérie (en UFC).

Notez toutefois que dans le cas de résultats ELISA négatifs ($DO_{450/650nm} < 0,07$), la valeur numérique de ce ratio n'a pas de sens biologique. De la même manière, pour des résultats ELISA positifs mais au-delà de la zone de proportionnalité entre DO_{600nm} et $DO_{450/650nm}$, la valeur du numérateur ne dépassant pas 4, la valeur numérique du ratio entraîne une sous estimation de l'expression de la toxine. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.14 B

Fig. R.14 : Etude de la synthèse de la toxine par HSVR 149 en BHI au cours de la croissance bactérienne

B. Etude de l'évolution du ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} de HSVR 149 au cours de la croissance bactérienne



Cette fois, avant 3 H de croissance, le ratio évolue beaucoup mais dès 4,5 H il se stabilise. Le ratio diminue jusqu'à 3,5 H puis augmente jusqu'à un maximum atteint à 4,5 H se stabilise à un niveau légèrement inférieur au-delà de 4,5 H. Le ratio atteint une valeur moyenne dès 4 H ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance. Notez que les fortes augmentations des $DO_{450/650nm}$ et DO_{600nm} entre 3,5 et 4,5 H se compensent. Lorsque l'on calcule le ratio les valeurs obtenues sont très proches. Ce qui laisse penser que l'on se trouve toujours dans la zone de proportionnalité entre $DO_{450/650nm}$ et DO_{600nm} .

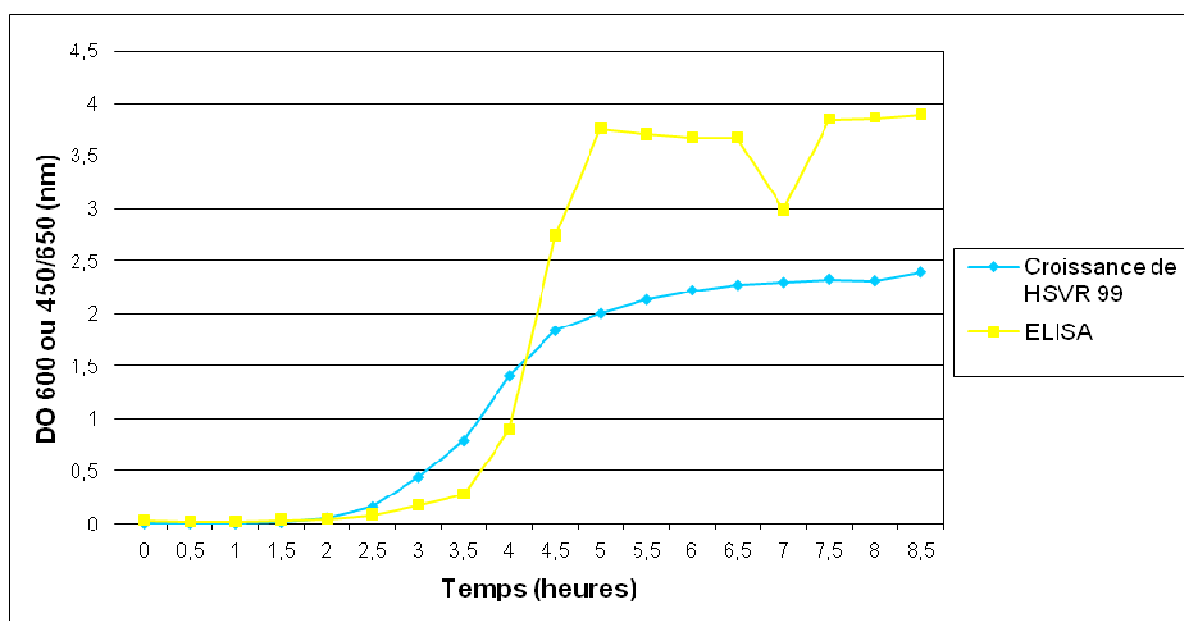
A partir de 4,5 H, la $DO_{450/650nm}$ atteint rapidement le seuil de saturation du lecteur de plaque ELISA. De plus, la culture bactérienne se trouve alors en phase stationnaire. Ce qui peut expliquer que le ratio se stabilise. En effet, le dénominateur ainsi que le numérateur varient peu à partir de 4,5 H de cinétique.

La souche HSVR 149 étant une souche produisant beaucoup de toxine, nous avons également testé d'autres souches stx+ , telles que HSVR 99 et HSVR 82, produisant des quantités de toxine plus faibles pour valider notre choix du temps de croissance nécessaire et suffisant permettant d'atteindre un niveau d'expression de toxine suffisant pour le détecter par le test mais sans que les bactéries soient en phase stationnaire voire de lyse. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.15 A et fig R.15 B

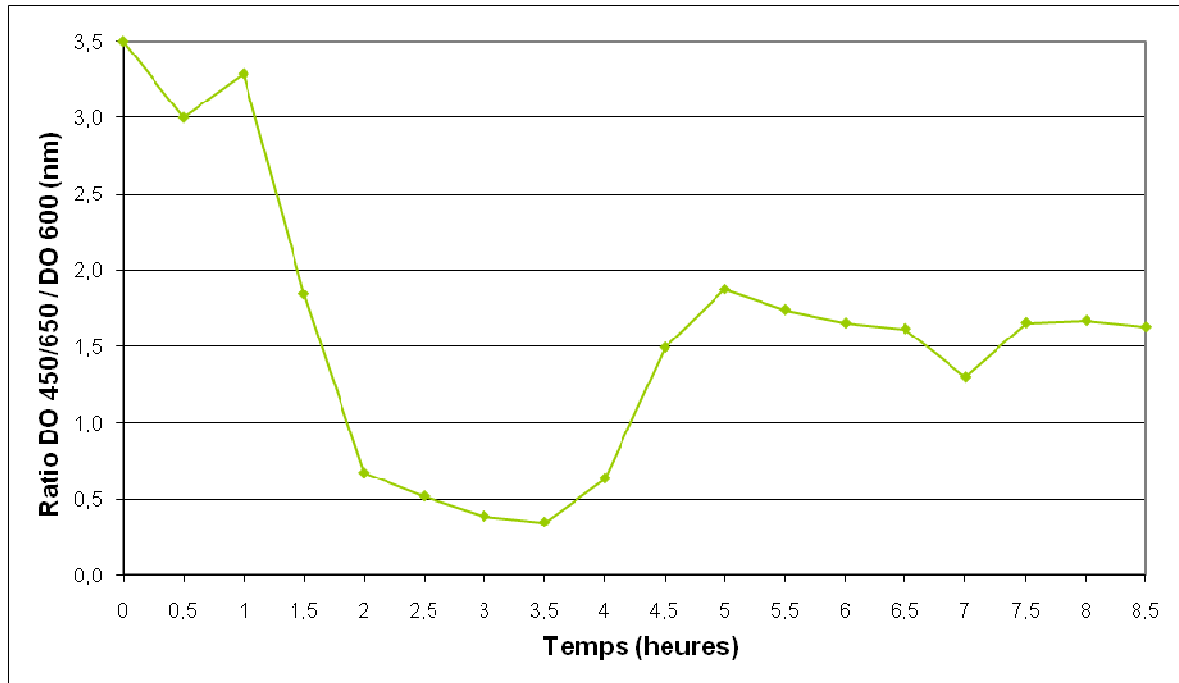
En testant la souche HSVR 99 nous avons obtenu des profils de croissance bactérienne et d'expression de la toxine similaires à ceux obtenus pour HSVR 149. Toutefois, lorsque nous calculons le ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} , nous constatons que la saturation de la DO ELISA est atteinte un peu plus tard (après 5 H de cinétique).

Fig. R.15 : Etude de la synthèse de la toxine par HSVR 99 au cours de la croissance bactérienne

A. Expression de la toxine et croissance bactérienne au cours de la cinétique de croissance de HSVR 99



B. Etude de l'évolution du ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} de HSVR 99 au cours de la croissance bactérienne



Le niveau de linéarité de la relation entre DO_{600nm} et $DO_{450/650nm}$ étant dépassé aux temps supérieurs à 4 et 4,5 H respectivement pour HSVR149 et HSVR 99, nous avons réalisé une dilution des échantillons bactériens à partir des points de la cinétique pour lesquels la DO_{600nm} dépassait 1 unité de DO pour ramener cette valeur à 1. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.16 A et B

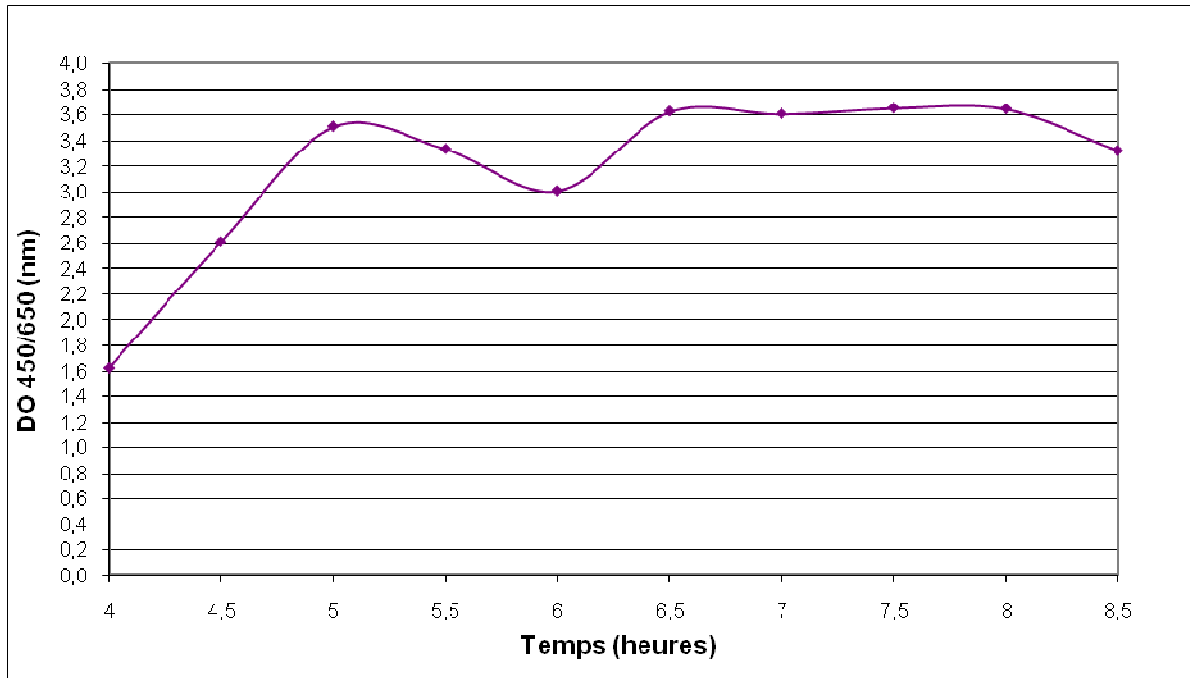
Nous avons constaté que la saturation pour HSVR 149 et HSVR 99 n'était atteinte que plus tard, respectivement à 4,5 et 5,5 H.

Nous avons également testé une souche, HSVR 82, produisant de faibles quantités de toxine donnant lieu à une $DO_{450/650nm}$ à peine supérieure au seuil de positivité défini par le fabricant ($> 0,1$). Les résultats obtenus sont présentés fig. R.17 A et B

Dans ce cas, le test ELISA n'est positif qu'entre 3,5 et 4,5 H (0,171 à 0,201) et à 7,5 H (0,149).

Fig. R.16 : Etude de la synthèse de la toxine par HSVR 149 et 99 au cours de la croissance bactérienne avec dilution de l'échantillon

- A. Etude de l'évolution de la $DO_{450/650nm}$ après dilution des suspensions bactériennes de HSVR 149 à $DO_{600nm} = 1$



- B. Etude de l'évolution de la $DO_{450/650nm}$ après dilution des échantillons bactériens de HSVR 99 à $DO_{600nm} = 1$

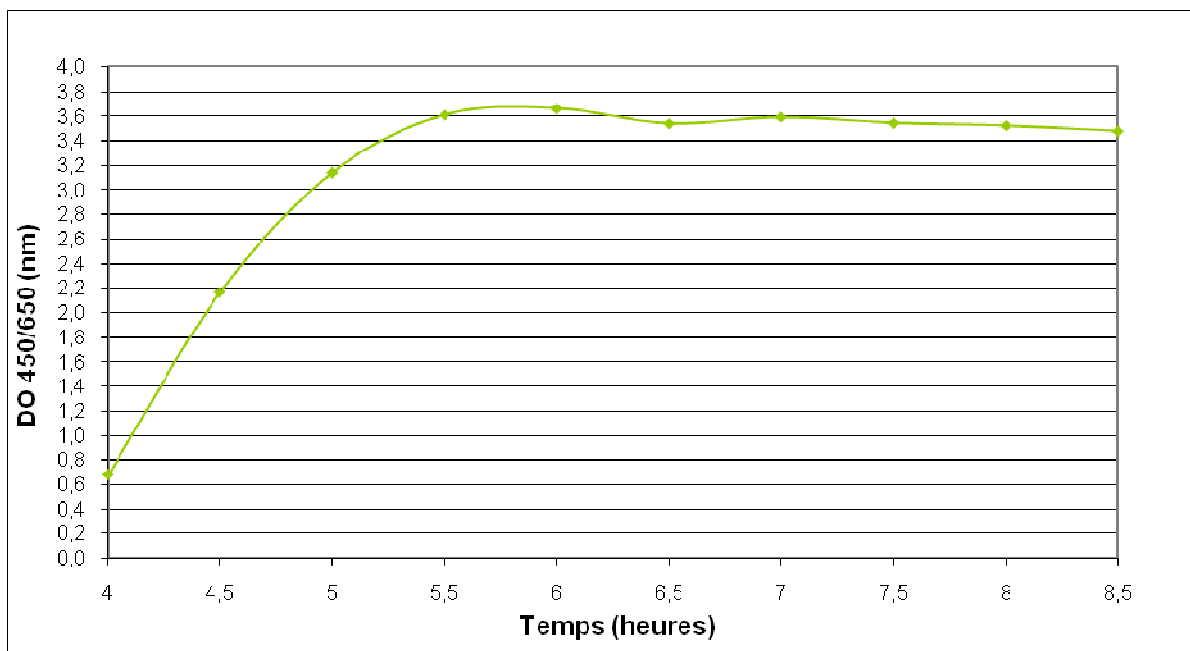
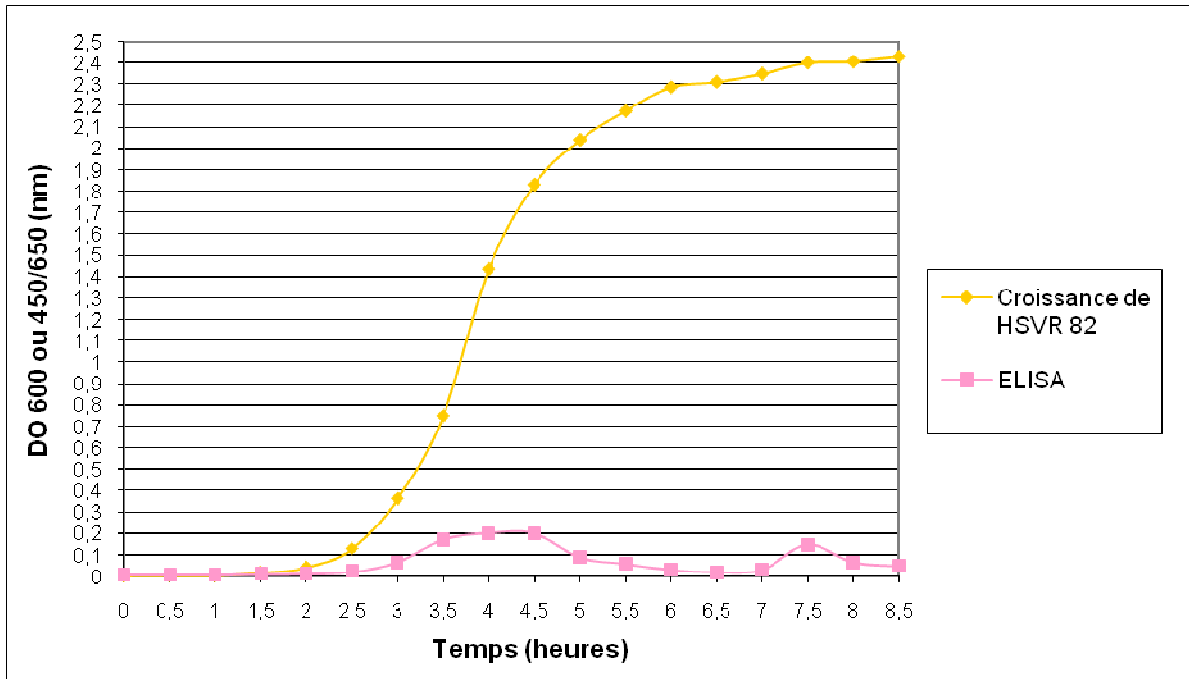
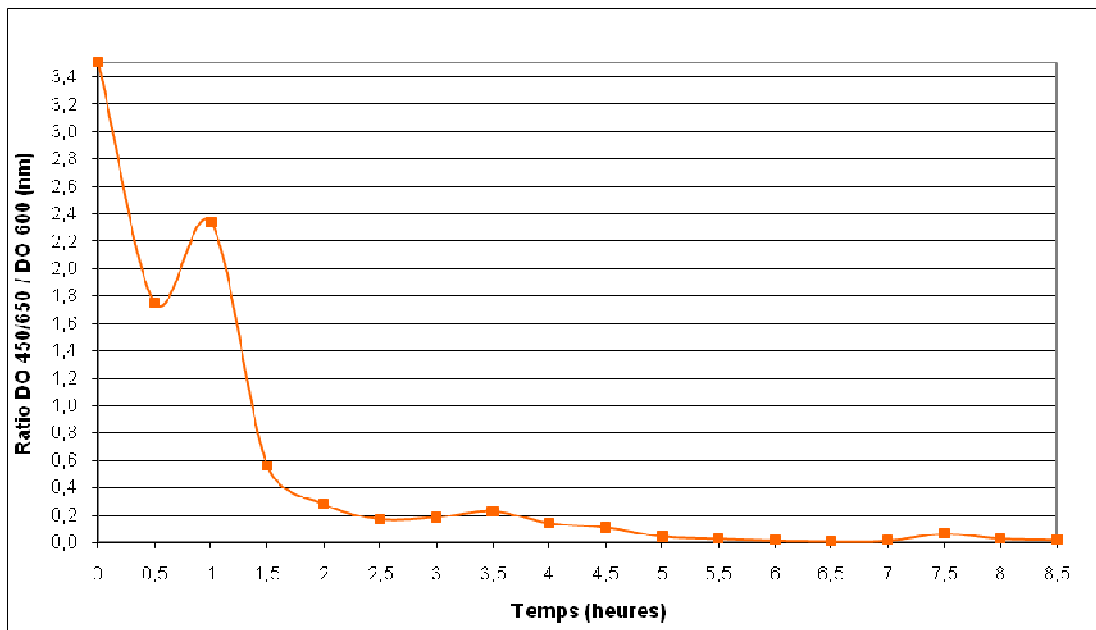


Fig. R.17 : Etude de la synthèse de la toxine par HSVR 82 au cours de la croissance bactérienne

A. Expression de la toxine et croissance bactérienne au cours de la cinétique de croissance de HSVR 82



B. Etude de l'évolution du ratio DO450/650nm sur DO600nm de HSVR 82 au cours de la croissance bactérienne



1.4.2. Conditions de croissance bactérienne et de réalisation du test ELISA retenues

Le choix du temps de croissance a été effectué en prenant en compte 4 points évoqués plus haut :

- 1) le cycle de croissance des bactéries, en restant dans la phase exponentielle de croissance ou à défaut en tout début de la phase stationnaire,
- 2) la saturation des mesures de $DO_{450/650nm}$ au-delà d'un certain temps (à partir de 4,5 H pour HSVR 149 par exemple)
- 3) le fait qu'avant un certain temps, le ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} était très variable d'une expérience à l'autre (jusque 3,5 H)
- 4) Le fait que la production de toxine par certaines souches exprimant celle-ci faiblement n'est détectée que sur un court laps de temps (entre 3,5 et 4,5 H pour HSVR 82).

La durée d'incubation de la culture bactérienne à 37°C préalable à la mesure que nous avons donc retenu est de 4 H.

2. Etude de l'expression de la toxine sur un panel de 50 souches

Les conditions expérimentales utilisées ont été définies lors des étapes de mise au point explicitées ci-dessus et détaillées dans la partie matériels et méthodes. Pour résumer, les 50 souches ont été cultivées durant 4 H en milieu BHI sous agitation à 37°C, puis l'absorbance à 600nm a été mesurée avant de diluer au tiers 250 µl de chaque suspension bactérienne. Le test ELISA est alors réalisé comme indiqué par le fournisseur.

2.1. Expression de la toxine en condition basale

La mesure de l'expression des toxines Stx par les 50 souches a été effectuée à plusieurs reprises, nous présentons ici les résultats de 3 séries d'expérimentations réalisées avec des plaques du même lot mais à partir de suspensions bactériennes préparées à des dates différentes. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.14 et fig. R.18

Tous nos résultats ont été normalisés par le calcul du ratio $DO_{450/650nm}$ divisé par DO_{600nm} , pour comparer le niveau d'expression de nos souches pour 10^9 UFC (1 unité de DO correspond à environ 10^9 UFC). En ne diluant pas nos échantillons, les souches produisant de faibles quantités de toxine, qui auraient ainsi été sous le seuil de détection du test, sont mises en évidence. Ainsi la production des souches HSVR 117, 119, 126, 134, 135, 138, 139, 140 et 150 pour lesquelles les $DO_{450/650nm}$ se situaient dans la zone d'incertitude lors de précédents tests effectués sur des échantillons dilués à $DO_{600nm} = 1$ (cf. tableau R.7) est détectée ici. Notons toutefois que la souche HSVR 7 détectée positive lors de ces précédents tests, apparaît nettement négative dans cette série de mesures. Pour certaines souches (HSVR 91 et 120), la moyenne des $DO_{450/650nm}$ est inférieure au seuil de positivité ($DO \geq 0.1$). Toutefois, ces souches ont donné un résultat positif pour au moins une des plaques ELISA. Les quantités de toxines produites par ces souches doivent donc être proches de la limite de détection du test ELISA. Ces souches ne peuvent donc pas en toute rigueur être considérées comme négatives. Elles sont représentées sur fond vert dans le tableau R.14.

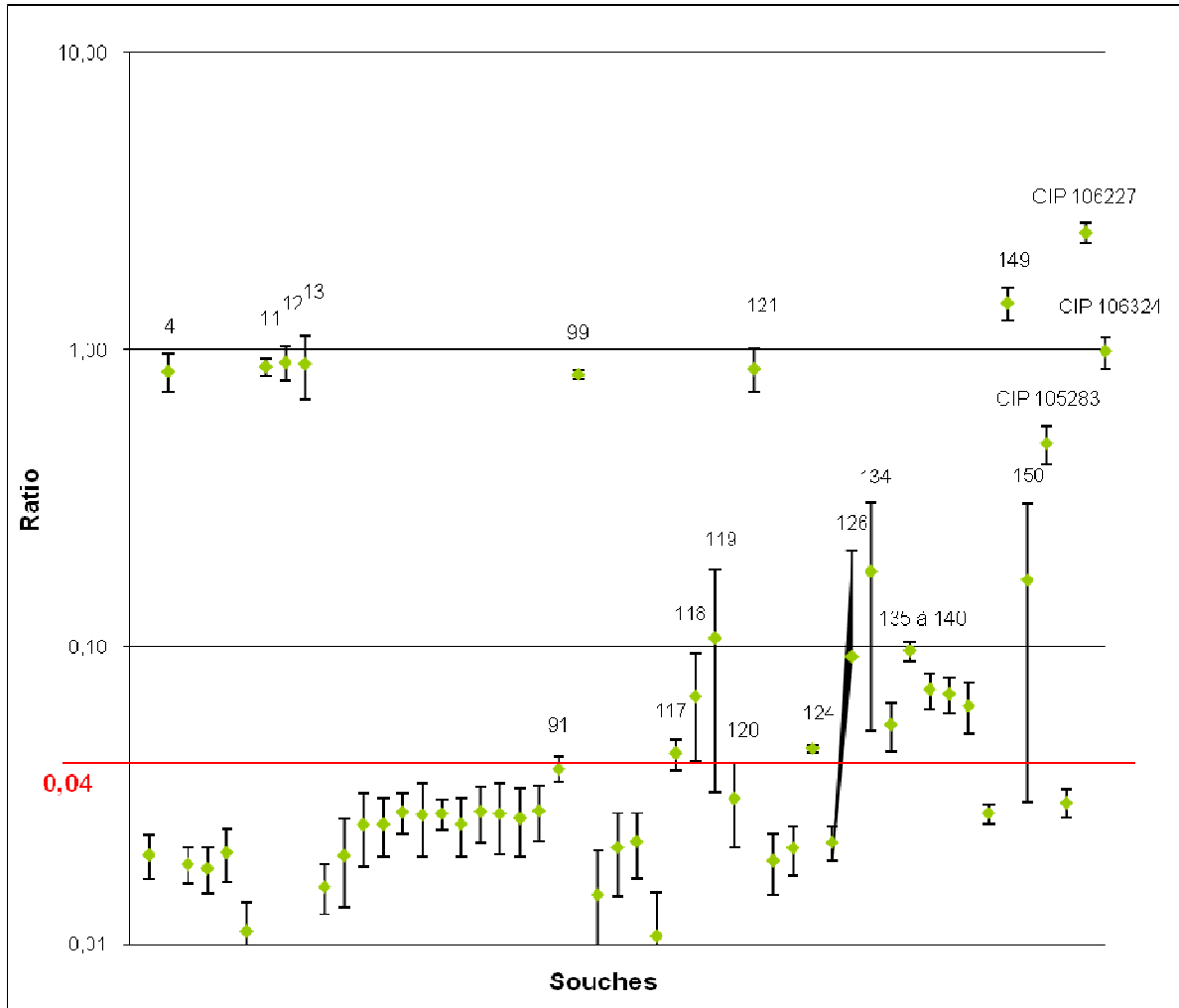
2.2. Effet de l'enrofloxacin sur la croissance bactérienne et sur l'expression de la toxine

Une partie des résultats que nous allons présenter dans cette partie ont fait l'objet de la publication "Characterization of inducible *stx2*-positive *Escherichia coli* O157:H7/H7- strains isolated from cattle in France" (2008) C. Maurer, C. Lazizzera and J. Y. Madec, Journal of Applied Microbiology, 104, 1569-1576

Tableau R.14 : Expression de la toxine pour les 50 souches en condition basale exprimée en ratio DO_{450/65nm} sur DO_{600nm}

N° Souche	DO _{600nm}	DO _{450/650nm}	Ratio	E.T. Ratio
HSVR 3	2,35	0,047	0,020	0,003
HSVR 4	2,32	1,937	0,846	0,12
HSVR 7	2,58	0,047	0,019	0,003
HSVR 8	2,67	0,047	0,018	0,003
HSVR 9	2,49	0,049	0,020	0,004
HSVR 10	2,80	0,030	0,011	0,003
HSVR 11	2,51	2,180	0,878	0,06
HSVR 12	2,46	2,193	0,906	0,12
HSVR 13	2,44	2,120	0,896	0,22
HSVR 40	2,63	0,040	0,016	0,003
HSVR 63	2,42	0,046	0,020	0,01
HSVR 73	2,28	0,056	0,025	0,01
HSVR 80	2,58	0,064	0,025	0,01
HSVR 81	2,61	0,072	0,028	0,004
HSVR 82	2,42	0,064	0,027	0,01
HSVR 84	2,45	0,067	0,028	0,003
HSVR 85	2,68	0,066	0,025	0,01
HSVR 86	2,65	0,072	0,028	0,01
HSVR 87	2,45	0,057	0,027	0,01
HSVR 89	2,62	0,067	0,027	0,01
HSVR 90	2,25	0,062	0,028	0,01
HSVR 91	2,26	0,088	0,039	0,004
HSVR 99	2,26	1,872	0,826	0,03
HSVR 100	2,61	0,037	0,015	0,01
HSVR 105	2,47	0,050	0,021	0,01
HSVR 114	2,33	0,050	0,022	0,01
HSVR 116	2,07	0,021	0,011	0,004
HSVR 117	2,58	0,112	0,044	0,01
HSVR 118	2,53	0,171	0,068	0,03
HSVR 119	2,46	0,261	0,107	0,07
HSVR 120	2,40	0,076	0,031	0,01
HSVR 121	2,15	1,886	0,863	0,14
HSVR 122	2,36	0,044	0,019	0,005
HSVR 123	2,45	0,051	0,021	0,004
HSVR 124	2,47	0,112	0,046	0,002
HSVR 125	2,34	0,051	0,022	0,003
HSVR 126	2,46	0,223	0,093	0,12
HSVR 134	2,30	0,416	0,180	0,13
HSVR 135	2,35	0,130	0,055	0,01
HSVR 137	2,36	0,228	0,097	0,01
HSVR 138	1,96	0,140	0,072	0,01
HSVR 139	1,94	0,135	0,069	0,01
HSVR 140	1,91	0,121	0,063	0,01
HSVR 148	2,05	0,057	0,028	0,002
HSVR 149	1,71	2,437	1,438	0,18
HSVR 150	1,98	0,323	0,168	0,14
CIP 105283	2,01	0,970	0,484	0,07
ATCC43888	1,37	0,041	0,030	0,003
ATCC43895	1,46	3,603	2,476	0,20
ATCC43889	1,98	1,945	0,986	0,12

Fig. R.18 : Mesure de l'expression de la toxine pour les 50 souches en condition sans antibiotique exprimé en ratio $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$



Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé pour chaque point du graphique
 Les souches ayant un ratio inférieur à 0,04 sont les souches pour lesquelles la moyenne des $DO_{450/650nm}$ est inférieure à 0,1

2.2.1. Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin

De la même manière que précédemment, nous avons mesuré le niveau d'expression de la toxine au cours de la cinétique de croissance et ce en présence de différentes

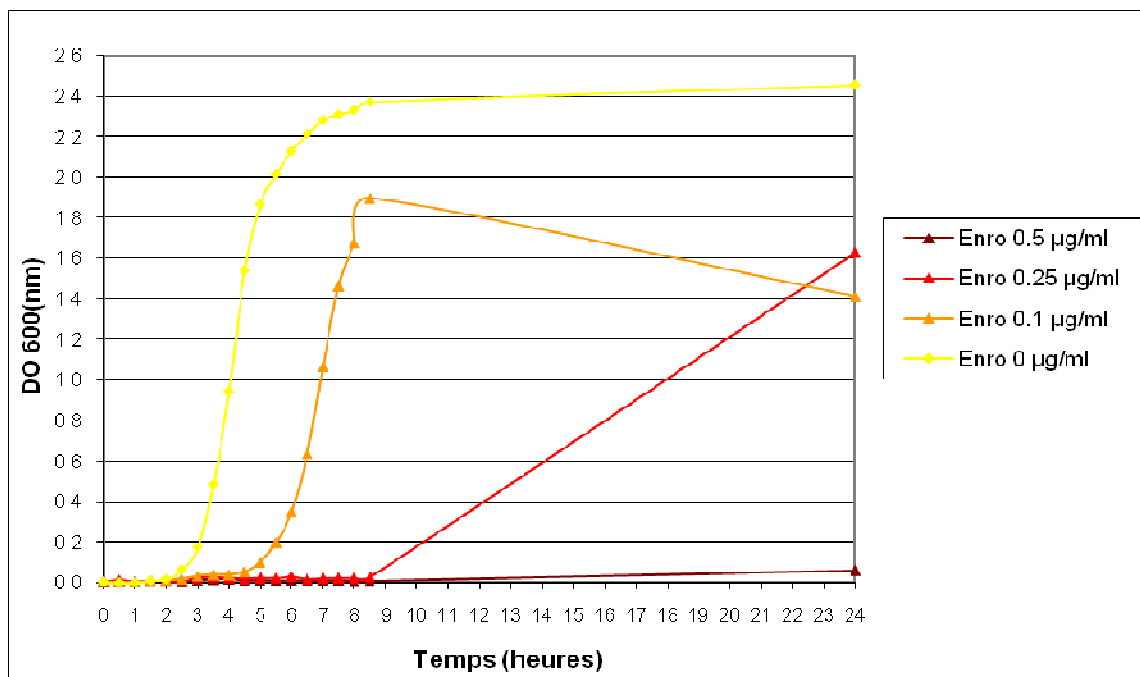
concentrations en enrofloxacin (0, 0,1, 0,25 et 0,5 µg/ml). Nous avons testé comment réagit une souche fortement productrice de toxine, HSVR 149. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.19

Pour la souche HSVR 149, on constate que la croissance bactérienne est perturbée par la présence d'enrofloxacin, de fortement ralentie, à 0,1 µg/ml d'enrofloxacin, à quasiment stoppée à 0,25 µg/ml d'enrofloxacin. L'expression de la toxine quant à elle est très forte, et ce quelque soient les concentrations d'enrofloxacin (0, 0,1, 0,25 ou 0,5 µg/ml). La $DO_{450/650nm}$ augmente rapidement entre 0 et 4 H et puis se stabilise sur des valeurs de culture les $DO_{450/650nm}$ comprises entre 0,7 et 2,5 en présence d'enrofloxacin. En absence d'antibiotique, la $DO_{450/650nm}$ augmente jusqu'à 6 H où elle atteint son maximum. La $DO_{450/650nm}$ en condition basale étant plus élevée qu'en présence d'enrofloxacin.

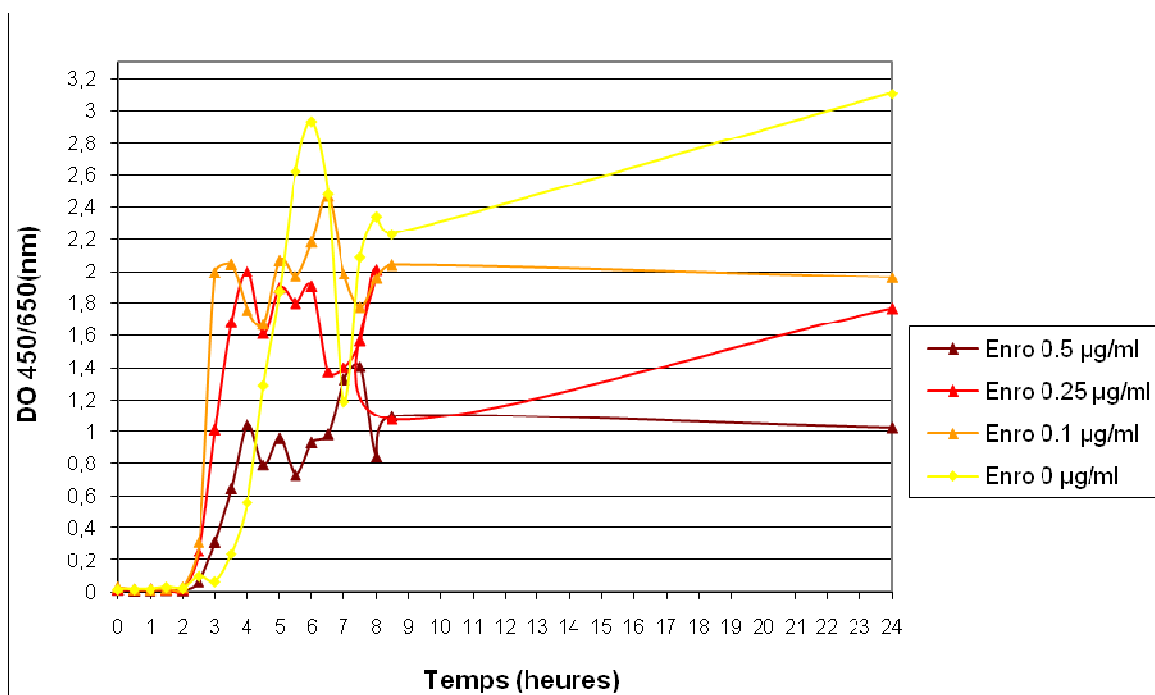
Lorsque la quantité de toxine est ramenée à une même concentration en bactéries, par la mesure du ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} , on constate que plus il ya d'enrofloxacin plus le ratio est élevé. Le ratio en condition basale étant nettement plus faible qu'en conditions induites (0,6 contre 44, 87 et 52 avec respectivement 0,1, 0,25 et 0,5 µg/ml d'enrofloxacin). Après 24 H les ratios en conditions induites retombent à des valeurs proches de 1. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.20

Fig. R.19 : Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 149 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin

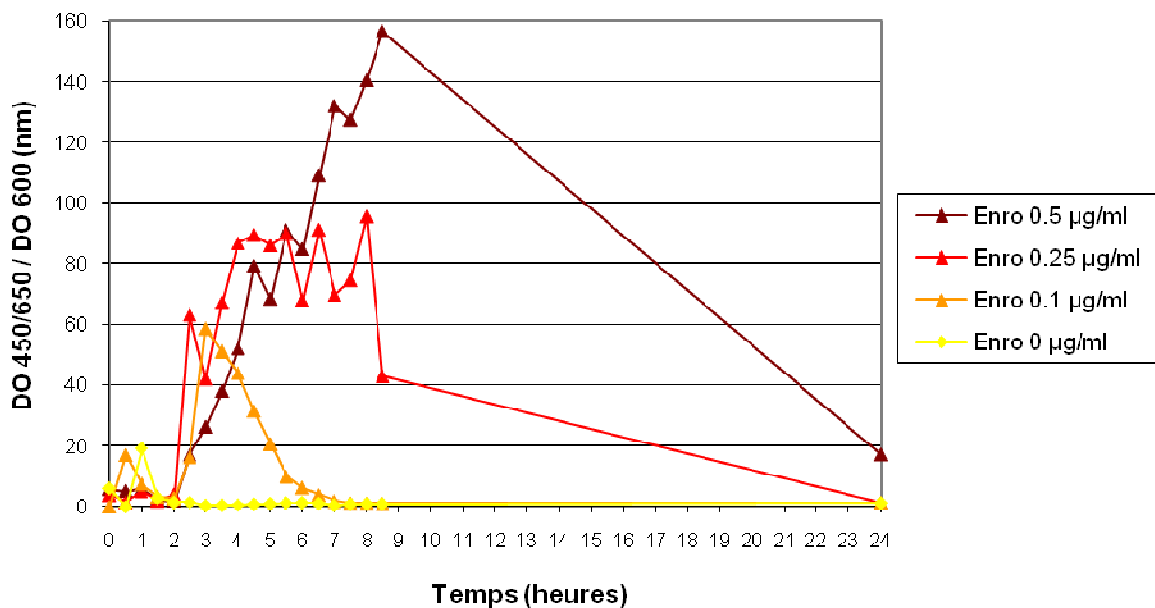
A : Cinétique de croissance de HSVR 149 en présence d'enrofloxacin



B : Cinétique d'expression de la toxine par HSVR 149 en fonction de la concentration en enrofloxacin



C : Evolution au cours du temps et en fonction de la concentration en enrofloxacin du ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} pour HSVR 149

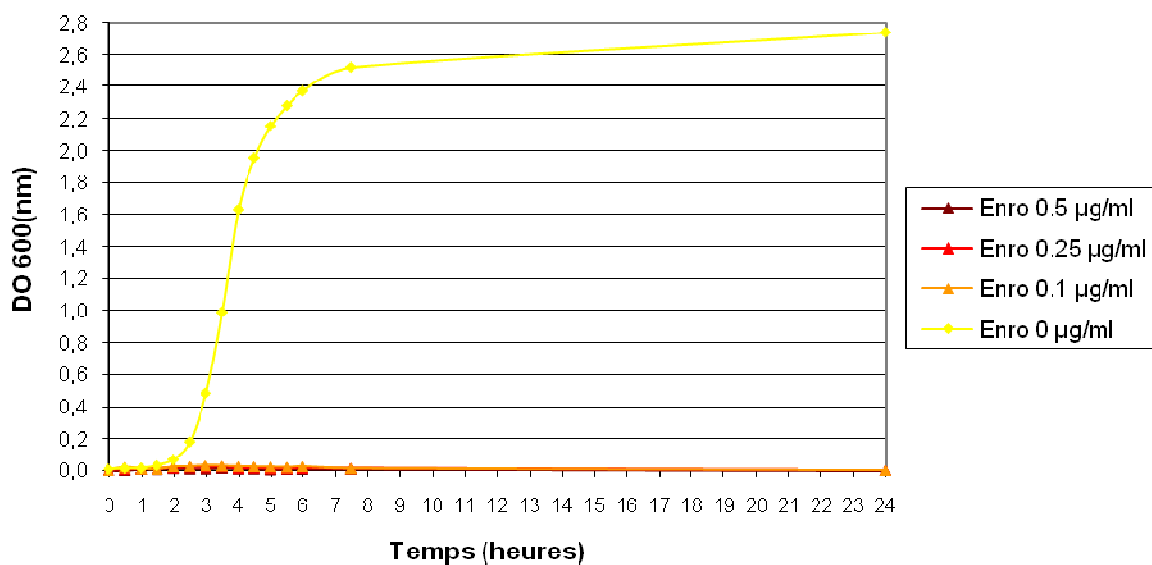


La croissance de la souche HSVR 91 est plus affectée que celle de HSVR 149, ici, même à 0,1 µg/ml d'enrofloxacin l'augmentation de la population bactérienne est très faible, et ce même après 24 H. La $DO_{450/650nm}$ est maximale sans enrofloxacin (à 4,5 H) et ont observe des résultats positifs que pour la concentration 0,1 µg/ml (entre 5 et 24 H).

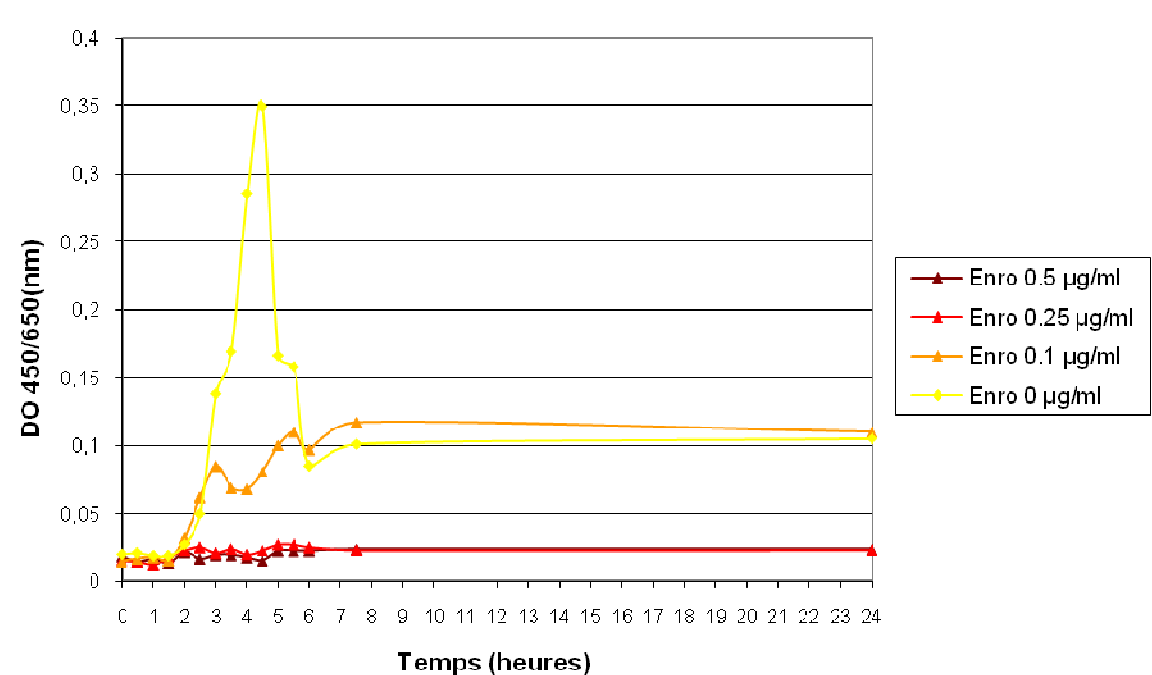
Au niveau du ratio, on constate à nouveau que sans enrofloxacin il est très faible avec 0,1 µg/ml il est le plus élevé (parmi les 4 conditions). Les ratios aux deux autres conditions induites étant entre ces 2 extrêmes (sans enrofloxacin et avec 0,1 µg/ml). Toutefois il faut noter que pour ces deux courbes, les ratios sont obtenus à partir de résultats ELISA inférieur au seuil de positivité, ils n'ont donc pas de sens biologique contrairement aux deux autres conditions pour lesquelles ont obtient des $DO_{450/650nm}$ inférieures à 0,1.

Fig. R.20 : Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 91 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin

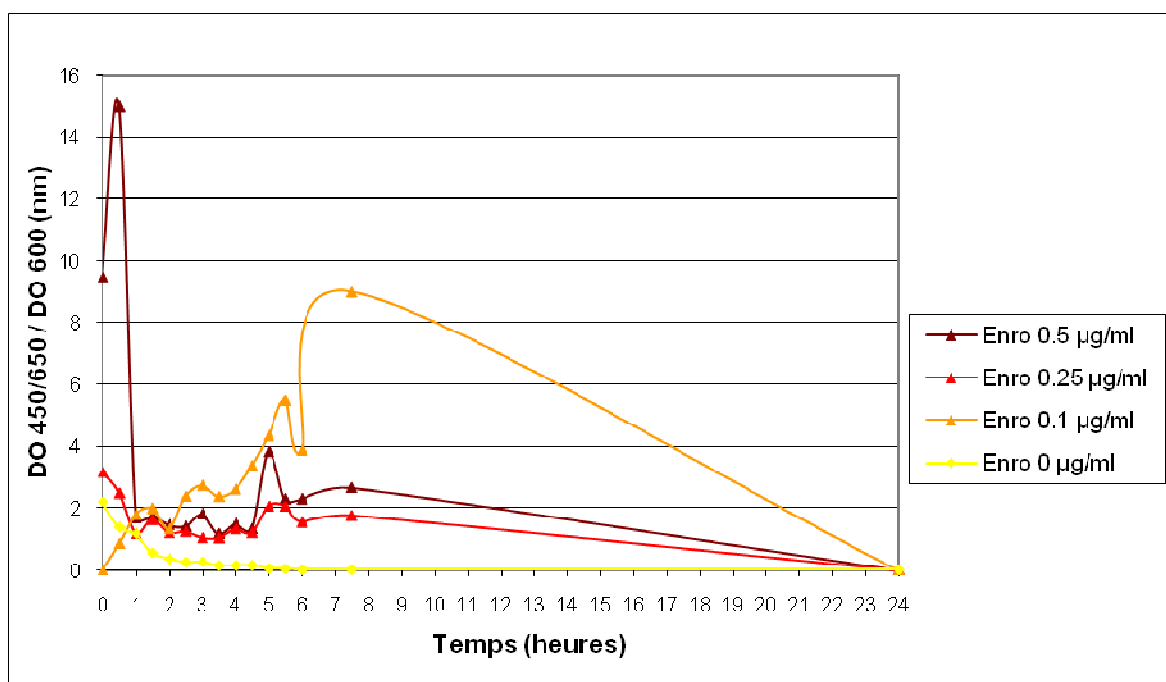
A. Cinétique de croissance de HSVR 91 en présence d'enrofloxacin



B. Cinétique d'expression de la toxine par HSRV 91 en fonction de la concentration en enrofloxacin



C. Evolution au cours du temps et en fonction de la concentration en enrofloxacin du ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} pour HSRV 91



2.2.2. Choix de la concentration en enrofloxacin pour l'induction

Nous avons mesuré les CMI des souches de notre panel pour l'enrofloxacin par Etest. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.15

Les CMI des souches sont comprises entre 0,064 et 0,125 µg/ml pour les 46 souches HSVR et 0,125 et 0,25 pour les 4 souches de référence.

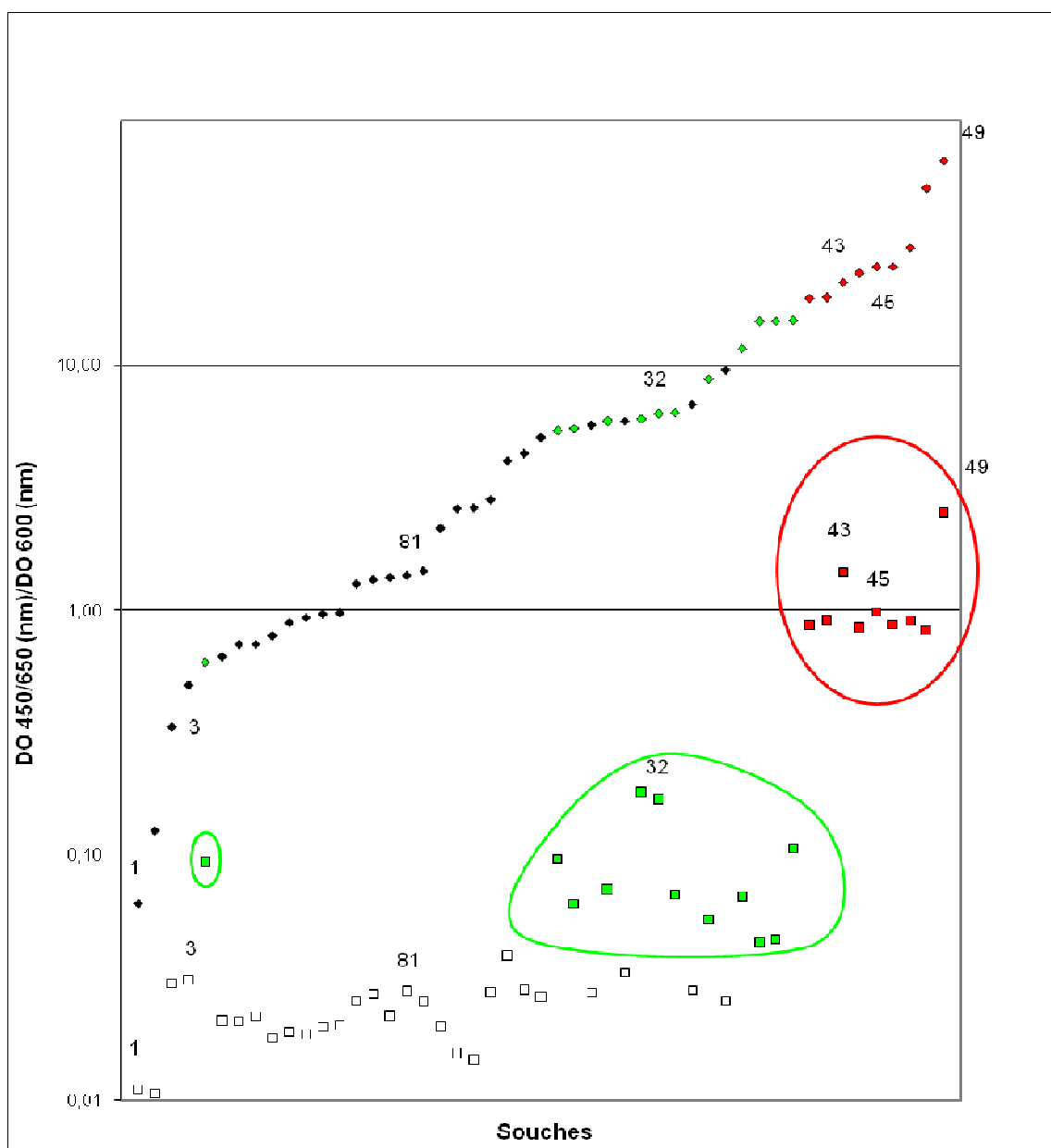
Au vu des résultats obtenus précédemment, et pour nous placer dans des conditions inhibant suffisamment la croissance bactérienne mais sans toutefois l'inhiber complètement, nous avons choisi de travailler à une concentration en enrofloxacin de 0,25 µg/ml.

Tableau R.15 : CMI des 50 souches du panel pour l'enrofloxacin

Souches HSVR ou souches de référence	CMI enrofloxacin (µg/ml)
3	0,064
4	0,094
7	0,094
8	0,094

9	0,094
10	0,125
11	0,094
12	0,094
13	0,094
40	0,094
63	0,094
73	0,125
80	0,125
81	0,125
82	0,125
84	0,094
85	0,094
86	0,094
87	0,125
89	0,094
90	0,094
91	0,125
99	0,094
100	0,125
105	0,094
114	0,094
116	0,094
117	0,094
118	0,094
119	0,094
120	0,125
121	0,094
122	0,094
123	0,125
124	0,064
125	0,125
126	0,094
134	0,125
135	0,125
137	0,125
138	0,094
139	0,125
140	0,125
148	0,125
149	0,125
150	0,094
CIP 105283 (stx1+)	0,25
ATCC 43888 (stx-)	0,125
ATCC 43895 (stx1+, stx2+)	0,125
ATCC 43889 (stx2+)	0,125

Fig. R.21 : Etude de l'expression de la toxine par un panel de 50 souches en présence ou en absence d'enrofloxacin



En rouge : HSVR 121, 12, 149, 4, ATCC 43889, 11, 13, 99 et ATCC 43895

En vert : HSVR 126, 137, 140, 138, 134, 150, 139, 135, 118, 117, 124 et 119

En blanc (condition basal) ou en noir (condition induite) : HSVR 10, 116, ATCC 43888, 120, 105, 123, 125, 8, 122, 7, 63, 9, 80, 82, 114, 81, 73, 3, 40, 100, 148, 91, 90, 89, 84, 87, 86, 85

2.2.3. Expression de la toxine par les 50 souches du panel en présence d'enrofloxacin

Nous avons traité en parallèle et ce à 3 reprises, les 50 souches en condition basale et en présence de 0,25 µg/ml d'enrofloxacin. L'ensemble des points expérimentaux dépassant la capacité d'une seule plaque, nous avons travaillé avec une plaque 96 puits plus 6 puits sur une autre plaque en prenant soin de choisir un même lot de fabrication pour les 3 séries de mesure. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.21 En condition sans antibiotique (représenté par des carrés), nous observons trois types de profils d'expression. Nous avons ainsi regroupé nos souches en trois sous groupes :

- En blanc, plus de la moitié des souches ne produisent pas de toxines ou des quantités insuffisantes pour être détectées par le test HSVR 3, 7, 8, 9, 10, 40, 63, 73, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 100, 105, 114, 116, 120, 122, 123, 125, 148, ATCC 43888
- En rouge, un groupe de 7 souches plus 2 références produisent de fortes quantités de toxines : HSVR 4, 11, 12, 13, 99, 121, 149 et ATCC 43895 (EDL 933), ATCC 43889
- En vert, 12 souches produisant de la toxine mais en quantité plus faible (à peine au-dessus du seuil de détection) : HSVR 117, 118, 119, 124, 126, 134, 135, 137, 138, 139, 140, 150

En traitant au préalable les souches avec de l'enrofloxacin (représenté par des losanges), on observe que toutes les souches terrain sauf 2 et le témoin négatif ATCC 43888 produisent des quantités détectables de toxine. Pour toutes les souches positives en condition basale, on observe une augmentation de la production de toxines, même pour les souches du sous-groupe pour lesquelles on avait un niveau d'expression déjà très élevé sans inducteur.

Dans le cas où les cultures bactériennes sont traitées avec des antibiotiques, le nombre de bactéries présentes dans le milieu peut être très faible ($DO_{600nm} \ll 1$ unité de DO). Comme je l'indiquais précédemment, les valeurs obtenues pour les ratios doivent être comparées avec prudence quand il s'agit de résultats négatifs en ELISA et de résultats positifs dans la zone de saturation du lecteur de plaque. Dans le cas des échantillons traités avec un antibiotique, la faiblesse de certaines mesures de DO_{600nm} pourraient augmenter l'incertitude des ratios $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} . Une très faible variation de la DO_{600nm} (donc du dénominateur du ratio) entraînant une grande variation du ratio. Par exemple à DO ELISA égale, passer d'une DO_{600nm} de 0,04 à 0,02 entraîne le doublement de la valeur du ratio.

2.2.4. Persistance de l'induction dans le temps

Nous voulions savoir si l'induction par l'enrofloxacin perdurait dans le temps même si l'enrofloxacin était retirée du milieu ou si, pour les cultures induites par l'enrofloxacin, l'expression de la toxine restait modifiée de façon durable par rapport au niveau basal. Nous avons donc réalisé l'induction de 3 des souches du panel, HSVR 87, 100 et 149 pendant 4 H avec différentes concentrations d'enrofloxacin (0 ; 0,1 ; 0 ; 5 ; 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$) puis après mesure de la DO_{600nm} et préparation des suspensions bactériennes pour réaliser un ELISA, nous avons procédé à l'élimination de l'enrofloxacin par 3 lavages successifs et dilution au 1/10 des suspensions bactériennes en bouillon BHI. Les cultures ont été diluées au 1/10 puis remises à pousser 3 H jusqu'à mesure de la DO_{600nm} et préparation des échantillons pour l'ELISA. Enfin, le reste des cultures à été remise à incuber 13 H avant de réaliser une dernière fois une mesure de DO_{600nm} et la préparation des échantillons pour l'ELISA. L'ELISA a ensuite été réalisé.

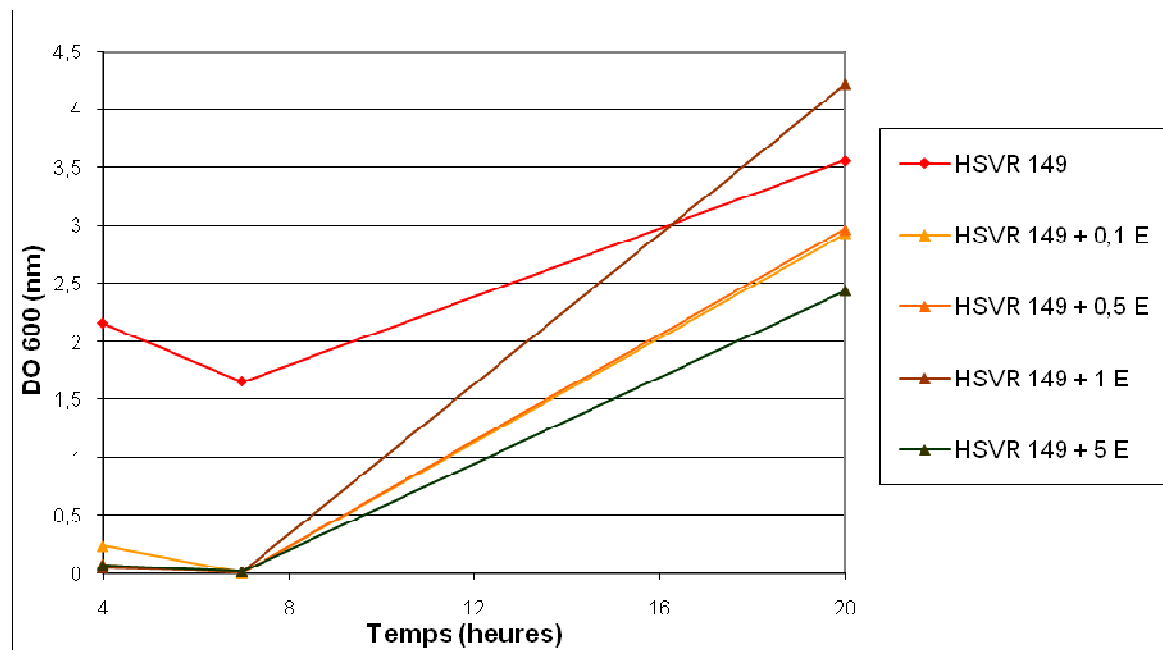
Nous n'avons représenté ici que les résultats obtenus pour HSVR 149 et HSVR 87, les résultats des tests ELISA étant quasiment tous négatifs pour HSVR 100. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.22

Pour la souche HSVR 149, en absence d'antibiotique ainsi qu'en présence d'enrofloxacin, la souche produit de fortes quantités de toxines. La $DO_{450/650nm}$ proche de 4 pour tous les échantillons sauf avec la plus forte concentration d'enrofloxacin où la $DO_{450/650nm}$ est de 0,5. En condition basale, le ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} est de 1,73. En conditions induites, les ratios vont de 8.63 à 79,10. Les résultats obtenus sont présentés fig. R.23

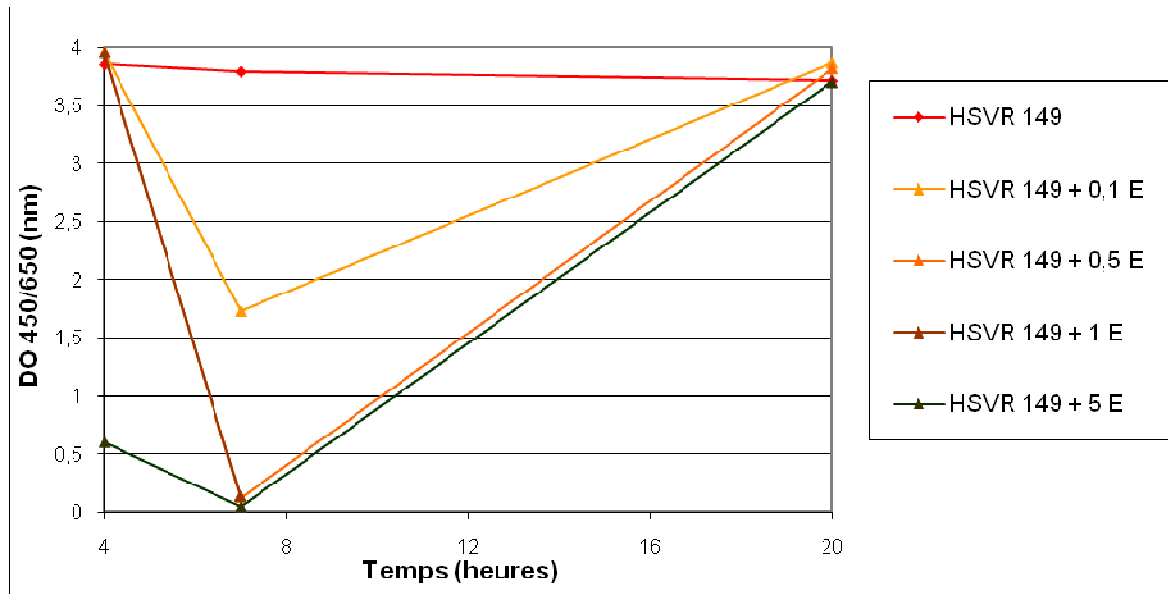
Pour la souche HSVR 87, on observe qu'en condition basale, la souche ne produit pas de quantité détectable de toxine par contre en présence d'enrofloxacin, l'expression de la toxine est induite et même fortement ($DO_{450/650nm} = 3,374$ avec $0,1 \mu g/ml$ d'enrofloxacin), les ratios $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} allant de 5,46 à 14,96.

Fig. R.22 : Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 149 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin

A. Cinétique de croissance de HSVR 149 en présence d'enrofloxacin



B. Cinétique d'expression de la toxine par HSVR 149 en fonction de la concentration en enrofloxacin



C. Evolution au cours du temps et en fonction de la concentration en enrofloxacin du ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} pour HSVR 149

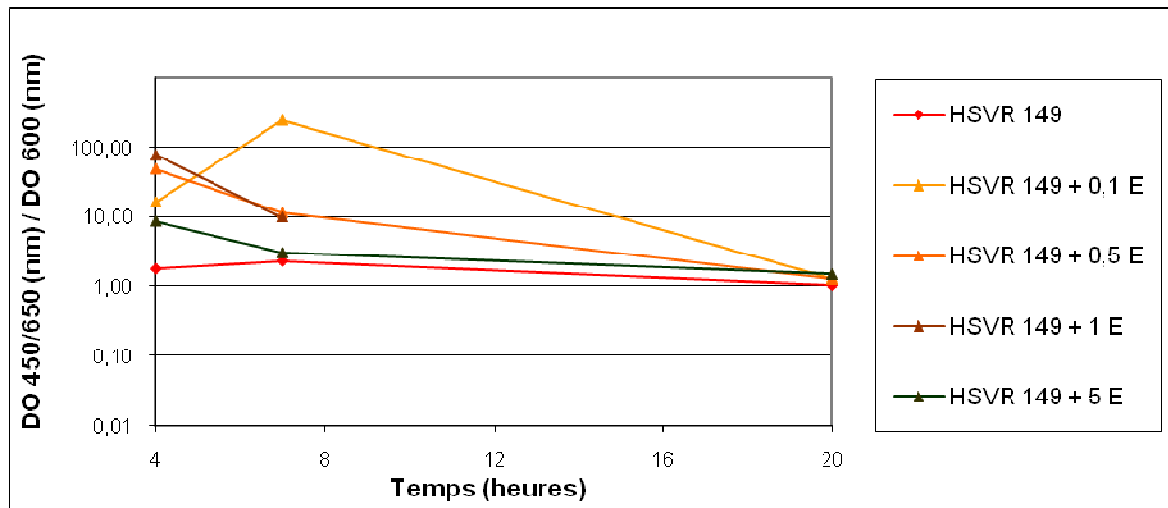
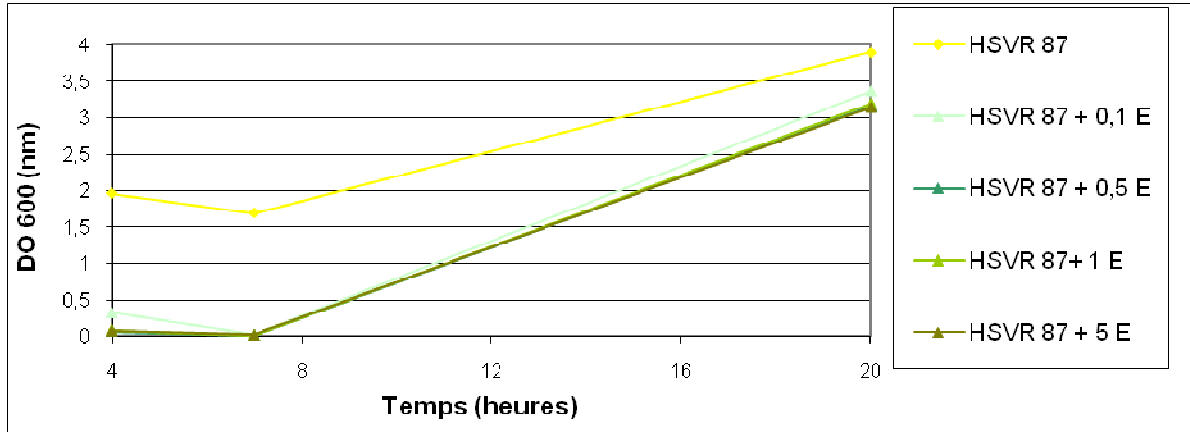
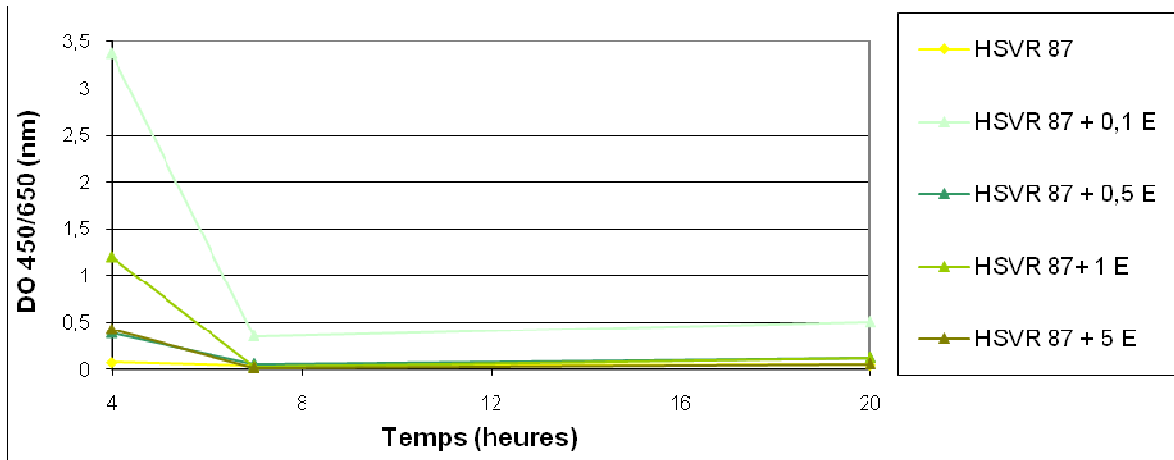


Fig. R.23 : Etude de la croissance bactérienne et de l'expression de la toxine par HSVR 87 en présence de plusieurs concentrations en enrofloxacin

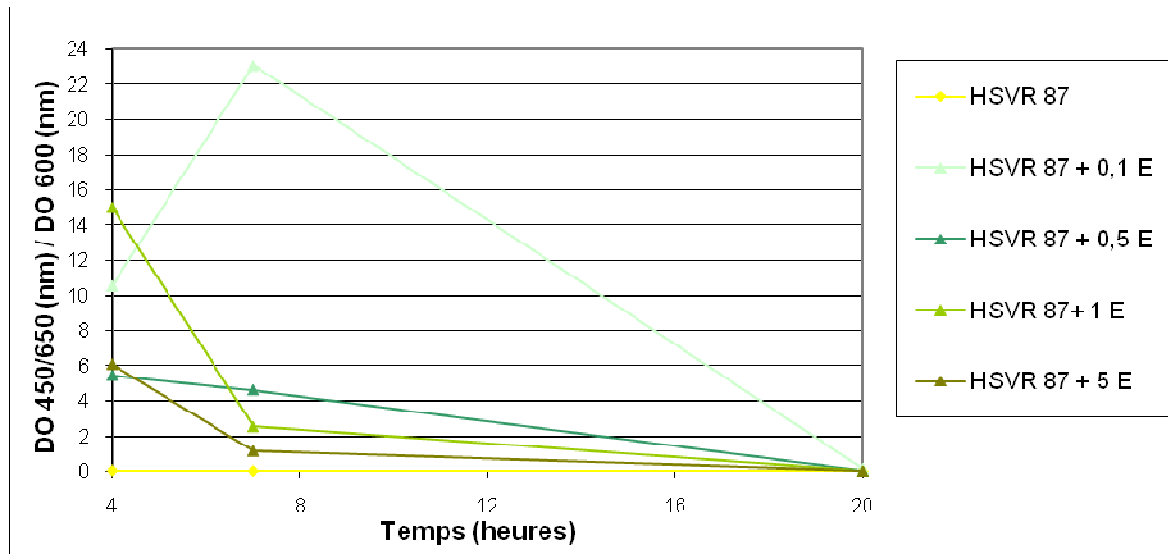
A. Cinétique de croissance de HSVR 87 en présence d'enrofloxacin



B. Cinétique d'expression de la toxine par HSVR 87 en fonction de la concentration en enrofloxacin



C. Evolution au cours du temps et en fonction de la concentration en enrofloxacin de ratio $DO_{450/650nm}$ sur DO_{600nm} pour HSVR 87



Après lavage et 3 H de culture supplémentaire, toutes les $DO_{450/650nm}$ ont nettement chuté, les profils observés étant similaires, quelques soient les concentrations en enrofloxacin, au profil de la souche en condition basale. Seule reste supérieure au seuil de positivité l'échantillon traité avec 0,1 $\mu g/ml$ d'enrofloxacin. La $DO_{450/650nm}$ passe toutefois de 3,374 à 0,346. Mais la DO_{600nm} étant 20 fois plus faible que celle mesurée avant lavage et dilution. Le ratio reste donc très élevé (23,07 contre 10,54 en présence de 0,1 $\mu g/ml$ d'enrofloxacin). Cet écart d'un facteur 20 peut s'expliquer par la faiblesse de la DO_{600nm} après dilution, 0,015, avec un risque d'erreur très élevé. L'élimination de l'enrofloxacin ne semble donc avoir ramené cet échantillon à un état basal.

En revanche, après 13 H d'incubation supplémentaire, les DO_{600nm} augmentent nettement. Les $DO_{450/650nm}$ dépassent tout juste le seuil de positivité, respectivement 0,119 et 0,121, pour les échantillons traités initialement avec 0,5 et 1 $\mu g/ml$ d'enrofloxacin. Les ratios calculés correspondent à celui obtenu en condition basale après 4 h de culture (0,04). Par contre l'échantillon traité avec 0,1 $\mu g/ml$ a une $DO_{450/650nm}$ et un ratio légèrement plus élevé (respectivement 0,503 et 0,15).

3. Recherche et sélection de STEC résistants aux (fluoro)quinolones

Dans le but de mieux comprendre comment l'enrofloxacin et l'acide nalidixique influent sur l'expression de la toxine, nous avons ensuite souhaité adresser la question de l'expression de shiga-toxines par des souches résistantes à cette famille d'antibiotiques. En effet, la pression maintenue sur la microflore intestinale bovine par l'usage de fluoroquinolones conduit nécessairement à la sélection de souches résistantes. Lorsque de telles souches sont également porteuses de gènes *stx*, il y a lieu de formuler l'hypothèse que l'induction de l'expression des shiga-toxines puisse être modifiée.

3.1. Recherche de STEC résistants aux (fluoro)quinolones ou d'*E. coli* résistantes aux (fluoro)quinolones possédant le gène *stx*

En premier lieu, nous avons recherché l'existence de souches d'*E. coli* possédant le gène *stx* et la résistance aux fluoroquinolones parmi celles collectées au sein du réseau de surveillance de l'antibiorésistance animale en contexte pathogène (réseau Resapath).

Cette recherche du ou des gènes *stx* effectuée par PCR sur 113 souches résistantes aux fluoroquinolones est restée infructueuse.

3.2. Sélection et test de mutants résistants à l'enrofloxacin et à l'acide nalidixique

La recherche précédente n'ayant pas permis d'isoler de STEC résistants aux quinolones et/ou aux fluoroquinolones, nous avons décidé de les sélectionner au laboratoire à partir de certaines des souches de notre panel.

Nous avons ainsi choisi de concentrer nos efforts sur 3 souches retenues pour leur diversité en terme d'expression de la toxine et/ou d'origine : la souche bovine HSVR 149 produisant de grandes quantités de toxine quelles que soient les conditions, la souche bovine HSVR 87 ne produisant des quantités détectables de toxines qu'en condition induite et la souche de référence ATCC 43889, isolée chez un patient et produisant également de grandes quantités de toxines (cf. fig. R.21).

3.2.1. Sélection de STEC résistants à l'acide nalidixique et/ou à l'enrofloxacin

La sélection a été effectuée par passages successifs sur des milieux sélectifs avec des concentrations croissantes en antibiotique. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.16

Nous avons ainsi pu sélectionner des mutants ayant des niveaux variables de résistance aux deux antibiotiques et ce, quel que soit l'antibiotique utilisé pour réaliser la sélection. Les CMI des souches résistantes se sont étalées jusqu'à 3 µg/ml pour l'enrofloxacin et supérieur à 256 µg/ml pour l'acide nalidixique, dans les deux cas supérieures aux valeurs de CMI données par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) pour la catégorisation des souches résistantes (acide nalidixique : > 16µg/ml ; enrofloxacin : > 2 µg/ml).

Tableau R.16 : CMI pour l'enrofloxacin et pour l'acide nalidixique des souches natives et mutantes sélectionnées

A. CMI pour l'enrofloxacin et pour l'acide nalidixique des souches natives et mutantes sélectionnées avec l'acide nalidixique

Etapas de sélection	HSVR 87		HSVR 149		ATCC 43889	
	CMI NA	CMI EN	CMI NA	CMI EN	CMI NA	CMI EN
Natives	3	0,125	3	0,125	4	0,125
Sél NA2	3	0,125	3	0,125	4	0,19
Sél NA3	128	0,5	24	0,25	12	0,19
Sél NA4 A			>256	0,75	48	0,25
Sél NA4 B	>256	1	48	0,38	48	0,25
Sél NA5	>256	1			128	0,5
Sél NA6 A					192	0,75
Sél NA6 B					>256	2
Sél NA7 A						
Sél NA7 B						
Sél NA7 C						
Sél NA7 D						

B. CMI pour l'enrofloxacin et pour l'acide nalidixique des souches natives et mutantes sélectionnées avec l'enrofloxacin

Etapas de sélection	HSVR 87		HSVR 149		ATCC 43889	
	CMI NA	CMI EN	CMI NA	CMI EN	CMI NA	CMI EN
Natives	3	0,125	3	0,125	4	0,125
Sél EN2	3	0,19	2	0,094	3	0,19
Sél EN3	48	0,38	2	0,064	>256	1
Sél EN4 A			>256	1		
Sél EN4 B	192	0,75			>256	1,5
Sél EN4 C	>256	1,5			>256	3
Sél EN4 D						
Sél EN4 E						

Les CMI sont indiquées en µg/ml

La première colonne liste les étapes de sélection au cours desquelles, un ou plusieurs mutants ont été sélectionnés. Les CMI, pour l'acide nalidixique (NA) et l'enrofloxacin (EN), sont indiquées pour chaque souche native ou mutante.

En vert est représenté le meilleur niveau de résistance obtenu, après sélection de mutant, à partir des 4 souches natives.

3.2.2. Etude de l'expression de la toxine après induction par l'enrofloxacin (publication n°2)

Les études d'expression de la toxine par ELISA ont été réalisées sur toutes les souches mutantes représentées sur fond vert Tableau R.16. Toutefois, seule la souche mutante HSVR 149 EN4 A et la souche sauvage correspondante HSVR 149 ont été comparées à plusieurs reprises et en triple. Les résultats pour les autres mutants ont été obtenus sur une seule série de mesure réalisée une ou deux fois selon les souches. Les résultats obtenus pour les souches HSVR 87 NA5 et HSVR 87 EN4 C sont représentés tableau R.17

Tableau R.17 : Expression de la toxine par HSVR 87 et les mutants HSVR 87 NA5 et HSVR 87 EN4 C en condition basale ou induite par l'enrofloxacin

Souche	EN µg/ml	DO _{600nm} =B	DO _{450/650nm} =E	Ratio E/B
HSVR 87 (CMI=0,125 µg/ml)	0	3,44	0,07	
	0,125	0,16	2,041	12,76
	0,75	0,022	0,064	
	1,5	0,014	0,027	
	3	0,011	0,024	
	10	0,009	0,026	
HSVR 87 EN4 C (CMI=1,5 µg/ml)	0	2,99	0,068	
	0,125	3,2	0,266	0,08
	0,75	1,26	0,903	0,72
	1,5	0,37	1,176	3,18
	3	0,059	1,079	18,29
	10	0,027	0,185	6,85
HSVR 87 NA5 (CMI=1 µg/ml)	0	3,03	0,07	
	0,125	3,03	0,308	0,10
	0,75	1,36	1,875	1,38
	1,5	0,28	2,452	8,76
	3	0,058	0,911	15,71
	10	0,024	0,217	9,04

Souche	EN µg/ml	DO _{600nm} =B	DO _{450/650nm} =E	Ratio E/B
HSVR 87 (CMI=0,125 µg/ml)	0	3,82	0,066	
	0,125	0,134	1,682	12,55
	0,75	0,02	0,053	
	1,5	0,013	0,072	
	3	0,012	0,034	
	10	0,005	ND	
HSVR 87 EN4 C (CMI=1,5 µg/ml)	0	2,99	0,065	
	0,125	2,43	0,29	0,12
	0,75	0,45	2,344	5,21
	1,5	0,34	2,32	6,82
	3	0,123	1,998	16,24
	10	0,05	0,208	4,16
HSVR 87 NA5 (CMI=1 µg/ml)	0	2,52	0,065	
	0,125	2,13	0,193	0,09
	0,75	0,75	1,167	1,56
	1,5	0,57	1,743	3,06
	3	0,094	1,099	11,69
	10	0,03	0,089	2,97

EN = enrofloxacin

Les zones en jaune clair correspondent à des conditions où les toxines stx sont détectées ($DO_{450/650nm} > 0,1$) et bleu clair la zone d'incertitude ($0,07 < DO_{450/650nm} \leq 0,1$)

De manière intéressante, les souches mutantes HSVR 87 NA5 et HSVR 87 EN4 C, en absence d'antibiotique, et comme la souche native correspondante, ne produisent pas de quantité détectable de toxine. La souche native ne produit de quantité de toxine détectable qu'à 0.125 µg/ml d'enrofloxacin tandis que pour les souches mutantes, la toxine est détectable jusqu'à 10 µg/ml d'enrofloxacin. Les ratios $DO_{450/650nm}$ sont du même ordre de grandeur (de 12,55 à 18,29) pour la souche native à 0,125 µg/ml d'enrofloxacin et les souches mutantes à 3 µg/ml d'enrofloxacin, c'est à dire 2 à 3 fois leur CMI.

Les résultats obtenus pour les souches ATCC 43889, ATCC 43889 NA5, ATCC 43889 NA6 B et ATCC 43889 EN4 C sont représentés Tableau R.18

Tableau R.18 : Expression de la toxine par ATCC 43889 et les mutants ATCC 43889 NA5, ATCC 43889 NA6 B et ATCC 43889 EN4 C en condition basale ou induite par l'enrofloxacin

Souche	EN µg/ml	DO _{600nm} =B	DO _{450/650nm} =E	Ratio E/B*10	Ti/0	Ti/natif
ATCC 43889 (CMI=0,125 µg/ml)	0	2,35	0,436	1,9		
	0,125	0,072	3,362	467	252	
	0,75	0,007	1,902	2717	1465	
	1,5	0,008	0,619	774	417	
	3	0,007	0,254	363	196	
	10	0,005	0,143	286	154	
ATCC 43889 NA 5 (CMI=0,5 µg/ml)	0	1,25	0,185	1,5		0,8
	0,125	0,69	0,596	9	6	0,02
	0,75	0,22	2,875	131	88	0,05
	1,5	0,19	3,076	162	109	0,2
	3	0,002	1,72	8600	5811	24
	10	0,001	0,143	1430	966	5
ATCC 43889 NA6 A (CMI=0,75 µg/ml)	0	0,74	0,113	1,5		0,8
	0,125	0,43	0,357	8	5	0,02
	0,75	0,068	2,446	360	236	0,1
	1,5	0,02	1,994	997	653	1,3
	3	0,014	1,865	1332	872	4
	10	0,007	0,104	149	97	0,5

Souche	EN µg/ml	DO _{600nm} =B	DO _{450/650nm} =E	Ratio E/B*10	Ti/0	Ti/natif
ATCC 43889 (CMI=0,125 µg/ml)	0	3,21	0,451	1,4		
	0,125	0,35	4	114	81	
	0,75	0,203	0,778	38	27	
	1,5	0,013	0,237	182	130	
	3	0,009	0,097	108	77	
	10	0,008	0,023	0,00		
ATCC 43889 NA6 B (CMI=2 µg/ml)	0	1,91	0,158	0,8		0,6
	0,125	2,12	0,421	2	2,4	0,02
	0,75	1,87	1,661	9	11	0,2
	1,5	1,29	2,95	23	28	0,1
	3	0,28	3,425	122	148	1,1
	10	0,024	2,537	1057	1278	/

Souche	EN µg/ml	DO _{600nm} =B	DO _{450/650nm} =E	Ratio E/B*10	Ti/0	Ti/natif
ATCC 43889 (CMI=0,125 µg/ml)	0	3,32	0,442	1,3		
	0,125	0,2	3,192	160	120	
	0,75	0,006	0,384	640	481	
	1,5	0,005	0,291	582	437	
	3	0,006	0,054			
	10	0,006	0,021			
ATCC 43889 EN4 C (CMI=3 µg/ml)	0	2,55	0,291	1,1		0,9
	0,125	2,68	0,816	3	2,7	0,02
	0,75	2,43	2,221	9	3	0,01
	1,5	2,59	3,046	12	1,3	0,02
	3	0,12	2,766	231	20	
	10	0,17	2,902	171	0,7	

EN = enrofloxacin

Ti = taux d'induction (rapport de 2 ratios $DO_{450/650nm} / DO_{600nm}$)

Ti/0 = taux d'induction par rapport à la condition sans antibiotique pour une même souche

Ti/natif = taux d'induction de la souche mutante par rapport à la souche native pour une même concentration en antibiotique

Les ratios E/B sont multipliés par 10 car les échantillons ont été dilués au 1/10 pour réaliser l'ELISA

Les zones en jaune clair correspondent à des conditions où les toxines stx sont détectées ($DO_{450/650nm} > 0,1$) et bleu clair la zone d'incertitude ($0,07 < DO_{450/650nm} \leq 0,1$)

Les niveaux d'expression de la toxine produite par les mutants obtenus à partir de la souche de référence ATCC 43889 semblent varier en fonction des CMI souches testées. La souche ATCC 43889 produit des quantités détectables de toxine jusqu'à 1,5-3 µg/ml d'enrofloxacin contre 3, 10 et 10 µg/ml respectivement pour les souches ATCC 43889 NA5, ATCC 43889 NA6 B et ATCC 43889 EN4 C. Le ratio $DO_{450/650nm} / DO_{600nm}$ pour la souche native atteint 680 dans la première série de mesures et 182 dans la seconde, ces valeurs maximales étant atteintes à des concentrations en enrofloxacines supérieures à la CMI de la souche (0,75 et 1,5 µg/ml respectivement avec une CMI= 0,125 µg/ml). Pour les souches mutantes, les valeurs maximales du ratio sont également atteintes pour des concentrations en

antibiotique supérieures ou égales aux CMI : à 1,5 µg/ml pour ATCC 43889 NA5 (CMI= 0,5 µg/ml), à 1,5 µg/ml pour ATCC 43889 NA6 B (CMI= 2 µg/ml) et à 3 µg/ml pour ATCC 43889 EN4 B (CMI= 3 µg/ml).

Puis, pour mieux comparer le niveau d'induction d'une souche mutante par rapport à la souche native, en fonction de la concentration en enrofloxacin, nous avons calculé le rapport des ratios $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$ de la souche mutante par rapport à la souche native (Ti/natif). De plus, pour mettre en évidence l'effet de l'induction sur chacune des souches, nous avons également calculé le niveau d'induction d'une souche donnée en présence d'enrofloxacin par rapport à la condition basale, sans antibiotique (Ti/0). Les résultats obtenus pour les souches HSVR 149, HSVR 149 NA3, HSVR 149 NA4 A et HSVR 149 NA4 B sont représentés tableau R.19

Les 3 souches HSVR 149 mutantes testées, HSVR 149 NA3, HSVR 149 NA4 A et HSVR 149 NA4 B (CMI respectives de 0,25 ; 0,75 et 0,38 µg/ml) ayant une résistance à peine supérieure à celle de la souche native (CMI= 0,125 µg/ml), on n'observe pas de grandes différences de survie aux concentrations en enrofloxacin testées. En revanche, les niveaux de production de toxine des souches mutantes, mis en évidence par les ratios $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$, sont de 10 à 20 fois supérieures à ceux de la souche native (13910, 6730 et 13930 contre 611 pour HSVR149). L'inductibilité des souches mutantes, mesurée par le taux d'induction en présence d'enrofloxacin par rapport à la condition sans antibiotique (Ti/0) est également 7 à 10 fois supérieure à celle de la souche native (88821, 1224 et 1025 contre 112 pour la souche native).

Nous avons décidé d'approfondir les résultats obtenus en testant une 4^{ème} souche mutante ayant une CMI plus importante que les 3 mutants testés précédemment (HSVR 149 EN4 A, CMI= 1 µg/ml). Pour cela, nous avons réalisé un ELISA en triplicate pour chaque échantillon bactérien sur une gamme de concentration en enrofloxacin de 0,125 à 10 µg/ml. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.20 et fig. R.24

Tableau R.19 : Expression de la toxine par HSVR 149, HSVR 149 NA3, HSVR 149 NA4 A et HSVR 149 NA4 B en condition basale ou induite par l'enrofloxacin

Souche	EN µg/ml	DO _{600nm} =B	DO _{450/650nm} =E	Ratio E/B*10	Ti/0	Ti/natif
HSVR 149 (CMI=0,125 µg/ml)	0	2,17	1,186	5		
	0,125	0,14	3,744	267	49	
	0,75	0,027	1,65	611	112	
	1,5	0,036	0,766	213	39	
	3	0,025	0,243	97	18	
	10	0,012	0,047			
HSVR 149 NA3 (CMI=0,25 µg/ml)	0	1,54	2,61	17		3,4
	0,125	1,58	2,938	19	1,1	0,1
	0,75	0,34	3,561	105	6	0,2
	1,5	0,021	2,584	1230	73	5,8
	3	0,005	1,874	3748	221	38,6
	10	0,001	1,391	13910	821	
HSVR 149 NA4 A (CMI= 0,75 µg/ml)	0	1,79	0,984	5		1
	0,125	1,85	1,971	11	1,9	0,04
	0,75	0,45	3,393	75	14	0,1
	1,5	0,09	2,943	327	59	1,5
	3	0,029	1,51	521	95	5,4
	10	0,002	1,346	6730	1224	
HSVR 149 NA4 B (CMI=0,38 µg/ml)	0	1,77	2,405	14		2,8
	0,125	1,37	2,879	21	1,5	0,1
	0,75	0,1	3,333	333	25	0,5
	1,5	0,017	2,279	1341	99	6,3
	3	0,005	1,823	3646	268	37,6
	10	0,001	1,393	13930	1025	

EN = enrofloxacin

Ti = taux d'induction (rapport de 2 ratios DO_{450/650nm}/ DO_{600nm})

Ti/0 = taux d'induction par rapport à la condition sans antibiotique pour une même souche

Ti/natif = taux d'induction de la souche mutante par rapport à la souche native pour une même concentration en antibiotique

Les zones en jaune clair correspondent à des conditions où les toxines stx sont détectées (DO_{450/650nm} >0,1)

Tableau R.20 : Expression de la toxine par HSVR 149 et le mutant HSVR 149 EN4 A en condition basale ou induite par l'enrofloxacine

Souche	EN µg/ml	B	E	Ratio E/B*10	Moyennes					CV Ratios E/B
		DO _{600nm}	DO _{450/650nm}		DO _{600nm}	DO _{450/650nm}	Ratio	Ti/0	Ti/natif	
HSVR 149 (CMI= 0,125 µg/ml)	0	2,46	0,947	3,85	2,5	0,9	3,7			5%
		2,38	0,903	3,79						
		2,71	0,957	3,53						
		2,82	1,102	3,91						
		2,86	1,082	3,78						
HSVR 149 EN4 A (CMI= 1 µg/ml)	0	2,44	1,074	4,40	2,7	1,1	4,0		1,1	8%
		0,44	3,487	79						
		0,35	3,711	106						
		0,44	3,674	84						
		2,44	2,29	9						
HSVR 149	0,125	2,71	2,721	10	2,5	2,6	10,4	2,6	0,1	12%
		2,42	2,871	12						
		0,079	3,003	380						
		0,23	3,178	138						
		0,26	3,376	130						
HSVR 149 EN4 A	0,125	2,5	3,35	13	2,3	3,3	14,4	3,6	0,1	7%
		2,14	3,295	15						
		2,32	3,321	14						
		0,081	2,036	251						
		0,071	2,065	291						
HSVR 149	0,25	0,086	1,886	219	0,2	3,2	216,0	58,0		66%
		1,46	3,92	27						
		1,63	4	25						
		1,39	3,823	28						
		0,045	0,657	146						
HSVR 149 EN4 A	0,25	0,042	0,659	157	0,1	2,0	253,8	68,1		14%
		0,045	0,526	117						
		0,16	3,857	241						
		0,23	3,743	163						
		0,22	3,55	161						
HSVR 149	0,75	0,041	0,109	27	1,5	3,9	26,3	6,5	0,1	6%
		0,037	0,205	55						
		0,036	0,167	46						
		0,07	3,296	471						
		0,065	3,406	524						
HSVR 149 EN4 A	0,75	0,069	3,581	519	0,04	0,6	139,9	37,6		15%
		0,042	0,659	157						
		0,045	0,526	117						
		0,16	3,857	241						
		0,23	3,743	163						
HSVR 149	1,5	0,22	3,55	161	0,2	3,7	188,4	46,7	1,3	24%
		0,041	0,109	27						
		0,037	0,205	55						
		0,036	0,167	46						
		0,07	3,296	471						
HSVR 149 EN4 A	1,5	0,065	3,406	524	0,04	0,2	42,8	11,5		34%
		0,069	3,581	519						
		0,021	0,045	/						
		0,019	0,06	/						
		0,019	0,064	/						
HSVR 149	3	0,025	2,685	1074	0,04	0,2	42,8	11,5		34%
		0,023	2,4	1043						
		0,034	2,788	820						
		0,021	0,045	/						
		0,019	0,06	/						
HSVR 149 EN4 A	3	0,025	2,685	1074	0,1	3,4	504,6	125,2	11,8	6%
		0,023	2,4	1043						
		0,034	2,788	820						
		0,021	0,045	/						
		0,019	0,06	/						
HSVR 149	10	0,025	2,685	1074	0,02	0,06				
		0,023	2,4	1043						
		0,034	2,788	820						
		0,021	0,045	/						
		0,019	0,06	/						
HSVR 149 EN4 A	10	0,025	2,685	1074	0,03	2,6	979,2	242,9		14%
		0,023	2,4	1043						
		0,034	2,788	820						
		0,021	0,045	/						
		0,019	0,06	/						
HSVR 149	100	0,021	0,045	/	0,01	0,02				
		0,019	0,06	/						
		0,019	0,064	/						
		0,025	2,685	1074						
		0,023	2,4	1043						
HSVR 149 EN4 A	100	0,023	2,4	1043	0,02	0,1		6,6		
		0,034	2,788	820						
		0,021	0,045	/						
		0,019	0,06	/						
		0,019	0,064	/						

EN = enrofloxacine

CV = coefficient de variation (écart type/ moyenne des ratios)

Ti = taux d'induction (rapport de 2 ratios DO_{450/650nm}/ DO_{600nm})

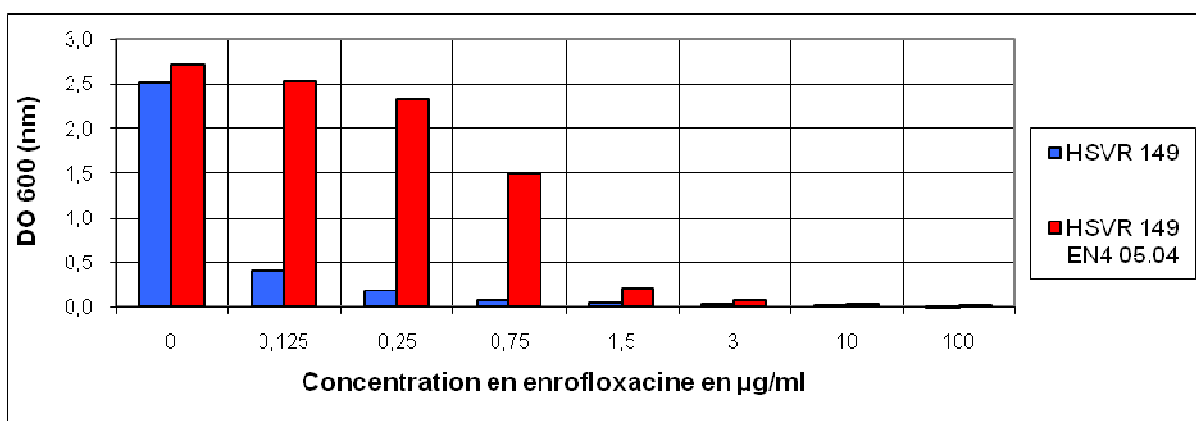
Ti/0 = taux d'induction par rapport à la condition sans antibiotique pour une même souche

Ti/natif = taux d'induction de la souche mutante par rapport à la souche native pour une même concentration en antibiotique

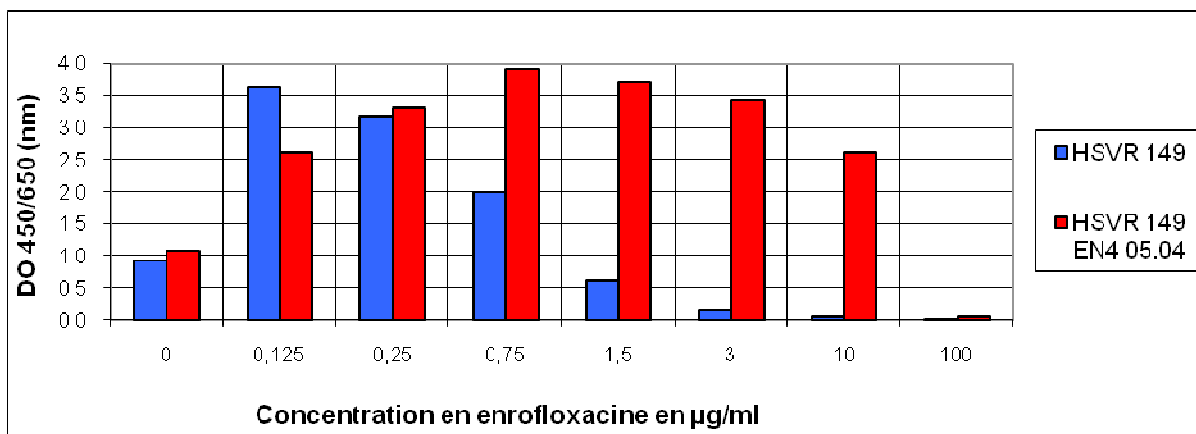
Les zones en jaune clair correspondent à des conditions où les toxines stx sont détectées ($DO_{450/650nm} > 0,1$)

Fig. R.24 : HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou en absence d'enrofloxacin

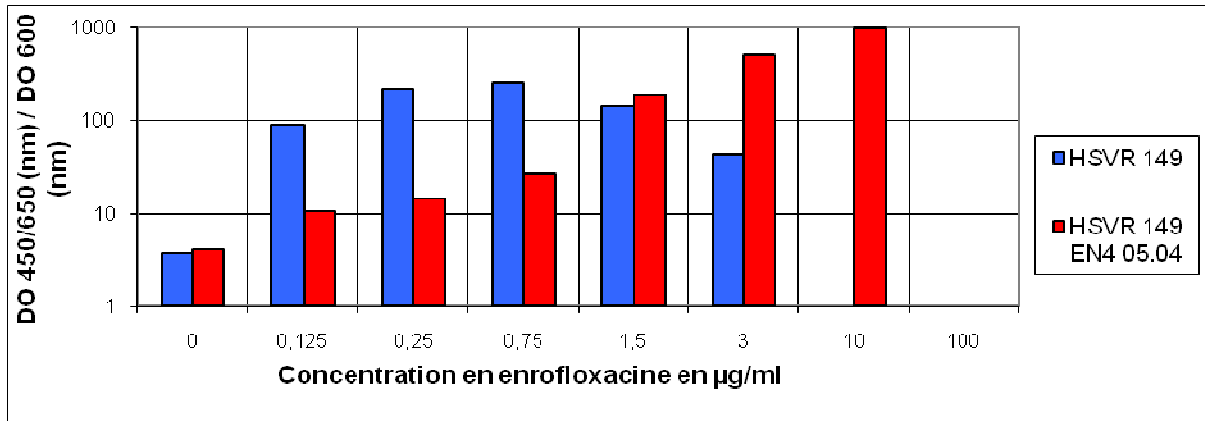
A. DO_{600nm} de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou absence d'enrofloxacin



B. $DO_{450/650nm}$ de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A avec ou sans enrofloxacin



C. $DO_{450/650nm} / DO_{600nm}$ de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A avec ou sans enrofloxacin



Comme attendu, la souche mutante survit mieux à des concentrations plus élevées en enrofloxacin que la souche native et les 3 souches mutantes ayant des CMI plus faibles. Dès 0,125 µg/ml d'enrofloxacin, la concentration bactérienne de HSVR 149 chute dramatiquement. Pour la souche mutante HSVR 149 EN4 A, cet effet s'observe à partir de 1,5 µg/ml. Ceci est cohérent avec la mesure de CMI réalisée pour ces souches : Les CMI pour l'enrofloxacin de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A sont respectivement de 0,125 et 1 µg/ml. De plus, le niveau de production des toxines mesuré par ELISA est également plus élevé, pour les 2 souches, aux concentrations proches des CMI et diminuent au-delà de ces concentrations. Les niveaux de production de la toxine sont décalés pour les deux souches, la souche mutante continuant de produire de grandes quantités de toxines ($DO_{450/650nm} > 2,5$) jusqu'à 10 µg/ml d'enrofloxacin. Les ratios $DO_{450/650nm} / DO_{600nm}$ sont d'abord plus élevés pour la souche native (d'un facteur X10 jusqu'à une concentration en enrofloxacin de 1,5 µg/ml) puis le ratio de la souche native diminue et celui du mutant augmente, la tendance s'inverse.

En condition basale, sans antibiotique, il n'y a pas de différence entre les 2 souches ($ti/natif = 1,1$) puis jusqu'à 0,75 µg/ml d'enrofloxacin, la souche native est 10 fois plus induite que la souche mutante ($ti/natif = 0,1$) puis la tendance s'inverse avec un

taux d'induction de la souche mutante 10 fois plus fort que pour la souche native ($t_i/natif = 11,8$).

Si l'on compare cette fois les différentes conditions d'induction en présence d'enrofloxacin avec la condition basale, on constate que la souche mutante est beaucoup plus fortement inductible que la souche native ($T_i/0$ de 11,5 à 68,1 pour HSVR 149 et de 2,6 à 242,9 pour HSVR 149 EN4 A). Avant la CMI de la souche mutante, le taux d'induction est inférieur à 10 puis il augmente fortement à partir de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ alors que la CMI est dépassée.

3.2.3. Etude de l'expression des toxines après induction par l'acide nalidixique

Les 2 souches HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A ont également été testées en présence d'acide nalidixique. Les résultats obtenus sont présentés tableau R.21 et fig. R.25

Comme attendu, la souche mutante survit mieux à des concentrations plus élevées en acide nalidixique que la souche native. A partir de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'acide nalidixique, la concentration bactérienne de HSVR 149 chute nettement. Pour la souche mutante HSVR 149 EN4 A, cet effet s'observe à 1000 $\mu\text{g/ml}$. Ceci est cohérent avec la mesure de CMI réalisées pour ces souches : Les CMI pour l'acide nalidixique de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A sont respectivement de 3 et supérieur à 256 $\mu\text{g/ml}$. De plus, pour les 2 souches, le niveau de production des toxines mesuré par ELISA est également plus élevé aux concentrations proches des CMI et diminue au-delà de ces concentrations. Les courbes sont décalées pour les deux souches : HSVR 149 EN4 A continuant de produire des quantités détectables de toxines jusqu'à 1000 $\mu\text{g/ml}$ d'acide nalidixique ($DO_{450/650\text{nm}} = 1,2$).

Tableau R.21 : Expression de la toxine par HSVR 149 et le mutant HSVR 149 EN4 A en condition basale et en présence d'acide nalidixique

Souche	NA µg/ml	B	E	Ratio E/B*10	Moyennes					CV Ratios E/B
		DO _{600nm}	DO _{450/650nm}		DO _{600nm}	DO _{450/650nm}	Ratio	Ti/0	Ti/natif	
HSVR 149 (CMI= 3 µg/ml)	0	2,46	0,947	4	2,5	0,9	3,7	1,0		0%
		2,38	0,903	4						
		2,71	0,957	4						
149 EN4 A (CMI=>256 µg/ml)	0	2,82	1,102	4	2,7	1,1	4,0	1,0	1,1	0%
		2,86	1,082	4						
		2,44	1,074	4						
HSVR 149	0,1	2,9	1,064	4	3,0	1,1	3,8	1,0		0%
		2,72	1,073	4						
		3,23	1,189	4						
149 EN4 A	0,1	3,17	1,233	4	2,9	1,3	4,6	1,1	1,2	12%
		2,74	1,274	5						
		2,69	1,382	5						
HSVR 149	1	2,75	1,981	7	2,9	2,2	7,7	2,1		27%
		2,58	2,546	10						
		3,26	1,993	6						
149 EN4 A	1	3,25	1,204	4	2,9	1,3	4,7	1,2	0,6	25%
		2,88	1,207	4						
		2,43	1,491	6						
HSVR 149	10	0,42	1,164	28	0,4	1,3	30,5	8,2		8%
		0,4	1,224	31						
		0,45	1,491	33						
149 EN4 A	10	2,82	1,565	6	3,2	1,4	4,5	1,1	0,1	25%
		3,55	1,45	4						
		3,17	1,267	4						
HSVR 149	100	0,04	0,167	42	0,04	0,2	45,8	12,3		29%
		0,039	0,135	35						
		0,044	0,269	61						
149 EN4 A	100	2,78	3,091	11	2,7	3,2	11,7	2,9	0,3	5%
		2,65	3,277	12						
		2,71	3,155	12						
HSVR 149	1000	0,01	0,025		0,01	0,03				
		0,011	0,032							
		0,015	0,046							
149 EN4 A	1000	0,39	1,195	31	0,4	1,2	33,3	8,3		8%
		0,33	1,204	36						
		0,39	1,282	33						

NA = acide nalidixique

Ti = taux d'induction (rapport de 2 ratios DO_{600nm}/DO_{450/650nm})

Ti/0 = taux d'induction par rapport à la condition sans antibiotique pour une même souche

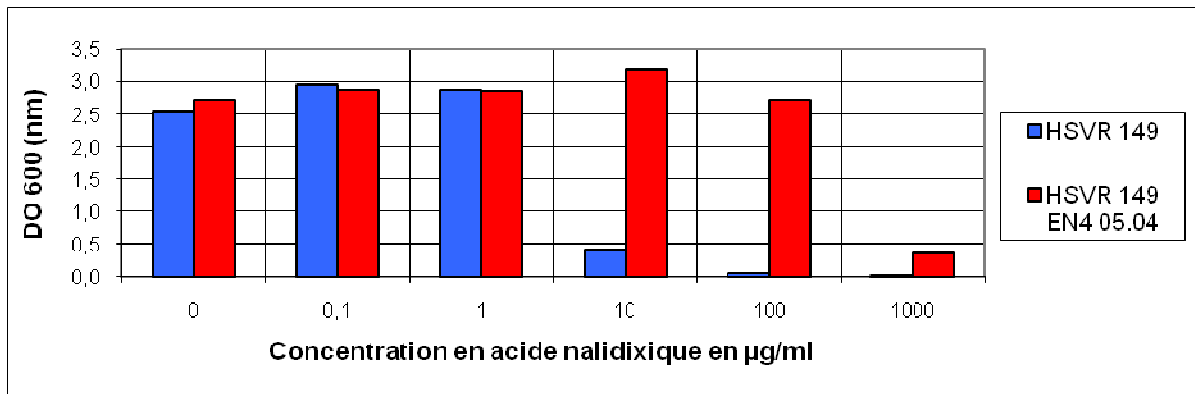
Ti/natif = taux d'induction de la souche mutante par rapport à la souche native pour une même concentration en antibiotique

CV = coefficient de variation (écart type/ moyenne des ratios) Les zones en jaune clair correspondent à des conditions où les toxines stx sont détectées (DO_{450/650nm} >0,1)

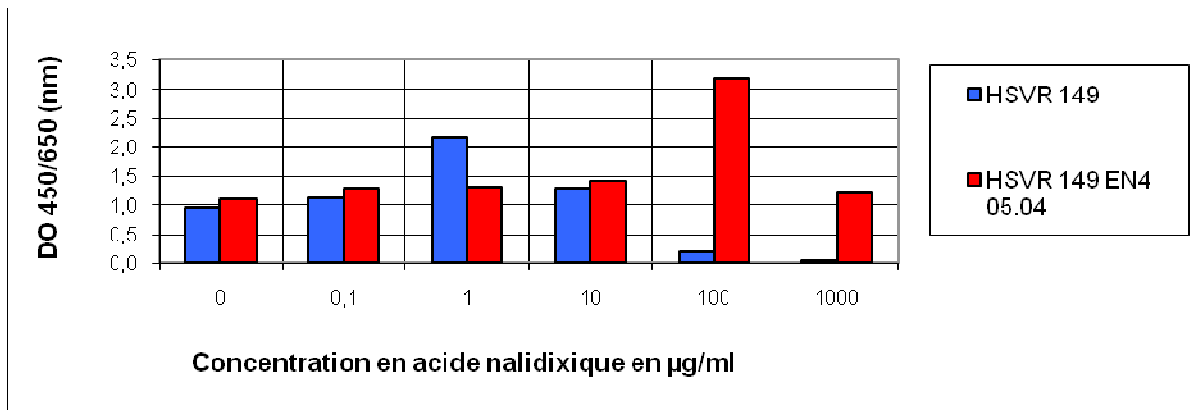
Les ratios $DO_{450/650nm} / DO_{600nm}$ en absence d'acide nalidixique et à très faible quantité (0,1 µg/ml) sont équivalents pour les deux souches puis de 1 à 10 µg/ml, ils sont plus élevés pour la souche native. Enfin à 1000 µg/ml, seule la souche mutante produit encore des quantités détectables de toxine.

Fig. R.25 : HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou en absence d'acide nalidixique

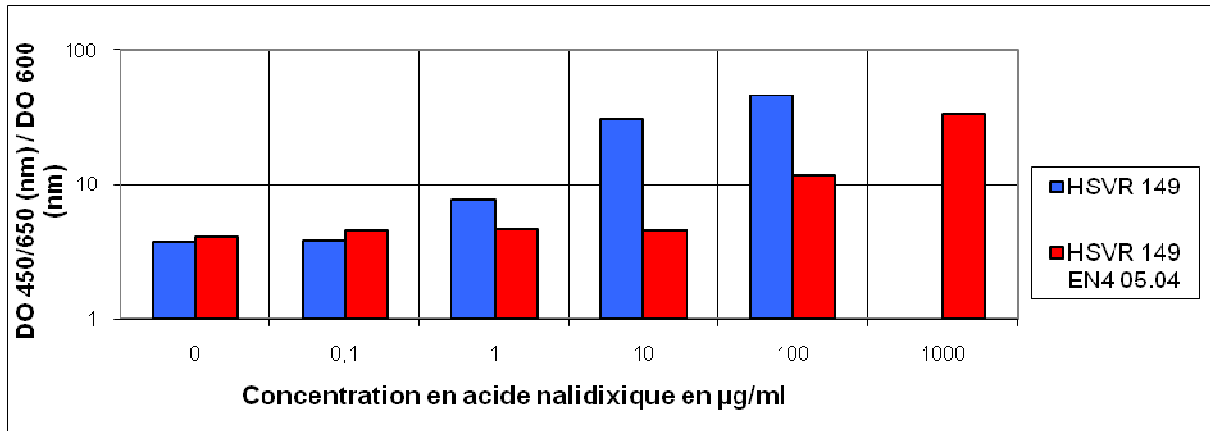
A. DO_{600nm} de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou en absence d'acide nalidixique



B. $DO_{450/650nm}$ de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou en absence d'acide nalidixique



C. $DO_{450/650nm} / DO_{600nm}$ de HSVR 149 et HSVR 149 EN4 A en présence ou en absence d'acide nalidixique



Au niveau des taux d'induction, on observe également l'effet de levier obtenu avec l'enrofloxacin, alors qu'à 100 $\mu\text{g/ml}$ la production de toxines n'est plus détectée pour la souche native, la souche mutante continue de produire de la toxine. Par ailleurs, l'écart entre le niveau d'inductibilité de la souche native par rapport à la souche mutante observé avec l'enrofloxacin n'est pas constaté avec l'acide nalidixique ($Ti/0$ de 1 à 45,8 pour HSVR 149 et de 1,1 à 33,3 pour HSVR 149 EN4 A).

4. Publication n°1

Characterization of inducible *stx2*-positive *Escherichia coli* O157:H7/H- strains isolated from cattle in France

C. Maurer, C. Lazizzera and j. Y. Madec

Titre :

Caractérisation de souches bovines d'*Escherichia coli* O157:H7/H- *stx2*-positives inductibles isolées en France

Résumé :

Le but de cette étude était de quantifier, à l'aide du test commercial ELISA ProSpecT Shiga toxin (Oxoid), la variabilité de la production de toxine Stx2 chez un panel de souches d'*E. coli* O157:H7/H- *stx2*+ d'origine bovine, et cultivées en présence ou en absence d'enrofloxacin, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones utilisé en médecine vétérinaire. Alors que seulement 15,2% des souches d'*E. coli* O157:H7/H- étudiées produisent des quantités significatives de Stx2 détectables sans induction, la majorité de ces isolats exprime cette protéine en présence de concentrations subinhibitrices en enrofloxacin. Cette étude montre qu'une grande proportion des isolats *E. coli* O157:H7/H- *stx2*+ issus de bovins, mais n'exprimant pas la protéine Stx2 de manière constitutive, est inductible en présence de concentrations inductrices d'enrofloxacin. Cette étude illustre le risque que des STEC issus de bovins puissent devenir plus fréquemment pathogènes pour l'homme suite à l'usage en augmentation de fluoroquinolones vétérinaires pour le traitement par voie orale des animaux de rente tels que les bovins.

Mots clés :

Enrofloxacin, *Escherichia coli*, fluoroquinolones, O157:H7, shiga toxines, STEC

ORIGINAL ARTICLE

Characterization of inducible *stx2*-positive *Escherichia coli* O157:H7/H7- strains isolated from cattle in France

C. Maurer, C. Lazizzera and J.-Y. Madec

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité Bactériologie Bovine et Hygiène des Viandes, Lyon, France

Keywordsenrofloxacin, *Escherichia coli*, fluoroquinolones, O157:H7, Shiga toxin, STEC.**Correspondence**

Jean-Yves Madec, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité Bactériologie Bovine et Hygiène des Viandes, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon, France. E-mail: j.y.madec@lyon.afssa.fr

2007/1130: received 16 July 2007, revised 17 September 2007 and accepted 1 November 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03692.x

Abstract**Aims:** To quantify the variability of the Shiga toxin 2 (Stx2) production by a panel of *stx2*-positive *Escherichia coli* O157:H7/H7- isolates from healthy cattle before and after induction with enrofloxacin.**Methods and Results:** ProSpecT[®] ELISA was used to quantify the Stx2 production by *stx2*-positive *E. coli* O157:H7/H7- isolates in native conditions (basal level) or after induction with enrofloxacin. Whereas only 15.2% of the *E. coli* O157:H7/H7- strains studied displayed significant amounts of detectable Stx2 without induction, most of them were shown to be inducible, and at various levels, in presence of subinhibitory concentrations of enrofloxacin.**Conclusions:** We demonstrated the capability of a highly elevated proportion of *stx2*-positive, but constitutively Stx2-negative, *E. coli* O157:H7/H7- isolates from healthy cattle to produce significant levels of Shiga toxin Stx2 in presence of subtherapeutic concentrations of enrofloxacin, an antibiotic of the fluoroquinolones family only licensed for veterinary use.**Significance and Impact of the Study:** This study documents the risk that bovine-associated Shiga toxin producing *E. coli* isolates may become more frequently pathogenic to humans as a side-effect of the increasing use of veterinary fluoroquinolones in the oral treatment of food animals like cattle or poultry.**Introduction**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are a group of food-borne pathogens that can infect humans and cause a range of illnesses including hemorrhagic colitis and life-threatening sequelae such as haemolytic-uremic syndrome (HUS) (Su and Brandt 1995). Among STEC, some serogroups like O157, O26, O103, O111 or O145 are usually found in human infections, with the serotype O157:H7 being one of the most frequently encountered. *Escherichia coli* O157:H7 occurs also in the faecal flora of healthy domestic animals and is most frequently found in ruminants, which are considered as one of the natural sources of human infections (Kobayashi *et al.* 2001). Although the faecal shedding of *E. coli* O157:H7 by cattle, at least at detectable levels, is considered to be a relatively transient event (Besser *et al.* 1997; Widiasih *et al.* 2004), *E. coli* O157:H7 can survive over

long periods of time in the close environment of cattle like slurries and pasture lands (Hancock *et al.* 1994).

Shiga toxins (Stx) are a group of cytopathic toxins that were first identified in *Shigella dysenteriae*. They are essential virulence factors of STEC, eliciting many of the pathological features associated with STEC infections. STEC produce two types of Stx proteins: Stx1 and Stx2, which share the basic AB₅ structure and toxin activity but are antigenically distinct (Nataro and Kaper 1998). Contrary to Stx1, the amino acids sequences so far reported for Stx2 demonstrated the existence of numerous variants. The *stx* genes carried by STEC strains are usually encoded on phage genomes integrated into the bacterial chromosome (O'Brien *et al.* 1984; Huang *et al.* 1987; Unkmeir and Schmidt 2000; Wagner *et al.* 2001).

Despite cattle is considered an important reservoir of STEC, it is admitted that not all STEC occurring in cattle would be at risk for humans. Indeed, a key question relies

on the definition of predictable criteria for cattle strains to be pathogenic for humans. Several well-known virulence factors, including the *stx2* gene, are usually found in *E. coli* O157:H7 strains associated with epidemics so that their detection in *E. coli* O157:H7 isolates often allows to speculate on their pathogenicity to humans. However, not all *stx2*-positive *E. coli* O157:H7 isolates produce Stx2, whose synthesis is co-regulated through induction of the phage that encodes the toxin gene. To this respect, fluoroquinolones, which are known to induce the bacterial SOS response, were shown to generally promote Stx2 production.

In a previous work, a panel of 43 *E. coli* O157:H7/H7- strains isolated in France from healthy cattle was investigated for the presence of the major known virulence factors, all but two displaying the *stx2* gene and all of them the *eae* gene (Andral et al. 2004). In this paper, we evaluated to what extent these *E. coli* O157:H7/H7- strains plus three additional *stx2*-positive *E. coli* O157:H7 strains also isolated from healthy cattle might have produced Stx2 toxin if they had transmitted to humans. Indeed, we used ELISA to quantify the basal Stx2 production of all 46 isolates. We also used ELISA to evaluate how sub-inhibitory concentrations of enrofloxacin, an antibiotic of the fluoroquinolones family only licensed for veterinary use, may modulate this Stx2 production rate, including by *E. coli* O157:H7/H7- strains that do not produce Stx2 at a basal level.

Materials and methods

Bacterial strains

Forty-six *E. coli* O157:H7/H7- cattle-associated strains were used in this study, 43 of which were characterized in a previous work (Andral et al. 2004), and among these latter, 41 were positive for the *stx2* gene and two were negative (HSVR 100 and HSVR 138). Later on (September 2002) and in a different French district, the three additional strains (HSVR 148, 149 and 150) were isolated from faecal samples after immunoccentration (VIDAS-ICE; BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and plating onto sorbitol MacConkey's agar (Oxoid, Dardilly, France) and O157:H7 ID (BioMérieux) chromogen agar. Representative colonies were confirmed as *E. coli* by the API20E system (BioMérieux), then identified as O157 with the agglutination test (Oxoid) and H7 agglutination test (Pro-Lab, Neston, Wirral, UK). *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 (*stx1*-, *stx2*-), ATCC 43895 (EDL933) (*stx1*+, *stx2*+) and ATCC 43889 (*stx1*-, *stx2*+) were used as controls. In all strains, the presence of the gene coding for each Stx type was tested (or confirmed) by PCR using specific primers for the *stx1* and *stx2* genes, as described previously (Andral et al. 2004).

Growth curves and effect of enrofloxacin on growth

Growth of the *E. coli* strains in brain-heart infusion (BHI) broth and trypticase soja broth (TSB) were first compared and only BHI broth was kept further. Then, 10^7 CFU were mixed with serial dilutions of enrofloxacin (0.1, 0.25, 0.5 and $1 \mu\text{g ml}^{-1}$) in BHI broth. Bacterial growth was determined by turbidity from 0 to 24 h post-inoculation and subinhibitory concentration value was defined as the concentration below the one that inhibits all growth (this concentration may have already reduced the growth rate).

Determination of enrofloxacin MIC

The minimum inhibitory concentration (MIC) against all strains including controls was determined for enrofloxacin using the Etest[®] (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) on Mueller-Hinton agar plates according to the manufacturer instructions. In brief, after the inoculum was swabbed evenly across the entire plate surface and the strips were laid onto each plate, plates were incubated at 37°C for 18 h. Following incubation, the point at which the zone of growth inhibition intersected the strip was read as the MIC of enrofloxacin in $\mu\text{g ml}^{-1}$ and interpreted according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology. Strains *Staphylococcus aureus* CIP 7625 (ATCC 29213) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) were used as control for MIC determination.

Detection of Stx using ProSpect[®] Stx ELISA

Purified toxin Stx2 and bacterial Stx were detected by ELISA using the ProSpect[®] Stx ELISA kit (Oxoid). Briefly, bacteria suspensions and purified toxin were diluted one to third with the provided diluent according to the manufacturer instructions. The entire protocol was then followed until bichromatical measurement of the absorbance values at 450/650 nm with a Thermomax[®] microplate reader. For each strain (and toxin), each sample was run in duplicate three times. To better compare the specific Stx production by the cells of each strain, results were expressed by dividing the ELISA absorbance OD_{450/650} values by the OD₆₀₀ of the bacterial suspension.

Induction experiments

E. coli strains were cultured overnight at 37°C on Columbia blood agar plates (BioMérieux). One colony was resuspended into 2 ml BHI broth and incubated for 3 h at 37°C with rotary shaking at 180 rpm. OD₆₀₀ was

measured with an Ultrospec[®] 1100 pro spectrophotometer. Samples were then diluted to reach OD₆₀₀ values corresponding to 10⁷ CFU ml⁻¹ in BHI broth with enrofloxacin at 0.25 µg ml⁻¹ (BioChemika-Fluka, Buchs, Switzerland). Samples were then grown for 4 h at 37°C with rotary shaking at 180 rpm. Cultivation without enrofloxacin was used as a control condition. Absorbance values for each sample were measured at 600 nm and samples were then further analysed by ELISA.

Results

Characterization of the 46 *E. coli* O157:H7/H7- strains

All 46 *E. coli* O157:H7/H7- field isolates were collected from cattle at abattoir. Most of them (43/46) had been characterized for their serotype and virulence factors in a previous study (Andral et al. 2004). The others (3/46) were determined as *E. coli* O157:H7 in this study. Using PCR, all strains but two (HSVR 100 and HSVR 138) were confirmed to still contain amplifiable *stx2* sequences and none of them carried the *stx1* gene (not shown).

Growth curves of *E. coli* O157:H7 strains in the absence or presence of enrofloxacin

MICs of enrofloxacin were determined for all *E. coli* O157:H7/H7- strains and all of them were found as sensitive. In the absence of enrofloxacin, growth curves of four *E. coli* O157:H7 strains (HSVR 82, HSVR 91, HSVR 99, HSVR 149) were determined using two different culture media, i.e. BHI and TSB media and did not differ among the four strains using a given medium (not shown). For a given strain, differences in the composition of the medium resulted in substantial variations in the growth curve with the exponential phase obtained the earliest with the BHI medium (3–4 h after inoculation). Only BHI medium was then used further.

Then, growth curves were determined for two *E. coli* O157:H7 strains (HSVR 99, HSVR 149) in BHI supplemented with 0, 0.1, 0.25 and 0.5 µg ml⁻¹ of enrofloxacin and showed 0.25 µg ml⁻¹ of enrofloxacin to correspond to subinhibitory growth conditions for both strains (not shown), with a lower growth rate already observed at this concentration.

Production of Stx2 by strains HSVR 99, HSVR 121, HSVR 149 and ATCC 43889 in the presence or absence of enrofloxacin

The amount of Stx2 produced by the strains HSVR 99, HSVR 121, HSVR 149, and ATCC 43889 (control) was quantified using ELISA. In absence of enrofloxacin, serial

dilutions of purified Stx2 toxin (Fig. 1a) were tested in parallel with serial bacteria concentrations (Fig. 1b), indicating an average amount of 250–700 pg of Stx2 toxin constitutively produced by these strains when grown at 10⁷ CFU ml⁻¹.

Then, HSVR 149 cells were allowed to grow from 0 to 24 h with 0.25 µg ml⁻¹ of enrofloxacin or without enrofloxacin and Stx2 production was quantified using ProSpect[®] Stx ELISA at each time point. As shown in Fig. 2a, the global Stx2 production significantly increased about 25 h after inoculation in both conditions (induced and noninduced) and displayed apparent comparable levels. However, when normalising the data by dividing the absolute OD_{450/650} values by the OD₆₀₀ values of the bacterial suspension (Fig. 2b), a specific increase of Stx2 production per HSVR 149 individual cell was clearly demonstrated after induction by enrofloxacin, several 100-fold higher than without enrofloxacin.

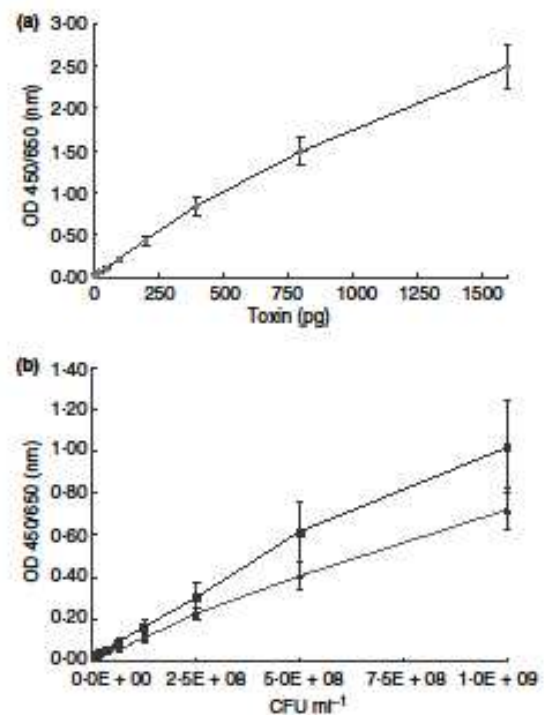


Figure 1 Optical densities (ProSpect[®] Shiga toxin ELISA) obtained for serial dilutions of purified toxin Stx2 (pg) (a) or corresponding to Stx2 protein produced by various bacteria concentrations of strains HSVR 99 (triangle) and ATCC 43889 (square) (b). Results obtained with strains HSVR 121 and HSVR 149 were identical to those obtained with strains HSVR 99 and ATCC 43889, respectively, and were not reported in Fig. 1b, for clarity reasons.

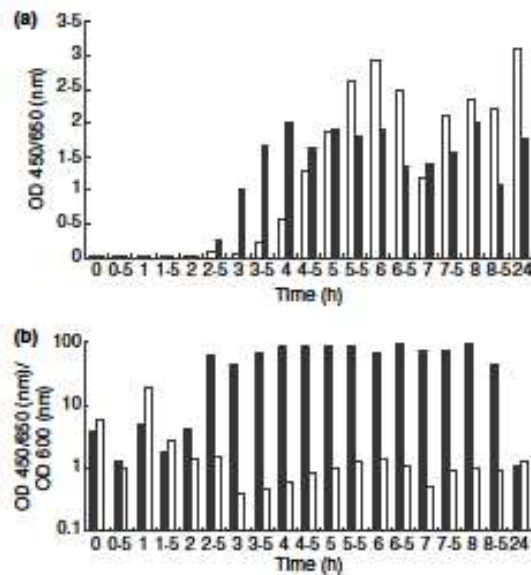


Figure 2 Level of Stx2 production by H5VR 149 cells over time with (black) or without (white) induction by enrofloxacin. Results were expressed either as absolute OD_{450/650} values obtained using ProSpec[®] Shiga toxin ELISA (a) or as normalised values after dividing by the OD₆₀₀ of the culture (b).

Quantification of the expression of Stx2 by the 46 *E. coli* O157:H7/H7- strains in the absence of enrofloxacin

ELISA was used to quantify the basal levels of Stx2 production of the 46 *E. coli* O157:H7/H7- strains in parallel

with control strains. As shown in Fig. 3, after normalising the data as detailed above, Stx2 concentrations in cultures differed markedly among the 46 cattle-associated isolates. A subgroup of seven isolates (HSVR 4, 11, 12, 13, 99, 121, 149), with two *stx2+* control strains that were associated with human infections [ATCC 43895 (EDL 933), ATCC 43889], was clearly tested as ELISA-positive according to the manufacturer instructions for the interpretation of the test. Another 12 isolates subgroup (HSVR 117, 118, 119, 124, 126, 134, 135, 137, 138, 139, 140, 150) displayed OD_{450/650} values barely above the cut-off. The remaining isolates were repeatedly tested as negative. As expected, Stx2 protein was not detected by ELISA in the *stx2* and *stx1*-negative *E. coli* ATCC 43888 strain.

None of the 46 field strains harboured the *stx1* gene, contrary to EDL 933 control strain, which harboured both *stx1* and *stx2* genes. When compared with the strain ATCC 43889 and strain EDL 933 (ATCC 43895), the higher Stx2 concentration was detectable in culture of the control strain expressing both *stx2* and *stx1* genes.

Quantification of Stx2 protein produced by the 46 *E. coli* O157:H7/H7- strains after induction with 0.25 µg ml⁻¹ of enrofloxacin

ELISA was now used to quantify Stx2 production by the same panel of 46 *E. coli* O157:H7/H7- strains after a 4-h culture in presence of 0.25 µg ml⁻¹ of enrofloxacin. As shown in Fig. 3, all seven field isolates of the first subgroup, in addition to the two *stx2+* control strains, were tested as ELISA-positive and displayed even higher amounts of Stx2 using the ProSpec[®] Stx ELISA test. Interestingly, all but one (HSVR 126) of the isolates of

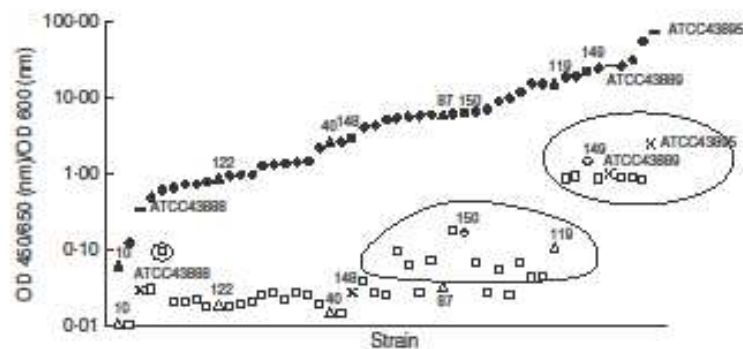


Figure 3 Levels of Stx2 production by the 46 *E. coli* O157:H7/H7- strains in parallel with controls, without (in white) or after induction by enrofloxacin (in black). To quantify the specific increase of Stx2 production per cell between both conditions, results were expressed by dividing the absolute OD_{450/650} values by the OD₆₀₀ values of the bacterial suspension. Control strains, the three additional strains isolated in this study (HSVR 148, 149 and 150) and the first two sub-groups of strains (see Results section) were made distinct in the figure. Strains were represented in an ascending order of Stx2 production in induced conditions. For better clarity, not all the strains were labelled on the figure, but they were classified in the same order in Fig. 3 and Table 1.

the second subgroup expressing small basal levels of Stx2 were also shown to display high levels of Stx2 after induction. The third subgroup of isolates that did not express basal levels of Stx2 now expressed similar Stx2 levels than the first subgroup of seven isolates when not induced. All together, only a limited number of isolates were not or barely inducible by enrofloxacin (HSVR 10 and HSVR 116). Again, no Stx1 or Stx2 protein were detected by ELISA for the *stx1* and *stx2*-negative ATCC 43888 strain. It is noteworthy that the 2 *stx2*-negative strains (HSVR 100 and HSVR 138) were also shown to produce Stx2 after induction with enrofloxacin (Fig. 3).

Finally, an induction rate (IR), defined as the ratio between normalized values in induced and noninduced conditions, was calculated for each isolate and represented the difference in Stx production between both conditions (Table 1). The induction rate strongly depended on the strains and was also detailed in relation with the genotype of the strains (Table 1). Although a marked variability was observed between strains, comparable ranges of induction rates were also found out within a definite genotype [see PFGE cluster no. 2 (from IR = 105 to IR = 208) compared with cluster no. 7 (from IR = 7 to IR = 51), for instance].

Discussion

Cattles are recognized as one of the main environmental reservoirs of *E. coli* O157:H7, which is found in their intestinal floras and usually without causing any disease. However, *E. coli* O157:H7 is a significant human pathogen that can be responsible for severe clinical manifestations, including haemolytic-uremic syndrome (HUS). Among the virulence factors contributing to the pathogenicity of *E. coli* O157:H7, Stx, and particularly Stx2, is reported to play an important role. However, whereas the presence of virulence-associated genes is often searched in *E. coli* O157:H7 isolates to document and/or confirm their pathogenicity to humans, the production of the proteins they encode is usually not investigated.

Therefore, we evaluated basal levels of Stx2 production by 46 *E. coli* O157:H7/H7- isolates that were confirmed to possess the *stx2* sequence (exception of strains HSVR 100 and HSVR 138) and were collected from healthy cattle at abattoir in France (Andral et al. 2004). Then, we quantified to what extent subinhibitory concentrations of enrofloxacin, an antibiotic of the fluoroquinolones family only licensed for veterinary use and that may persist in the intestinal tract of cattle after oral treatment with fluoroquinolones, may induce Stx2 production by *E. coli* O157:H7/H7- strains and therefore contribute to enhance the risk for bovine-associated isolates to be virulent to humans.

Table 1 Induction rate of each of the 46 *E. coli* O157:H7/H7- strains and controls in parallel with origin, PFGE type and H7 phenotype, as described previously (Andral et al. 2004)

HSVR/ CP/ATCC number	Induction rate	PFGE clusters	H7	Sample
10	6	8	-	Ear
116	12	5	+	Ear
ATCC 43888	11	/	+	Human faeces
120	16	7	+	Ear
126	7	7	+	Ear
105	31	4	+	Ear
123	34	7	+	Ear
125	33	7	+	Ear
8	44	6	+	Ear
122	47	7	+	Ear
7	50	6	+	Ear
63	49	4	+	Environment
9	48	6	+	Ear
80	51	7	+	Ear
82	49	ND	+	Ear
114	61	4	+	Ear
81	50	7	+	Ear
73	57	4	+	Ear
3	109	6	+	Environment
40	168	9	-	Ear
100	179	ND	-	Ear
148	103	ND	+	Faeces
91	105	2	+	Environment
90	156	2	+	Ear
89	191	2	+	Ear
137	56	ND	+	Ear
140	88	ND	+	Ear
84	208	2	+	Ear
138	82	ND	+	Ear
87	179	ND	+	Ear
134	34	ND	+	Ear
150	38	ND	+	Faeces
139	93	ND	+	Ear
86	248	ND	+	Ear
135	161	ND	+	Ear
85	378	ND	+	Ear
118	172	1	+	Ear
117	344	1	+	Ear
124	334	1	+	Ear
119	142	1	+	Ear
121	22	5	+	Ear
12	21	3	+	Environment
149	15	ND	+	Faeces
4	28	5	+	Ear
ATCC 43889	26	/	+	Patient stool
11	29	3	+	Environment
13	34	3	+	Environment
99	64	5	+	Environment
ATCC 43895	28	/	+	Raw hamburger

The question of reliable immunological methods to detect Stx proteins by clinical strains is often raised. Besides a commonly used reversed passive latex agglutination

test (RPLA), few ELISAs are commercially available and the ProSpecT[®] Stx ELISA kit was used in this study to test and quantify the production of Stx2 by 46 nonclinical *E. coli* O157:H7/H7- isolated from cattle. Stx2 was produced within less than 4-h culture and these data agree with other results described previously (Yoh et al. 1999). Only seven out of 46 cattle isolates of *E. coli* O157:H7/H7- were found to express significant constitutive levels of Stx2, indicating that presence of the *stx2* gene in *E. coli* O157:H7 isolates does not constitute a sufficient predictive value of pathogenicity for humans. Several factors may account for the absence or reduced production of Stx2, including alterations in the *stx2* gene or its promoter (Koitaishi et al. 2006). However, whereas several studies investigated the response of human or pig-associated STEC isolates to environmental stimuli like mitomycin C (Muniesa et al. 2004; Koitaishi et al. 2006), iron, antibiotics (Matsushiro et al. 1999; Uemura et al. 2004), only little is reported on how the production of virulence factors may be regulated in cattle-associated STEC isolates (Kohler et al. 2000).

At first, when effective, enrofloxacin systematically promoted the Stx2 production. This is consistent with most of the literature indicating a rather stimulating effect of quinolones on human strains (Waltenspiel et al. 1992; Matsushiro et al. 1999; Yoh et al. 1999), with the exception of opposite effects in rare examples (one strain in each case: one O139 strain from pig, (Uemura et al. 2004) and one human O157:H7 strain (Grif et al. 1998)). These data extend to veterinary fluoroquinolones previous observations using human fluoroquinolones (ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin) (Matsushiro et al. 1999; Yoh et al. 1999; Kimmitt et al. 2000; Zhang et al. 2000). These results are in accordance with the common mechanism of action of quinolones that are known to provoke the bacterial SOS response to DNA damage and/or to the inhibition of DNA replication, i.e. Stx prophages induction. Our data are also to be considered in a context of increasing use of these molecules in veterinary clinical practice that may contribute to enhance intra-intestinal spread of *stx2*-carrying prophages from one strain to another, as suggested in mice experimentally treated with fluoroquinolones (Zhang et al. 2000), and especially those phages with higher constitutive levels of Stx2 thereby possibly increasing the prevalence of highly virulent strains. However, these *in vitro* data need now to be compared with further investigations in ruminants to accurately determine which factors would facilitate phage transduction *in vivo*, like the doses of quinolones for instance, as suggested by others (Cornick et al. 2006). Indeed, these results also reinforce the necessity of a prudent use of fluoroquinolones to treat diarrheal patients infected with enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) (Waltenspiel et al. 1992).

In addition, in this study, the proportion of inducible *E. coli* O157:H7/H7- strains was huge (44/46), in accordance to previous data showing that inducible *stx2* phages are common among STEC of animal origin, and particularly from cattle (Muniesa et al. 2004). Data available on inducibility of bovine-associated isolates are still limited and rather show a substantial variability in the proportion of inducible isolates. However, none of these studies used quinolones but mitomycin C (Ritchie et al. 2003), low iron concentrations (Muniesa et al. 2004) or growth promoters (Kohler et al. 2000). Moreover, in these studies, a large number of isolates were neither of the O157:H7 serotype nor of the O157 serogroup, what may be also contribute to explain differences in response to induction.

In this paper, we showed that the basal level of Stx2 production was not predictable of the level that may potentially be reached after induction although a certain similarity in levels of Stx2 production was observed among genetically related strains. Indeed, all but two strains analysed were clearly inducible whereas only 40% of them produced Stx2 constitutively without induction. Moreover, significant induction rates were measured for isolates with undetectable basal levels of Stx2 production. When only considering the strains for which a basal level of Stx2 is measurable, the Stx2 production after induction with enrofloxacin increased from seven to more than 340 times. This should be compared to the induction rate quantified in cattle strains of O157 and other serogroups using mitomycin C (41-fold median increase) (Ritchie et al. 2003), and also to human strains using other inducers, when taking account of factors influencing toxin expression by host strains, like genotype of the Stx2 prophage or serotype of the *E. coli* isolate (Wagner et al. 1999; Herold et al. 2005). In this paper, all isolates were also *eae* and all but two were H7 positive. This little variability in genotype did not allow to correlate any of these features with variability in Stx2 induction and this should be of interest to further investigate in a different panel of strains. Also, Stx2 was shown to be produced by two *stx2*-negative isolates (HSVR 100 and HSVR 138) that may harbour variant sequences of the *stx2* gene that would not have been detected by the primers used in this work. Again, this underlines how tests based on protein detection and tests based on DNA amplification may be complementary to evaluate the pathogenicity of STEC isolates.

Besides a strain-specific behaviour of *E. coli* O157:H7/H7- isolates to subinhibitory concentrations of quinolones, our data may illustrate the variability in the cascade of regulation of the *stx* genes in *E. coli* O157:H7/H7-. This should let us aware that negative basal levels of Stx2 production using ELISA may be found in inducible and potentially pathogenic strains although

multiple other variables than Stx2 expression are to consider before determining whether a cattle strain may be at risk for a human host (Roe *et al.* 2004). Unfortunately, approaches based on the detection and quantification of the products of the virulence genes are still poorly developed and used. Indeed, risk assessment in this field should gain from large-scale studies on the sensitivity and specificity of ELISA, in particular in view to detect poorly secreting strains, as described for other serogroups of STEC (Zhang *et al.* 2005; Koitabashi *et al.* 2006) or variants characterized as *stx2*-negative.

Acknowledgements

We thank Drs Florence Tardy (Afssa Lyon, France), Patrice Gaurivaud (Afssa Lyon, France) and Patrick Fach (Afssa Maisons-Alfort, France) for all their technical advices and helpful discussions during this work. We also thank Prof. Christine Vernozy-Rozand (Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon) for her support in the preliminary steps of the study. This work was supported by a grant from the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (France).

References

- Andral, B., Aspan, A., Perelle, S. and Fach, P. (2004) PCR detection of virulence genes and molecular epidemiology of STEC O157 isolates from French abattoirs. *Ver Rec* 133, 365–368.
- Besser, T.E., Hancock, D.D., Pritchett, L.C., McRae, E.M., Rice, D.H. and Tarr, P.I. (1997) Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis* 175, 726–729.
- Cornick, N.A., Helgerson, A.F., Mai, V., Ritchie, J.M. and Acheson, D.W. (2006) In vivo transduction of an *Stx*-encoding phage in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 72, 5086–5088.
- Grif, K., Dierich, M.P., Karch, H. and Allerberger, F. (1998) Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17, 761–766.
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Kinsel, M.L., Tarr, P.I., Rice, D.H. and Paros, M.G. (1994) The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect* 113, 199–207.
- Herold, S., Siebert, J., Huber, A. and Schmidt, H. (2005) Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 931–944.
- Huang, A., Friesen, J. and Brunton, J.L. (1987) Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-like toxin 1 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169, 4308–4312.
- Kimmitt, P.T., Harwood, C.R. and Barer, M.R. (2000) Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* 6, 458–465.
- Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. and Yamamoto, K. (2001) Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol* 67, 484–489.
- Kohler, B., Karch, H. and Schmidt, H. (2000) Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology* 146, 1085–1090.
- Koitabashi, T., Vuddhakul, V., Radu, S., Morigaki, T., Asai, N., Nakaguchi, Y. and Nishibuchi, M. (2006) Genetic characterization of *Escherichia coli* O157:H7/- strains carrying the *stx2* gene but not producing Shiga toxin 2. *Microbiol Immunol* 50, 135–148.
- Matsushiro, A., Sato, K., Miyamoto, H., Yamamura, T. and Honda, T. (1999) Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. *J Bacteriol* 181, 2257–2260.
- Muniesa, M., Blanco, J.E., De Simon, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A.R. and Jofre, J. (2004) Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* 150, 2959–71.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142–201.
- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W. and Formal, S.B. (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226, 694–696.
- Ritchie, J.M., Wagner, P.L., Acheson, D.W. and Waldor, M.K. (2003) Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 69, 1059–1066.
- Roe, A.J., Naylor, S.W., Spears, K.J., Yull, H.M., Dransfield, T.A., Oxford, M., McKendrick, I.J., Porter, M. *et al.* (2004) Co-ordinate single-cell expression of LEE4- and LEE5-encoded proteins of *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 54, 337–352.
- Su, C. and Brandt, L.J. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* 123, 698–714.
- Uemura, R., Sueyoshi, M., Taura, Y. and Nagatomo, H. (2004) Effect of antimicrobial agents on the production and release of shiga toxin by enterotoxaemic *Escherichia coli* isolates from pigs. *J Vet Med Sci* 66, 899–903.
- Unkmeir, A. and Schmidt, H. (2000) Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in

- shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect Immun* 68, 4856–4864.
- Wagner, P.L., Acheson, D.W. and Waldor, M.K. (1999) Isogenic lysogens of diverse shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of shiga toxin. *Infect Immun* 67, 6710–6714.
- Wagner, P.L., Neely, M.N., Zhang, X., Acheson, D.W., Waldor, M.K. and Friedman, D.L. (2001) Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol* 183, 2081–2085.
- Walterspiel, J.N., Ashkenazi, S., Morrow, A.L. and Cleary, T.G. (1992) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection* 20, 25–29.
- Widiatih, D.A., Ido, N., Omoe, K., Sugii, S. and Shinagawa, K. (2004) Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* 132, 67–75.
- Yoh, M., Frimpong, E.K., Voravuthikunchai, S.P. and Honda, T. (1999) Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol* 45, 732–739.
- Zhang, X., McDaniel, A.D., Wolf, L.E., Keusch, G.T., Waldor, M.K. and Acheson, D.W. (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* 181, 664–670.
- Zhang, W., Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Kuciuz, T. and Karch, H. (2005) Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71, 558–561.

5. Publication n°2

Shiga Toxin Stx2 Production Is Promoted By Enrofloxacin in Experimental *In Vitro*-Selected Mutants of *Escherichia coli* O157:H7 Resistant to Fluoroquinolones

Claire Maurer, Danièle Meunier and Jean-Yves Madec

Titre :

La production de shiga toxines Stx2 chez des mutants *Escherichia coli* O157:H7 résistants aux fluoroquinolones est activée par l'enrofloxacin

Résumé :

Des mutants résistants à l'enrofloxacin ont été sélectionnés à partir de souches d'*E. coli* O157:H7 d'origine bovine. Les mutants produisent 3 fois plus de toxine Stx2 que les souches sauvages après induction par l'enrofloxacin. Les mutants sont également inductibles en utilisant des doses d'enrofloxacin 100 fois supérieures à celles utilisables pour les souches sauvages. Ces résultats suggèrent que les souches d'*E. coli* O157:H7 d'origine bovine pourraient, suite à une augmentation de l'utilisation des fluoroquinolones en pratique vétérinaire, devenir plus fréquemment pathogènes pour l'homme.

Mots clés :

Escherichia coli, O157:H7, STEC, Stx2, enrofloxacin, mutants

**Shiga Toxin Stx2 Production Is Promoted By Enrofloxacin in
Experimental *In Vitro*-Selected Mutants of *Escherichia coli* O157:H7
Resistant to Fluoroquinolones**

Claire Maurer¹, Danièle Meunier¹ and Jean-Yves Madec*¹

¹ : Afssa Lyon. 31, ave Tony Garnier. 69364 Lyon Cedex 7

Key words : *Escherichia coli*, O157:H7, STEC, Stx2, enrofloxacin, mutants

* : Corresponding author Tel : + 33 4 78 69 68 30 Fax : + 33 4 78 61 91 45 mel :
jy.madec@lyon.afssa.fr

Abstract

Enrofloxacin-resistant mutants of Stx2-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle were selected. Mutants produced 3-fold higher Stx2 levels than native strains after induction with enrofloxacin. Mutants were also inducible using hundred-fold higher enrofloxacin concentrations than the useful ones for native strains. These results suggest that *Escherichia coli* O157:H7 from cattle may become more frequently pathogenic to humans as a side-effect of the increasing use of veterinary fluoroquinolones.

Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are human pathogens characterized by the production of either one or both antigenically distinct shiga toxins, termed Stx1 and Stx2 (Cleary 2004). STEC constitute a major public health concern because of the severe illnesses that they can cause in humans, such as hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndromes (HUS) (Su and Brandt 1995; Caprioli, Peng et al. 2005). The majority of the cases worldwide are caused by strains of serotype O157, but infections caused by other serotypes than O157 have been increasingly reported.

Cattle are considered the major animal source of STEC (Kobayashi, Shimada et al. 2001; Hussein and Sakuma 2005) and the transmission routes whereby these organisms may be transmitted to humans include the food-borne route, but also water exposed to animal faeces, direct or indirect contacts with animals and person-

to-person spread by the faecal oral-route (Caprioli, Morabito et al. 2005). It is noteworthy that the incidence of STEC infections in humans remains quite low compared to the important cattle reservoir (Caprioli, Morabito et al. 2005). This may reflect a limited exposure of the human population in line with good hygiene practices, at the slaughterhouses for instance. However, it is also admitted that not all STEC occurring in cattle would be at risk for humans and the definition of human pathogenic STEC is still in debate.

In a previous work (Maurer, Lazizzera et al. 2008), we showed that the Stx2 production rate of *E. coli* O157:H7 strains isolated from healthy cattle, albeit variable among strains, was highly promoted by sub-inhibitory concentrations of enrofloxacin, an antibiotic of the fluoroquinolones family only licensed for veterinary use. Alongside, the increasing use of these molecules in veterinary clinical practice may also contribute to enhance the intra-intestinal spread of *stx2*-carrying prophages from virulent to non virulent strains. Also, a direct impact of the use of fluoroquinolones in cattle is the increasing incidence of low- and high-level Enterobacteriaceae resistant strains, possibly including *E. coli* O157:H7 isolates. This is to compare to the recent description of *E. coli* O26:H11 isolates resistant to third-generation cephalosporins (Ishii, Kimura et al. 2005).

Thus, the goal of the present study was now (i) to *in vitro* select experimental resistant mutants of Stx2-producing and inducible *E. coli* O157:H7 cattle strains and (ii) to quantify the Stx2 production rate in mutants before and after induction with enrofloxacin.

Materials and Methods

Selection of mutants

Two lines of spontaneous quinolone-resistant mutants derived from the two susceptible but Stx2-producing HSVR 87 and HSVR 149 cattle strains (Maurer, Lazizzera et al. 2008) were obtained through a stepwise selection using either nalidixic acid or enrofloxacin. Indeed, 100 µl of overnight cultures of the susceptible strains, grown in a brain heart infusion medium, were plated on Mueller-Hinton agar medium supplemented with a starting concentration of 5 µg/ml of nalidixic acid or 0.05 µg/ml of enrofloxacin. Resistant colonies of each strain were collected, one of which was kept for the next step. Further selection steps with increasing concentrations of nalidixic acid (5, 10, 50, 100 µg/ml) or enrofloxacin (0.05, 0.1, 0.5, 1 µg/ml) were conducted similarly. The MICs of enrofloxacin for all resistant isolates were evaluated by E-test® (BioRad, Marnes La Coquette, France).

Induction experiments

Induction experiments were performed on native strains and on the corresponding mutant strains selected on enrofloxacin-enriched plates. Native and mutants HSVR 87 and HSVR 149 cells were allowed to grow from 0 to 24 hours with or without enrofloxacin and Stx2 production was quantified using the ProSpecT® Shiga toxin ELISA (Oxoid, Dardilly, France) at each time point as described previously (Maurer *et al*, 2008).

Results and Discussion

Selection of mutants

After four selection steps up to a final concentration of nalidixic acid of 100 µg/ml or enrofloxacin of 1 µg/ml, highly resistant isolates were obtained in each line. Mutants obtained after selection with nalidixic acid were not considered further as nalidixic acid was strictly used in order to double the chance to get mutants highly resistant to fluoroquinolones. MICs of enrofloxacin in mutants were 512-fold higher than those of the corresponding susceptible strains.

Stx2 expression in absence of induction with enrofloxacin

In line with our previous observations, the global Stx2 production by native HSVR 149 cells significantly increased about 2.5 h after inoculation whereas native HSVR 87 cells did only produced limited amounts of toxin. Mutants produced comparable levels of Stx2 than their corresponding native strains (data not shown), suggesting that point mutations in the *gyrA* gene, that constitutes the most probable mechanism responsible for the resistant phenotype, may not have provoked a significant bacterial SOS response. Thus, these data suggest that STEC becoming resistant to fluoroquinolones would not be at greater risk to humans than their non mutant homologous strains.

Stx2 expression after induction with enrofloxacin

However, we then compared the Stx2 production between mutant and native strains after induction with enrofloxacin. As shown in Figure 1 for HSVR 149 strain, Stx2 production by mutants was induced using up to 100 µg/ml of enrofloxacin, i.e. a

concentration hundred-fold higher than the usual sub-inhibitory one of native strains. Moreover, the peak of Stx2 production reached by mutants after induction was more than 3-fold higher than the one measured for native strains (Figure 1).

Conclusions

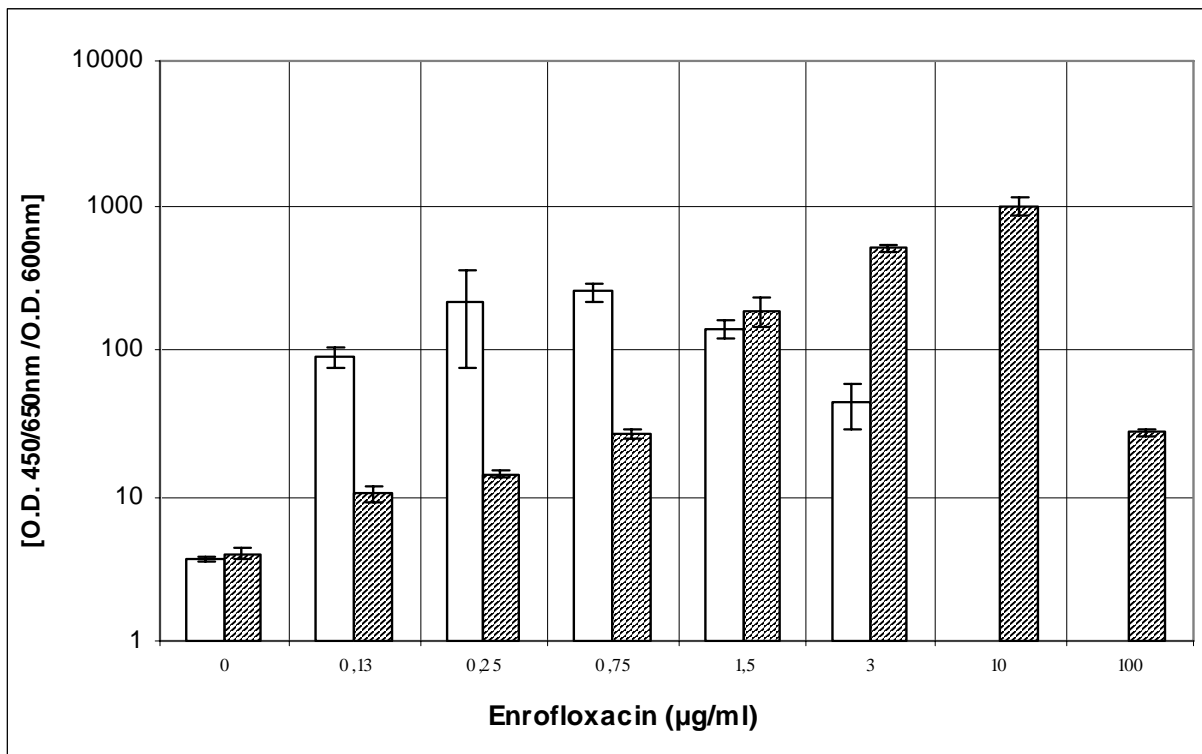
Overall, these results extend our previous observations that significant induction rates are measurable after induction with enrofloxacin, even for isolates with undetectable basal levels of Stx2 production. In this work, we showed that even higher induction rates were reached after induction by enrofloxacin in *E. coli* O157:H7 strains that have become resistant to fluoroquinolones compared to non mutants. Thus, this may become of great concern with regard to public health issues in any case of transmission of a fluoroquinolone-resistant STEC strain from cattle to humans, both in terms of intrinsic pathogenicity and difficulties to eradicate. All together, this study reinforces the usefulness of ELISA to identify strains that would be possibly pathogenic to humans and highlights the risk that bovine-associated Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates may become more frequently pathogenic to humans as a side-effect of the increasing use of veterinary fluoroquinolones.

Acknowledgment:

This study was supported by a grant from the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Maisons-Alfort, France.

Figure 1:

Levels of Stx2 production over time after induction with enrofloxacin by native (white) and mutants (hatched) HSVR 149 cells, as quantified using the ProSpecT® Shiga toxin ELISA. For each strain, each sample was run in duplicate three times. As previously described, results were expressed as normalised values after dividing the ELISA absorbance OD_{450/650} values by the OD₆₀₀ of the bacterial suspension.



References:

Baker, D.R., Moxley, R.A., Steele, M.B., Lejeune, J.T., Christopher-Hennings, J., Chen, D.G., Hardwidge, P.R., & Francis, D.H. (2007) Differences in virulence among

Escherichia coli O157:H7 strains isolated from humans during disease outbreaks and from healthy cattle. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 7338-46.

Caprioli, J., Peng, L., & Remuzzi, G. (2005b) The hemolytic uremic syndromes. *Curr Opin Crit Care*, **11**, 487-92.

Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., & Oswald, E. (2005a) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*, **36**, 289-311.

Cleary, T.G. (2004) The role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Semin Pediatr Infect Dis*, **15**, 260-5.

Hussein, H.S. & Sakuma, T. (2005) Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. *J Dairy Sci*, **88**, 450-65.

Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Shiroto, K., Otsuka, M., Hashizume, N., Tamura, K., & Yamaguchi, K. (2005) Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J Clin Microbiol*, **43**, 1072-5.

Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S., & Yamamoto, K. (2001) Prevalence and characteristics of shiga toxin-

producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. Appl Environ Microbiol, **67**, 484-9.

Konowalchuk, J. & Speirs, J.I. (1979) Response of various cell lines to *Escherichia coli* toxic products. Can J Microbiol, **25**, 335-9.

Konowalchuk, J., Speirs, J.I., & Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun, **18**, 775-9.

Maurer, C., Lazizzera, C., & Madec, J.Y. (2008) Characterization of inducible stx2-positive *Escherichia coli* O157:H7/H7- strains isolated from cattle in France. J Appl Microbiol.

Su, C. & Brandt, L.J. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. Ann Intern Med, **123**, 698-714.

DISCUSSION

Dans le cadre de la surveillance de la contamination de la filière de production " viandes hâchées " par les souches STEC, une note du 18 avril 2006 de l'AFSSA recommandait " ..., de rechercher *a minima* systématiquement les souches E. coli O157:H7 possédant les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2*, associé(s) au gène *eae*, et d'associer les mesures de gestion en cas de détection ... ". Dans cette même note, l'AFSSA définissait les souches STEC pathogènes comme suit : " Sont considérées comme pathogènes les souches STEC du sérotype O157:H7 et des serotypes O26, O111, O145 et O103 ayant comme facteurs de virulence les gènes *stx1* et/ou *stx2*, et *eae* ".

Dans un avis sur auto-saisine adopté le 18 octobre 2007, l'EFSA souligne l'absence de consensus concernant la stratégie optimale permettant de caractériser les facteurs de virulence des VTEC pathogènes et conclut à l'impossibilité de définir aujourd'hui entièrement les VTEC pathogènes pour l'homme. L'EFSA poursuit en recommandant en premier lieu une surveillance initiale des VTEC O157:H7 car ce serotype est majoritairement associé à de graves infections humaines.

Enfin, dans un avis adopté le 15 juillet 2008, l'AFSSA conclut que les souches STEC pathogènes, encore dénommées souches " EHEC typiques majeurs ", sont définies sur la base de stricts critères génétiques, incluant "la détection des gènes *stx1* et/ou *stx2*, *eae*, mais également celle d'autres séquences génétiques telles que *rfb*, *flic*, *wzx*, ... "

Ainsi, dans ce contexte largement établi à ce jour d'une définition des souches STEC pathogènes sur une base génétique, l'objectif de notre travail a été d'en explorer le fondement sous l'angle de l'expression protéique de ces gènes de virulence. En effet, si la caractérisation génétique des souches STEC permet d'identifier la présence /

absence de séquences potentiellement impliquées dans leur pathogénicité, elle n'adresse pas la question du niveau d'expression de ces gènes.

Notre travail s'est ainsi porté sur l'analyse par ELISA du niveau d'expression du gène *stx2* chez 46 souches O157 :H7 d'origine bovine. Nous avons montré que ce niveau d'expression basale variait largement au sein d'un panel de souches pourtant possédant toutes le gène *stx2*. Nous avons également quantifié l'augmentation de ce niveau d'expression après induction par une fluoroquinolone vétérinaire, l'enrofloxacin, mimant ainsi des conditions de pression environnementale locale de la microflore O157 :H7 bovine après traitement antibiotique. Enfin, nous avons évalué l'expression de ce gène au sein de souches O157 :H7 devenues résistantes aux fluoroquinolones et soumises à une induction positive par ces mêmes molécules.

L'ensemble de ce travail a ainsi eu pour objectif de s'inscrire dans une approche complémentaire, et non de substitution, de la définition de souches STEC pathogènes, tout en adressant la question de la modulation de l'expression des shiga-toxines par certains facteurs environnementaux, tels que les antibiotiques.

1. Choix du test et validation

1.1. Performances intrinsèques du test

Dans le cadre d'une approche protéique, plusieurs méthodes pouvaient être candidates. Parmi celles-ci, l'adaptation d'une technique ELISA commerciale nous a semblé pouvoir satisfaire à nos objectifs de quantification des shiga-toxines. Le test ProSpect shiga-toxin a été choisi après comparaison des rares tests ELISA présents sur le marché.

1.1.1. Spécificité et linéarité du test

Dans l'usage que nous avons souhaité faire de ce test, il nous a semblé important de porter en premier lieu l'accent sur la spécificité de la réaction immunologique. Bien que commercialisé pour la détection spécifique de séquences *stx*, il reste que ce test fonde sa reconnaissance de la toxine par un antiserum polyclonal de lapin, dont la spécificité peut, à ce titre, être discutée. Il est également à noter que cet antiserum permet indifféremment la détection des séquences *stx1* et *stx2*, et la nature de l'épitope reconnu est à ce jour protégée par le secret industriel.

La spécificité du test a été éprouvée d'une part à l'aide de protéine purifiée commercialisée, d'autre part à l'aide de souches de référence associées à des épisodes cliniques sévères chez l'homme, possédant des séquences *stx*, présentant un test positif sur cellules Vero, et dont l'expression de ces gènes pouvait donc être considérée comme effective. Le test a également été mis en œuvre sur ces antigènes en présence de deux milieux de culture, ainsi qu'à partir de souches témoins (négatif) ne possédant aucune séquence *stx*. L'ensemble des résultats nous a ainsi conduit à considérer la spécificité du test comme acceptable au regard de notre objectif de détection de l'expression de ces séquences.

Pour autant, il convient de considérer que l'imprécision sur la nature exacte de la séquence *stx* reconnue nous semble devoir privilégier l'application du test à des souches préalablement caractérisées génétiquement. Ainsi, toutes les souches de terrain étudiées ici possèdent uniquement le gène *stx2*, ce qui concourt indirectement à une meilleure spécificité du test. Ces résultats renforcent la nécessité de développement de tests sur la base de réactifs immunologiques de spécificité accrue (anticorps monoclonaux). Ils réaffirment également la réalité d'une complémentarité entre méthodes génétiques et phénotypiques.

S'agissant de la linéarité du test, l'objectif premier du test ProSpect ELISA est centré sur l'obtention d'un résultat positif / négatif à partir de l'analyse de prélèvements biologiques non purifiés (fèces). L'objectif de notre travail a été de détourner ce test

de son usage premier, en évaluant sa capacité à une analyse quantitative de la production de toxines, et donc en recherchant l'existence d'une zone de linéarité. Cette capacité du test à être changé de domaine d'application a été confortée par nos résultats obtenus à partir de dilutions de toxines purifiées, ainsi que de toxines extraites à partir de dilutions sériées de culture bactérienne. Toutefois, les affinités de l'antiserum pour d'autres séquences *stx* (*stx1*, autres variants *stx2*, ...) doivent être considérées comme non évaluées, et les éventuelles courbes de linéarité non validées pour ces toxines.

Il reste donc que le travail réalisé ici doit être considéré dans le strict cadre de l'étude de souches purifiées en laboratoire, et ne peut en aucun cas à ce stade être extrapolé à l'étude de prélèvements de terrain (fèces). Une validation plus large du caractère quantitatif de ce test à partir de prélèvements biologiques de terrain pourrait au contraire constituer une extension pertinente de notre étude.

1.1.2. Sensibilité du test

Dans son format commercial, le test comporte un seuil de positivité, dont la détermination reste peu claire. Théoriquement défini par rapport à un bruit de fond de valeurs au-delà desquelles tout signal correspond à un événement relevant d'un phénomène biologique particulier, et en l'occurrence d'un danger pour l'homme, ce seuil revêt un sens nouveau dès lors que le test est détourné de son application originelle. Dans notre étude, en l'absence de données expérimentales plus approfondies, nous avons conservé le seuil proposé par le fabricant pour discriminer les signaux relevant ou non du bruit de fond. Les résultats obtenus, de classification de 3 groupes de souches en fonction du niveau d'expression des toxines, semblent confirmer le caractère discriminant du seuil actuel.

Appliqué à la quantification de toxine purifiée (fig R.5), ce seuil permet de corrélérer un résultat positif dès 156,25 pg de toxine par puits (600 µl), soit 93,75 pg/ml, ce qui est légèrement supérieur aux données indiquées par le fabricant, qui annonce un seuil de détection à 126 pg/ml pour la toxine Stx2. En revanche, lors d'autres essais, des

quantités jusqu'à 3 fois plus faibles ont pu être détectées à partir de kits ayant d'autres numéros de lot. C'est pour cette raison que nous considérons inapproprié à ce stade, d'établir une correspondance qui devrait être valable quelque soit le lot, entre DO mesurée en ELISA et quantité de toxine détectée.

Ainsi, ces résultats doivent maintenant encourager la validation de ce test à grande échelle sur des populations de souches de terrain associées ou non à des infections humaines, afin de déterminer un seuil opérationnel de dangerosité pour l'homme pouvant permettre de définir des options de maîtrise par les acteurs de la surveillance. En effet, et bien que le domaine d'application qu'il a été fait ici de ce test puisse permettre de l'exploiter à des fins de recherche, ce n'est que dans un schéma de validation large que la sensibilité d'un test de diffusion encore confidentiel sur le plan commercial pourra prendre le sens qu'on peut en attendre pour des objectifs de sécurité alimentaire.

1.1.3. Reproductibilité et répétabilité du test

En préalable à notre analyse quantitative de l'expression des toxines par le test ProSpect ELISA, une attention toute particulière a été portée à l'appréciation de la variabilité éventuelle des valeurs obtenues au sein d'un même lot et entre différents lots de tests.

Le coefficient de variation (CV) inter-test indiqué par le fabricant a été mesuré à partir de 3 échantillons positifs et 1 échantillon négatif. Chaque échantillon a été testé dans 24 puits par session pendant 3 jours consécutifs. Le CV moyen inter-test était de 8,69%, avec, pour les 3 échantillons positifs, des CV compris entre 4 et 8,48% (moyenne 6,38%) et des $DO_{450/650nm}$ moyennes comprises entre 0,264 et 0,830. Le fabricant ne précise en revanche pas si les kits utilisés les 3 jours consécutifs avaient ou non le même numéro de lot. Nous avons considéré que les 3 tests ont été réalisés avec des plaques ELISA ayant le même numéro de lot.

Dans nos travaux, nous n'avons pas évalué de CV inter-test comme l'a fait le fabricant, nos échantillons étant certes testés sur des plaques ayant le même lot de fabrication, mais à partir de cultures bactériennes préparées à des dates différentes et testées à des concentrations bactériennes équivalentes. En effet, dans la mesure de nos CV intra-lot, nous n'avons pas utilisé le même échantillon mais cultivé nos isolats à partir d'un même cryotube congelé à -80°C . Pour l'ensemble de nos isolats positifs testés 3 fois avec des plaques ELISA ayant le même numéro de lot (cf fig. R.14), les CV sont compris entre 3,25 et 76,22% avec un CV moyen de 26,22%. Le CV intra-lot moyen est 4 fois supérieur au CV inter-test du fabricant mais contrairement au fabricant, nos résultats ont été obtenus à partir de 3 séries d'échantillons différents. Si l'on compare des échantillons identiques testés sur plusieurs plaques ayant le même numéro de lot comme indiqué fig R.5 avec une gamme de dilution de la toxine purifiée, les CV sont compris entre 0,88 et 16,18% avec un CV moyen de 4,66%. Ces résultats, bien qu'obtenus pour une gamme de toxine purifiée, sont déjà davantage corrélés à ceux du fabricant. L'utilisation d'échantillons préparés à des dates différentes augmente la variabilité des résultats obtenus par ce test ELISA.

Le CV intra-test, quant à lui, a été obtenu par le fabricant, en testant "24 puits contenant chacun 4 échantillons". Là encore, la formulation nous a paru quelque peu ambiguë. Nous avons interprété cela comme si chacun des 4 échantillons avait été testé dans 6 puits sur une même plaque de 24 puits au total (les puits étant séquables individuellement, ce kit ne s'effectue pas nécessairement sur des plaques 96 puits). D'après les données du fabricant, le CV moyen intra-test était de 4,59% avec, pour les 3 échantillons positifs, des CV compris entre 2,78 et 4,90% (moyenne 3,44%) et des $\text{DO}_{450/650 \text{ nm}}$ moyennes comprises entre 0,274 et 1,226.

Nous disposons de nombreuses données obtenues de manière similaire au fabricant lorsqu'un même échantillon est testé en duplicate sur une même plaque. Les CV obtenus sont compris entre 0,4 et 17,5% (moyenne 6,32%) (cf fig. R.5), entre 0,2 et 14% (moyenne 4,87%) pour des $\text{DO}_{450/650 \text{ nm}}$ moyennes comprises entre 0,125 et 2,595. Ce qui n'est donc pas très éloigné des données du fabricant.

De façon générale dans notre travail, et en l'état actuel du test, nous avons considéré préférable de mener les expérimentations dans les conditions de variabilité les plus faibles, et donc sur des plaques appartenant au même lot de production. Outre des raisons globales de process industriel, un élément important de variabilité inter-lots pourrait aussi relever de la nature du réactif immunologique (antiserum polyclonal). Ainsi, en plus des aspects de spécificité déjà mentionnés plus haut, le développement d'un test ELISA fondé sur une reconnaissance immunologique par un anticorps monoclonal contribuerait sans doute aussi à augmenter la reproductibilité du test.

1.2. Validité et limites des mesures d'absorbance – lien avec la croissance bactérienne

1.2.1. Limite du calcul de ratio DO ELISA / DO bactérienne

Dans le but de comparer nos résultats, nous avons utilisé le ratio de la DO mesurée en ELISA à 450/650nm rapporté à la DO bactérienne à 600nm. Décrit chez certains auteurs, ce ratio nous semblait permettre la meilleure comparaison de la production de toxines au cours du temps et entre souches, et pour une quantité identique de bactéries. Néanmoins, ce calcul présente plusieurs limites dont nous avons souhaité tenir compte dans nos interprétations.

En préalable, pour des résultats considérés comme strictement négatifs (mesures d'absorbance ELISA $DO_{450/650nm} < 0.07$), les valeurs obtenues par ce calcul n'ont évidemment pas de sens biologique. En effet, la valeur de la DO ELISA, dans ce cas, ne reflète pas la quantité de toxines présente mais correspondrait plutôt à la mesure d'un bruit de fond. Pour les valeurs de DO pour lesquelles il y a incertitude sur le résultat du test ($0.07 < DO_{450/650nm} \leq 0.1$), on ignore si la mesure de l'absorbance reflète la présence ou non de toxine. De manière purement conceptuelle, il faudrait attribuer une valeur 0 à tous les ratios DO ELISA sur DO bactérienne dont le

numérateur est < 0.1 (ou à $0,07$ si on considère que les incertitudes reflètent le plus souvent des tests où la quantité de toxine est trop faible pour avoir une $DO > 0,1$).

Nous avons privilégié l'hypothèse haute en terme de risque, et nous avons donc considéré les échantillons de la zone grise comme potentiellement positifs plutôt que potentiellement négatifs. Par ailleurs, au delà d'une $DO_{450/650nm}$ que nous avons estimé à $1,5$ unités de DO , nous avons observé une saturation du lecteur de plaque ELISA. Au-delà de la valeur de $1,5$ au numérateur, il y a donc une sous-estimation de la quantité de toxine produite par une souche.

1.2.2. Relation Croissance *versus* ELISA

Dans le cas d'isolats produisant de fortes quantités de toxine, comme l'isolat HSVR 149 par exemple, le ratio $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$ diminue jusqu'à 3H30 puis augmente jusqu'à un maximum atteint à 4H30, pour enfin se stabiliser en diminuant légèrement au-delà de 4H30 (cf par exemple fig. R.14). Cette stabilisation du ratio $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$ après la phase exponentielle de croissance pose question : quelle en est la signification physiologique ? A-t-on atteint un maximum de toxine produite ? Ou est-ce dû à la saturation de la $DO_{450/650nm}$ (entre $1,5$ et 4 unités de DO) et de la DO_{600nm} quand la croissance bactérienne a atteint sa phase stationnaire et donc que le numérateur et le dénominateur du ratio $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$ sont environ constants ?

Si l'on dilue l'échantillon bactérien à équivalent d'une $DO_{600nm} = 1$, la saturation est atteinte de toutes façons (à 5H30), donc il y a accumulation de la toxine (cf. fig. R.16). Dans le cas d'un isolat produisant de faibles quantités de toxine comme HSVR 82, la $DO_{450/650nm}$ dépasse à peine le seuil de positivité entre 3H30 et 4H30 de cinétique avec une $DO_{450/650nm}$ de $0,2$. On n'observe pas d'accumulation de la toxine voire plutôt une diminution à partir de 5H de cinétique. Là aussi, le ratio $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$ se stabilise le numérateur et le dénominateur du ratio évoluant peu après 5H de cinétique (cf fig. X R.17).

1.2.3. Conclusions sur les relations ELISA / croissance bactérienne

Au final, compte-tenu des différentes variables intervenant dans la mise en œuvre du test, l'ensemble des éléments décrits précédemment nous conduit avant tout à porter l'attention du lecteur sur l'absence de méthodes de calcul quantitatif totalement indiscutable. Ce point est d'ailleurs largement illustré dans la littérature dès lors que l'on cherche à comparer les modes de calcul utilisés par d'autres auteurs.

Dans ce travail, nous avons en premier lieu choisi le mode de calcul quantitatif qui nous apparaissait scientifiquement le plus approprié, et nous considérons que, bien qu'imparfait, il permet l'analyse du phénomène biologique (production de toxine Stx) que nous souhaitons appréhender en fonction des variables d'intérêt (type de souches, temps, niveau d'expression, ...) et dans l'objectif global d'une première classification de souches de terrain d'origine bovine en fonction de leur expression de la toxine.

1.3. Conclusions sur l'usage du test ProSpect Shigatoxin

Avant toute application sur un panel de souches de terrain, nous avons souhaité accorder un temps important au travail de validation méthodologique du test ProSpect ELISA. Cette étape nous est apparue déterminante dans le contexte :

- de l'usage d'un test commercial dont les éléments de validation industrielle ne sont pas accessibles
- de l'usage d'un test que le niveau de diffusion, à ce jour confidentiel, ne place pas dans des conditions fortes de compétitivité ou de contrôle par les autorités compétentes
- d'une modification du domaine d'application d'un test initialement ciblé pour des recherches de toxines dans des prélèvements biologiques
- d'une prise en main globale d'un test jusqu'ici non utilisé dans notre laboratoire

Cette validation a porté d'une part, sur les caractéristiques classiques intrinsèques d'un test et d'autre part, sur le niveau de significativité pouvant être apporté aux résultats en fonction des variables mesurées et/ou calculées.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus nous a ainsi permis de considérer que ce test pouvait être valablement appliqué à l'étude des souches d'*E. coli* O157:H7 bovines collectées au laboratoire, et surtout d'en connaître les limites méthodologiques permettant de fiabiliser le sens qui peut être accordé aux résultats obtenus.

2. Expression basale et expression induite de la toxine Stx2 par les souches O157 : H7 bovines

L'objectif premier du travail visait à catégoriser les souches étudiées selon leur niveau d'expression basale de toxines Stx, dans le but d'assigner à chacune d'elles un premier niveau de dangerosité potentielle pour l'homme.

2.1. Différents niveaux d'expression basale de Stx2 sont observables

Notons en premier lieu que la notion d'expression basale mérite sans doute d'être nuancée. En effet, une faible fraction de bactéries peuvent être induites spontanément sans sollicitation du système SOS. A l'inverse, divers facteurs environnementaux, tels que l'épuisement du milieu de culture, la surpopulation, la production de déchets conduisant à la lyse des bactéries, sont susceptibles d'activer le système SOS et l'expression des toxines Stx. Plusieurs données montrent

également que la répression des séquences promotrices des gènes de toxines est incomplète et qu'une faible fraction de lysogènes est induite par induction spontanée.

Dans notre étude, alors que toutes les souches bovines étudiées possèdent le gène *stx2*, les résultats obtenus par ELISA montrent que ces souches peuvent être regroupées en 3 groupes d'expression basale différente (nulle, faible et élevée). Chez les souches exprimant la toxine, la production a pu être détectée après moins de 4H, ce qui a également été observé par Yoh *et al.* (Yoh 1999). La souche de référence associée à une infection humaine majeure, a également présenté des taux saturants de toxine. L'ensemble de ces résultats contribue bien à souligner l'absence de corrélation prévisible entre la présence du gène *stx2* et son expression, et que donc la détection génétique de la séquence n'est pas totalement suffisante pour prédire la pathogénicité d'un STEC pour l'homme.

La production de Stx2 a pu également être mise en évidence chez 2 souches *stx2*- (HSVR 100 et HSVR 138) qui pourraient porter des variants indétectables avec les amorces PCR utilisées au cours de nos travaux. Ceci illustre une fois de plus la complémentarité des tests de détection protéique avec les tests utilisant l'amplification de l'ADN pour évaluer la pathogénicité d'isolats STEC.

2.2. Effet de l'enrofloxacin sur l'expression de Stx2

Nous avons ensuite quantifié l'effet de concentrations subinhibitrices d'enrofloxacin sur le niveau de production de la toxine Stx2 par les 46 souches d'*E. coli* O157:H7/H-, dans un contexte où cette fluoroquinolone d'usage exclusivement vétérinaire pourrait persister dans l'environnement immédiat de la micro-flore intestinale des bovins, suite à un traitement par voie orale. A ce titre, les spécialités vétérinaires à base de fluoroquinolones sont nombreuses (Baytril®, Marbocyl®, ...) et ces molécules sont également largement utilisées par le praticien.

Plusieurs études ont exploré la réponse de souches STEC en terme de production de toxines, isolés chez des bovins ou des cochons, à des stimuli environnementaux comme la mitomycine C (Muniesa 2004 ; Koitabashi 2006), le fer, les antibiotiques (Matshuri 1999, Uemura 2004). Le travail réalisé ici est, à notre connaissance, le premier concernant l'impact d'une fluoroquinolone vétérinaire, l'enrofloxacin, sur des souches d'*E. coli* O157:H7/H- d'origine bovine.

Au cours de ce travail, chaque fois que l'enrofloxacin a produit un effet, il s'agissait d'une induction positive de la production des toxines. L'état de la littérature montre que cette induction positive n'est pas nécessairement de règle, mais de nombreux auteurs décrivent les effets d'autres molécules, telles que la mitomycine C (Ritchie 2003), de faibles concentrations de fer (Muniesa 2004) ou encore des facteurs de croissance (Kohler 2000). De plus, dans ces études, la plupart des isolats n'étaient ni du sérotype O157:H7 ni même du séro groupe O157, ce qui pourrait contribuer à expliquer les différences de réponses observées suite à l'induction.

En revanche, dans la plupart des travaux publiés, et à de très rares exceptions (un isolat O139 porcin (Uemura 2004) et une souche O157:H7 humaine (Grif 1998)), les quinolones présentent un effet inducteur sur les souches humaines (Walterspiel 1992, Matsushiro 1999, Yoh 1999). Nos résultats permettent d'étendre donc aux fluoroquinolones vétérinaires, des observations faites antérieurement avec des fluoroquinolones humaines (ciprofloxacine, ofloxacine, norfloxacine) (Matsushiro 1999 Yoh 1999 Kimmitt 2000 Zhang 2000).

Ces résultats sont également cohérents avec le fait que les quinolones sont connues pour provoquer, suite aux dommages de l'ADN et/ou à l'inhibition de la réplication de l'ADN, la réponse SOS et l'induction des prophages codant Stx. Pour autant, peu d'études investiguent comment l'expression des facteurs de virulence est régulée chez les isolats STEC d'origine bovine (Kohler 2000), et différents autres facteurs pourraient expliquer l'absence ou la réduction de la production de toxines, comme l'altération du gène *stx2* ou de son promoteur (Koitabashi 2006). On peut en effet se demander si l'effet inducteur des (fluoro)quinolones sur l'expression de la toxine est spécifique (système SOS) ou lié à un stress "aspécifique" provoqué par les

antibiotiques. Les (fluoro)quinolones sont certes connues pour activer le système SOS lui-même connu pour induire les prophages et la production des toxines. Mais tous les antibiotiques n'ont pas un effet aussi net sur l'induction des toxines donc un stress "aspécifique" ne semble pas suffire à expliquer l'effet observé avec les (fluoro)quinolones (Kimmitt, Harwood et al. 2000). Dans la littérature, il existe des exemples d'isolats STEC non inductibles par les fluoro)quinolones. L'effet observé semble donc bien lié à l'induction du système SOS induisant les prophages et la production de toxines. Certains prophages ont été identifiés comme défectifs dans des cas où l'expression de la toxine n'est pas induite par des activateurs du système SOS.

2.3. Proportion de souches STEC inductibles parmi les souches d'origine animale

Les résultats obtenus dans ce travail soulignent la très grande proportion de souches STEC inductibles au sein du panel étudié (44/46), alors que seulement 40% d'entre elles produisent constitutivement Stx2 sans induction. Ces données sont nécessairement à pondérer par le niveau de représentativité de l'échantillon choisi. En effet :

- l'effectif global est relativement faible
- les souches ont été collectées dans deux abattoirs différents mais qui ne sauraient représenter la diversité des souches bovines circulantes
- une certaine parenté génétique existe entre elles, comme le montrent les résultats de clonalité obtenus.

Pour autant, ces résultats sont en ligne avec ceux d'études antérieures montrant que les phages *stx2+* inductibles sont particulièrement répandus chez les STEC d'origine animale, et en particulier d'origine bovine (Muniesa 2004). Les données disponibles sur le caractère inductible des isolats d'origine bovine restent donc encore limitées mais semblent encore conforter l'importance de l'impact que pourrait avoir les fluoroquinolones vétérinaires sur la dangerosité des souches STEC animales.

2.4. Relation entre les niveaux d'expression basale et induite pour une souche donnée

Nos résultats montrent également que le niveau basal de la production de Stx2 ne permet pas de prédire le niveau potentiellement atteignable après induction. En effet, des taux d'induction significatifs ont pu être mesurés pour des isolats produisant des niveaux basaux de Stx2 indétectables. Si l'on ne considère que les isolats produisant des niveaux basaux détectables, la production de Stx2, après induction par l'enrofloxacin, augmente d'un facteur 7 à un facteur supérieur à 340 selon les isolats.

Ces résultats peuvent être comparés aux taux d'induction quantifiés pour des souches bovines, de serogroupe O157 ou d'autres sérogroupes, et en utilisant de la mitomycine C (augmentation moyenne d'un facteur 41) (Ritchie 2003). Cet aspect reste néanmoins complexe à apprécier dans la mesure où il convient aussi de considérer la diversité des facteurs influençant l'expression des toxines par les souches hôtes, tels que le génotype du prophage *stx2+* ou le sérotype de l'isolat STEC (Wagner 1999, Herold 2005). A ce titre, dans notre étude, tous les isolats possèdent également le gène *eae* et tous, à l'exception de 2, sont de serotype H7. Cette faible variabilité génotypique entre nos isolats ne nous a donc pas permis de corréler ces facteurs avec la variabilité de l'induction de *stx2*, et il serait intéressant d'investiguer cela avec un autre panel de souches.

Au final, en dehors d'un comportement souche spécifique des isolats d'*E. coli* O157:H7/H7- aux concentrations subinhibitrices en quinolones, nos résultats illustrent la variabilité dans la cascade de régulation des gènes *stx2* chez *E. coli* O157:H7/H7-. Ceci devrait mettre en garde sur le fait que des niveaux basaux de production de Stx2 détecté en ELISA peuvent être observés chez des souches inductibles et potentiellement pathogènes. D'autres facteurs que l'expression de *stx2* sont donc à considérer pour déterminer si une souche bovine est à risque pour l'homme (Roe 2004). Malheureusement, les approches basées sur la détection et la quantification des produits de gènes de virulence sont encore peu développées et utilisées. La

surveillance dans ce domaine pourrait s'appuyer sur des études de grande envergure sur la sensibilité et la spécificité des ELISA, en particulier pour détecter les souches sécrétant peu de toxine comme décrit pour d'autres sérotypes de STEC (Zhang 2005) ou des variants Stx2 non caractérisés.

2.5. Variation de la production de toxine au cours du temps, labilité de l'induction

Lors de la cinétique d'induction de l'expression de la toxine pour HSVR 149, on observe une diminution drastique des ratios $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$ après 24 H (la DO_{600nm} augmentant et la $DO_{450/650nm}$ restant stable). Comme nous l'avons vu précédemment à partir d'une $DO_{450/650nm}$ supérieure à 1,5 unité de DO, on atteint le seuil de saturation du lecteur ELISA et la proportionnalité existant entre la quantité de toxine et une $DO_{450/650nm}$ inférieure à 1,5 unité de DO n'existe plus.

Dans cette expérience, en absence d'enrofloxacin, et pour des concentrations en enrofloxacin de 0,1 et 0,25 µg/ml, les $DO_{450/650nm}$ sont effectivement supérieures à 1,5 unités de DO. Par contre, avec 0,5 µg/ml d'enrofloxacin, la $DO_{450/650nm}$ dépasse à peine 1 unité de DO à 24 H. La diminution du ratio $DO_{450/650nm}/DO_{600nm}$ qui passe de 157 à 8H30 à 17 à 24 H, n'est donc pas imputable à la saturation du lecteur de plaque ELISA lors de la mesure de la $DO_{450/650nm}$.

En fait, c'est la DO_{600nm} qui augmente d'un facteur 10 (de 0,007 à 0,06) entre 8H30 et 24H, entraînant la diminution du ratio d'un facteur quasi équivalent (9,23). La quantité de toxine présente dans le milieu n'aurait que peu évoluée entre 8H30 et 24H, par contre la population bactérienne a repris sa croissance, stoppée durant les premières 8H30 de l'expérience.

Plusieurs hypothèses non mutuellement exclusives pourraient expliquer ce que l'on observe :

- L'antibiotique a été totalement consommé par les bactéries ou se dégrade dans le milieu passé une dizaine d'heures.
- Une partie de la population bactérienne devenue résistante ou tolérante à l'antibiotique croit.
- La faiblesse des DO_{600nm} (0,007 et 0,06) fait que l'incertitude due à la mesure de celles-ci expliquerait en partie (voire totalement ?) cette augmentation d'un facteur 10.

3. Effets cumulés de l'enrofloxacin sur la sélection de résistance et l'induction de toxines

De façon globale, l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire conduit, à plus ou moins court terme, et de façon plus ou moins directe, à la sélection de souches de sensibilité diminuée, voire résistantes. Ce phénomène est particulièrement vrai dans l'espèce *E. coli*, très répandue dans les écosystèmes animaux, tant au titre d'espèce commensale que d'espèce pathogène.

Au sein de cette espèce, les serogroupes d'*E. coli* impliqués dans les pathologies à STEC n'échappent pas à la pression de sélection, et la description de souches d'*E. coli* O26:H11 résistantes aux céphalosporines de troisième génération en constitue un exemple (Ishii et al, 2005). De façon comparable, une pression de sélection par les fluoroquinolones peut progressivement conduire à la sélection de souches résistantes à cette famille d'antibiotiques.

Ainsi, un deuxième objectif de notre travail a été d'analyser et de comparer les niveaux d'expression du gène *stx2* en conditions basales et induites, mais chez des souches d'*E. coli* présentant des niveaux de résistance avérés à la molécule inductrice (enrofloxacin). En effet, ce cas de figure nous a semblé constituer une extension pertinente du travail dans la mesure où il peut correspondre à des conditions

naturelles d'impact de concentrations sub-inhibitrices de fluoroquinolones sur la micro-flore de coliformes, soumis alors simultanément à des conditions de pression de sélection et d'induction toxinique.

3.1. Stratégie de sélection de souches d'*E. coli* O157:H7 résistantes aux fluoroquinolones

Une première stratégie en vue de disposer de souches d'*E. coli* O157:H7 résistantes aux fluoroquinolones a été de considérer un sous-groupe de 113 souches d'*E. coli* présentant un tel phénotype de résistance, collectées dans le cadre du réseau de surveillance de la résistance bactérienne animale (réseau Résapath) et d'en déterminer le serogroupe. Aucune souche ne s'étant avérée de serogroupe O157, nous avons changé de stratégie et choisi de sélectionner *in vitro* de telles souches résistantes à partir de souches d'*E. coli* O157 sensibles.

Après plusieurs cycles de sélection conduits soit à partir d'acide nalidixique, soit à partir d'enrofloxacin, des mutants présentant de hauts niveaux de résistance à l'enrofloxacin ont été obtenus. Les deux voies de sélection n'ayant eu pour seul objectif que de doubler les chances de sélection de mutants de haut niveau, seuls ceux sélectionnés par l'enrofloxacin ont été analysés plus avant. En effet, alors que le choix de la molécule de sélection peut avoir un impact sur la plus ou moins grande difficulté à obtenir des souches mutantes, la nature elle-même des mutants obtenus par les deux voies peut être considérée comme tout à fait comparable, compte-tenu du schéma uniforme prévisible d'acquisition de résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli*, par accumulation progressive de mutations chromosomiques dans les gènes *gyrA* et *parC*.

3.2. Expression de Stx2 chez la souche mutante HSVR 149 en l'absence d'induction

En ligne avec les observations précédentes, la production globale de toxine Stx2 par la souche HSVR 149 native a montré une augmentation significative au-delà de 2.5 heures de culture. De façon intéressante, les souches HSVR 149 mutantes ont démontré des niveaux de production globale de toxine Stx2 comparables aux souches natives.

L'absence apparente d'impact du statut sensible ou résistant aux fluoroquinolones d'une souche d'*E. coli* sur le niveau d'expression basal de la toxine Stx2 constitue ainsi un premier résultat remarquable. En effet, même si la nature exacte des mécanismes de résistance acquis n'a pas été déterminée, il est, comme cité plus haut, tout à fait légitime de pré-supposer la sélection de mutations chromosomiques. La sélection de telles mutations devrait constituer un stress bactérien susceptible d'induire une réponse SOS de la cellule, elle-même pouvant induire une plus forte expression de la toxine Stx2.

Si la réalité du déclenchement d'une cascade de réponse de type SOS mériterait d'être investiguée moléculairement, il reste que la production basale globale de Stx2 phénotypiquement mesurable ne semble pas modifiée chez des souches d'*E. coli* O157 résistantes aux fluoroquinolones.

Ces résultats obtenus de façon reproductible, mais sur une seule souche d'*E. coli*, méritent à l'évidence d'être poursuivis à plus large échelle. Ils suggèrent néanmoins que l'acquisition du phénotype de résistance aux fluoroquinolones par des souches STEC ne constitue pas un sur-risque pour l'homme par rapport à celui lié aux mêmes souches non mutantes, outre celui de présenter une difficulté supérieure d'éradication.

3.3. Expression de Stx2 chez la souche mutante H5VR 149 après induction par l'enrofloxacin

Les résultats obtenus après induction par l'enrofloxacin diffèrent, en revanche, des précédents. En effet, deux effets particulièrement notables ont été observés dans ce contexte expérimental.

Le premier élément de discussion résulte du constat qu'une induction de toxine Stx2 peut être obtenue à l'aide d'une concentration en enrofloxacin bien supérieure aux concentrations subinhibitrices. Ce résultat peut probablement trouver aisément son explication dans la capacité intrinsèque de la souche mutante à elle-même survivre à des concentrations supérieures de fluoroquinolones. En outre, de telles concentrations pourraient correspondre à des doses thérapeutiques normales d'usage de ces molécules.

Le second élément de discussion découle du niveau d'expression particulièrement élevé (plus de 3 fois le niveau d'expression basal) des souches mutantes après induction par de fortes concentrations d'enrofloxacin. Ces données suggèrent ainsi que les souches STEC devenues résistantes aux fluoroquinolones sont susceptibles de présenter un risque de virulence accrue pour l'homme par production globale de toxine Stx2 supérieure aux souches natives après induction.

3.4. Conclusions sur le niveau de sur-risque global pour l'homme

De façon générale, l'ensemble de ces résultats souligne encore la complexité de la définition de la virulence d'une souche STEC, traduite en première instance par l'effet clinique qu'elle produit chez l'homme. Cet effet clinique englobe de nombreuses composantes, dont la simple capacité de la souche invasive à persister chez l'hôte, ainsi que son aptitude à l'expression de toxines. En ce sens, l'usage de fluoroquinolones contribue à l'augmentation de la proportion de souches coliformes

résistantes, pouvant être plus fortement induites et par de plus fortes concentrations d'inducteur.

Cette pratique pourrait également contribuer à la propagation intra-intestinale des prophages codant le gène *stx2* d'une souche bactérienne à une autre. C'est en particulier ce qui est suggéré par des observations faites chez des souris traitées expérimentalement avec des fluoroquinolones (Zhang 2000). Ces résultats *in vitro* nécessiteraient d'être complétés par d'autres investigations chez les ruminants pour déterminer précisément les facteurs qui faciliteraient la transduction *in vivo* des phages, tels que la dose de quinolones, comme suggéré par d'autres auteurs (Cornick 2006). Ces résultats confirment en tous cas la nécessité d'une utilisation prudente des fluoroquinolones vétérinaires, à l'instar de ces recommandations dans le traitement des patients souffrant de diarrhées provoquées par des EHEC (Walterspiel 1992).

Enfin, au-delà du phénomène biologique observé dans notre travail, la rémanence de l'induction constitue un aspect essentiel à considérer dans le sur-risque pour l'homme potentiellement constitué par des souches induites. A ce stade, ce point n'a pas été investigué plus avant. Ce sur-risque, qui reste à quantifier, pourrait s'avérer d'autant plus effectif que la contamination alimentaire intervient relativement rapidement après induction. Elle pourrait surtout survenir chez un patient porteur de souches d'*E. coli* résistantes aux fluoroquinolones, et soumis à un traitement antibiotique. Mais il faut surtout considérer que l'expression accrue de la toxine Stx2 est probablement corrélée à une dissémination phagique supérieure, qui contribue à une augmentation de la proportion des souches STEC au sein de la population de coliformes. L'expression de toxine Stx2 ne constitue probablement ainsi qu'un indicateur d'un sur-risque possiblement encore supérieur pour l'homme.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons souhaité contribuer à une approche la plus intégrée possible de l'évaluation de la virulence d'un groupe majeur de pathogènes responsables d'infections potentiellement très sévères chez l'homme.

Dans ce contexte, nos résultats confortent le bien-fondé d'une approche associant la double caractérisation, génotypique et fonctionnelle, des facteurs de virulence éventuellement hébergés par de telles souches.

Les résultats de ce travail ouvrent divers axes de perspectives, dont deux peuvent être plus particulièrement discutés. L'un concerne la disponibilité des outils méthodologiques permettant d'évaluer le potentiel virulent des souches d'*E. coli* verotoxinogènes, l'autre relève de la diversité éco-pathologique de ce groupe de pathogènes, et donc de la réalité des risques de contamination humaine par des souches environnementales, en particulier bovines.

1. Au plan méthodologique, si les outils de détermination génétique sont largement diffusés et accessibles (amplification génique), ceux concernant l'expression génique le sont à l'évidence bien moins. Ainsi, sur la base du premier travail réalisé, de nombreuses perspectives d'extension méthodologique existent. Il pourrait s'agir en premier lieu de poursuivre la validation du test ProSpect ELISA à plus grande échelle et sur un panel de souches de différents serogroupes, associés ou non à des contextes pathologiques, chez l'animal comme chez l'homme. Cette approche devrait contribuer à mieux documenter le rôle que pourrait jouer ce test au sein de l'arsenal méthodologique de caractérisation des souches virulentes.

Egalement, d'autres approches envisagées (western blot, RT-PCR, protéomique) à la construction du projet de thèse pourraient être développées, dans cette même optique de conforter l'approche fonctionnelle de la virulence potentielle des souches.

2. S'agissant du deuxième point, et comme présenté dans la section bibliographique de ce manuscrit, les analyses phylogénétiques semblent distinguer plusieurs lignées d'*E. coli* O157:H7 aux caractéristiques éco-pathologiques distinctes, laissant présager que seulement une partie des souches bovines O157:H7 serait impliquée dans les pathologies humaines.

Ainsi, l'analyse et la prévention du danger pour l'homme représenté par ces pathogènes repose donc sur une approche éco-pathologique nécessairement globale, incluant une caractérisation aux plans phylogénétique (filiation et niche écologique), génétique (gènes de virulence) et fonctionnelle (expression et régulation). Ces aspects seraient à prendre en compte dans une mise en perspective de notre travail.

REFERENCES

1. (1987). "Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur 3^{ème} édition." Diagnosics Pasteur.
2. Aertsen, A., D. FASTER, et al. (2005). "Induction of Shiga toxin-converting prophage in Escherichia coli by high hydrostatic pressure." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1155-62.
3. Alam, M. J. and L. Zurek (2006). "Seasonal prevalence of Escherichia coli O157:H7 in beef cattle feces." J Food Prot **69**(12): 3018-20.
4. Amieva, M. R. (2005). "Important bacterial gastrointestinal pathogens in children: a pathogenesis perspective." Pediatr Clin North Am **52**(3): 749-77.
5. Andral, B., A. Aspan, et al. (2004). "PCR detection of virulence genes and molecular epidemiology of STEC O157 isolates from French abattoirs." Vet Rec **155**(12): 365-8.
6. Bauwens, L., W. De Meurichy, et al. (2000). "Isolation of Escherichia coli O157 from zoo animals." Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift **69**: 76-79.
7. Besser, T. E., D. D. Hancock, et al. (1997). "Duration of detection of fecal excretion of Escherichia coli O157:H7 in cattle." J Infect Dis **175**(3): 726-9.
8. Besser, T. E., N. Shaikh, et al. (2007). "Greater diversity of Shiga toxin-encoding bacteriophage insertion sites among Escherichia coli O157:H7 isolates from cattle than in those from humans." Appl Environ Microbiol **73**(3): 671-9.
9. Bettelheim, K. A., L. Beutin, et al. (2003). "Serotypes of Escherichia coli isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne, Australia." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **26**(1): 55-63.
10. Beutin, L., G. Krause, et al. (2004). "Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period." J Clin Microbiol **42**(3): 1099-108.
11. Blanco, M., J. E. Blanco, et al. (2004). "Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi)." J Clin Microbiol **42**(2): 645-51.
12. Blanco, M., N. L. Padola, et al. (2004). "Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing Escherichia coli isolated from cattle and beef products in Argentina." Int Microbiol **7**(4): 269-76.
13. Blanco, M., S. Schumacher, et al. (2005). "Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive Escherichia coli strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2)." BMC Microbiol **5**(1): 23.

14. Boerlin, P., S. A. McEwen, et al. (1999). "Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans." J Clin Microbiol **37**(3): 497-503.
15. Bonardi, S., E. Maggi, et al. (1999). "Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy." Vet Microbiol **67**(3): 203-11.
16. Bopp, C. A., K. D. Greene, et al. (1987). "Unusual verotoxin-producing *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis." J Clin Microbiol **25**(8): 1486-9.
17. Brown, N. F., M. E. Wickham, et al. (2006). "Crossing the line: selection and evolution of virulence traits." PLoS Pathog **2**(5): e42.
18. Brussow, H., C. Canchaya, et al. (2004). "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 560-602, table of contents.
19. Calderwood, S. B., F. Auclair, et al. (1987). "Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(13): 4364-8.
20. Calderwood, S. B. and J. J. Mekalanos (1987). "Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus." J Bacteriol **169**(10): 4759-64.
21. Callaway, T. R., R. C. Anderson, et al. (2004). "What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle?" J Anim Sci **82 E-Suppl**: E93-99.
22. Caprioli, A., S. Morabito, et al. (2005). "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission." Vet Res **36**(3): 289-311.
23. Caprioli, J., L. Peng, et al. (2005). "The hemolytic uremic syndromes." Curr Opin Crit Care **11**(5): 487-92.
24. Cattoir, V., P. Lesprit, et al. (2006). "In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid." J Antimicrob Chemother.
25. Cebula, T. A., W. L. Payne, et al. (1995). "Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR." J Clin Microbiol **33**(1): 248-50.
26. Chapman, P. A., C. A. Siddons, et al. (1997). "A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry." Epidemiol Infect **119**(2): 245-50.
27. Clarke, M. B. and V. Sperandio (2005). "Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract III. Cell-to-cell signaling among microbial flora, host, and pathogens: there is a whole lot of talking going on." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(6): G1105-9.

28. Cleary, T. G. (2004). "The role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome." Semin Pediatr Infect Dis **15**(4): 260-5.
29. Cobbold, R. and P. Desmarchelier (2000). "A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds." Vet Microbiol **71**(1-2): 125-37.
30. Cobbold, R. and P. Desmarchelier (2002). "Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves." Appl Environ Microbiol **68**(8): 4148-52.
31. Cobbold, R. N. and P. M. Desmarchelier (2004). "In vitro studies on the colonization of bovine colonic mucosa by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC)." Epidemiol Infect **132**(1): 87-94.
32. Cobbold, R. N., D. D. Hancock, et al. (2007). "Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and its association with supershedders and excretion dynamics." Appl Environ Microbiol **73**(5): 1563-8.
33. Cornelis, G. R. (2002). "Yersinia type III secretion: send in the effectors." J Cell Biol **158**(3): 401-8.
34. Cornelis, G. R. and F. Van Gijsegem (2000). "Assembly and function of type III secretory systems." Annu Rev Microbiol **54**: 735-74.
35. Cray, W. C., Jr. and H. W. Moon (1995). "Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7." Appl Environ Microbiol **61**(4): 1586-90.
36. Crump, J. A., A. C. Sulka, et al. (2002). "An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm." N Engl J Med **347**(8): 555-60.
37. de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski (2000). "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships." Infect Immun **68**(9): 4839-49.
38. Donohue-Rolfe, A., I. Kondova, et al. (2000). "*Escherichia coli* O157:H7 strains that express Shiga toxin (Stx) 2 alone are more neurotropic for gnotobiotic piglets than are isotypes producing only Stx1 or both Stx1 and Stx2." J Infect Dis **181**(5): 1825-9.
39. Dowd, S. E. and H. Ishizaki (2006). "Microarray based comparison of two *Escherichia coli* O157:H7 lineages." BMC Microbiol **6**: 30.
40. Doyle, M. P. and J. L. Schoeni (1987). "Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry." Appl Environ Microbiol **53**(10): 2394-6.
41. Dundas, S., W. T. Todd, et al. (2005). "Using antibiotics in suspected haemolytic-uraemic syndrome: antibiotics should not be used in *Escherichia coli* O157:H7 infection." Bmj **330**(7501): 1209; author reply 1209.
42. Durso, L. M., K. Reynolds, et al. (2005). "Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 Infections among Livestock Exhibitors and Visitors at a Texas County Fair." Vector Borne Zoonotic Dis **5**(2): 193-201.

43. Dytoc, M. T., A. Ismaili, et al. (1994). "Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21." Infect Immun **62**(8): 3494-505.
44. Endo, Y., K. Mitsui, et al. (1987). "The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins." J Biol Chem **262**(12): 5908-12.
45. Endo, Y., K. Tsurugi, et al. (1988). "Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins." Eur J Biochem **171**(1-2): 45-50.
46. Fairbrother, J. M. and E. Nadeau (2006). "*Escherichia coli*: on-farm contamination of animals." Rev Sci Tech **25**(2): 555-69.
47. Falla, T. J. and I. Chopra (1998). "Joint tolerance to beta-lactam and fluoroquinolone antibiotics in *Escherichia coli* results from overexpression of hipA." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3282-4.
48. Fitzhenry, R. J., D. J. Pickard, et al. (2002). "Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." Gut **50**(2): 180-5.
49. Franke, S., D. Harmsen, et al. (1995). "Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin." J Clin Microbiol **33**(12): 3174-8.
50. Frankel, G., A. D. Phillips, et al. (1998). "Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements." Mol Microbiol **30**(5): 911-21.
51. Fremaux, B., S. Raynaud, et al. (2006). "Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms." Vet Microbiol.
52. Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, et al. (2002). "*Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms." J Infect Dis **185**(1): 74-84.
53. Fuchs, S., I. Muhldorfer, et al. (1999). "Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens." Microb Pathog **27**(1): 13-23.
54. Fukushima, H., K. Hoshina, et al. (1999). "Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces." Appl Environ Microbiol **65**(11): 5177-81.
55. Gannon, V. P. and C. L. Gyles (1990). "Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease." Vet Microbiol **24**(1): 89-100.
56. Garau, J., M. Xercavins, et al. (1999). "Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2736-41.

57. Gough, J. M., L. L. Conlan, et al. (2006). "Screening of bacteria from the cattle gastrointestinal tract for inhibitory activity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, O111:H-, and O26:H11." J Food Prot **69**(12): 2843-50.
58. Grauke, L. J., I. T. Kudva, et al. (2002). "Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants." Appl Environ Microbiol **68**(5): 2269-77.
59. Grif, K., M. P. Dierich, et al. (1998). "Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **17**(11): 761-6.
60. Grotiuz, G., A. Sirok, et al. (2006). "Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea." J Clin Microbiol **44**(10): 3838-41.
61. Gyles, C. L. (2006). "Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview." J Anim Sci.
62. Hancock, D., T. Besser, et al. (2001). "The control of VTEC in the animal reservoir." Int J Food Microbiol **66**(1-2): 71-8.
63. Hancock, D. D., T. E. Besser, et al. (1997). "A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds." Epidemiol Infect **118**(2): 193-5.
64. Harmon, B. G., C. A. Brown, et al. (1999). "Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves." J Food Prot **62**(6): 574-9.
65. Heijnen, L. and G. Medema (2006). "Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR." J Water Health **4**(4): 487-98.
66. Heisig, P. (1996). "Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **40**(4): 879-85.
67. Hooper, D. C. (1999). "Mechanisms of fluoroquinolone resistance." Drug Resist Updat **2**(1): 38-55.
68. Hrudey, S. E., P. Payment, et al. (2003). "A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world." Water Sci Technol **47**(3): 7-14.
69. Huang, A., J. Friesen, et al. (1987). "Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-like toxin 1 in *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(9): 4308-12.
70. Hussein, H. S. (2006). "Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products." J Anim Sci.
71. Hussein, H. S. and L. M. Bollinger (2005). "Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle." J Food Prot **68**(10): 2224-41.

72. Hussein, H. S. and T. Sakuma (2005). "Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Dairy Cattle and Their Products." J Dairy Sci **88**(2): 450-65.
73. Hussein, H. S. and T. Sakuma (2005). "Shiga toxin-producing Escherichia coli: pre- and postharvest control measures to ensure safety of dairy cattle products." J Food Prot **68**(1): 199-207.
74. Ikeda, K., O. Ida, et al. (1999). "Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying Escherichia coli O157:H7 infection." Clin Nephrol **52**(6): 357-62.
75. Ishii, Y., S. Kimura, et al. (2005). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive Escherichia coli O26:H11: a new concern." J Clin Microbiol **43**(3): 1072-5.
76. Jacewicz, M., H. Clausen, et al. (1986). "Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide." J Exp Med **163**(6): 1391-404.
77. Jacob, M. E., J. T. Fox, et al. (2008). "Effects of dried distillers' grain on fecal prevalence and growth of Escherichia coli O157 in batch culture fermentations from cattle." Appl Environ Microbiol **74**(1): 38-43.
78. Jelacic, S., C. L. Wobbe, et al. (2002). "ABO and P1 blood group antigen expression and stx genotype and outcome of childhood Escherichia coli O157:H7 infections." J Infect Dis **185**(2): 214-9.
79. Jensen, C., P. Schiellerup, et al. (2005). "Antimicrobial treatment of asymptomatic carriers of verocytotoxin-producing Escherichia coli: an empiric study." Scand J Infect Dis **37**(1): 61-3.
80. Jothikumar, N., C. G. Reddy, et al. (2000). "Isolation of coliphages specific to enterotoxigenic E. coli (ETEC)." J Environ Monit **2**(4): 372-4.
81. Karch, H., H. Bohm, et al. (1993). "Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting Escherichia coli O157:H." J Clin Microbiol **31**(5): 1200-5.
82. Karch, H., H. Schmidt, et al. (1999). "Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages." Mol Gen Genet **262**(4-5): 600-7.
83. Kim, H. H., M. Samadpour, et al. (1994). "Characteristics of antibiotic-resistant Escherichia coli O157:H7 in Washington State, 1984-1991." J Infect Dis **170**(6): 1606-9.
84. Kim, J., J. Nietfeldt, et al. (1999). "Octamer-based genome scanning distinguishes a unique subpopulation of Escherichia coli O157:H7 strains in cattle." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13288-93.
85. Kimmitt, P. T., C. R. Harwood, et al. (1999). "Induction of type 2 Shiga toxin synthesis in Escherichia coli O157 by 4-quinolones." Lancet **353**(9164): 1588-9.

86. Kimmitt, P. T., C. R. Harwood, et al. (2000). "Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response." *Emerg Infect Dis* **6**(5): 458-65.
87. Kitov, P. I., J. M. Sadowska, et al. (2000). "Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands." *Nature* **403**(6770): 669-72.
88. Klapproth, J. M., M. S. Donnenberg, et al. (1995). "Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphocyte activation and lymphokine production." *Infect Immun* **63**(6): 2248-54.
89. Knutton, S., T. Baldwin, et al. (1989). "Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Infect Immun* **57**(4): 1290-8.
90. Kobayashi, H., J. Shimada, et al. (2001). "Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan." *Appl Environ Microbiol* **67**(1): 484-9.
91. Koch, C., S. Hertwig, et al. (2001). "Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the stx(1(OX3)) gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans." *J Clin Microbiol* **39**(11): 3992-8.
92. Kohler, B., H. Karch, et al. (2000). "Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains." *Microbiology* **146 (Pt 5)**: 1085-90.
93. Koitabashi, T., V. Vuddhakul, et al. (2006). "Genetic characterization of *Escherichia coli* O157: H7/- strains carrying the stx2 gene but not producing Shiga toxin 2." *Microbiol Immunol* **50**(2): 135-48.
94. Kokai-Kun, J. F., A. R. Melton-Celsa, et al. (2000). "Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d." *J Biol Chem* **275**(5): 3713-21.
95. Kozlov Yu, V., A. A. Kabishev, et al. (1988). "The primary structure of the operons coding for *Shigella dysenteriae* toxin and temperature phage H30 shiga-like toxin." *Gene* **67**(2): 213-21.
96. Lio, J. C. and W. J. Syu (2004). "Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *J Biomed Sci* **11**(6): 855-63.
97. Liu, W. C., C. Jenkins, et al. (2005). "Modelling the epidemiology of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups in young calves." *Epidemiol Infect* **133**(3): 449-58.
98. Liu, Y., A. Gilchrist, et al. (2008). "Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water." *Appl Environ Microbiol* **74**(5): 1502-7.

99. Louise, C. B. and T. G. Obrig (1995). "Specific interaction of Escherichia coli O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells." J Infect Dis **172**(5): 1397-401.
100. Low, A. S., N. Holden, et al. (2006). "Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7." Environ Microbiol **8**(6): 1033-47.
101. Luck, S. N., V. Bennett-Wood, et al. (2005). "Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic Escherichia coli." Infect Immun **73**(5): 3063-71.
102. Luo, Y., E. A. Frey, et al. (2000). "Crystal structure of enteropathogenic Escherichia coli intimin-receptor complex." Nature **405**(6790): 1073-7.
103. Machado, J., F. Grimont, et al. (1998). "Computer identification of Escherichia coli rRNA gene restriction patterns." Res Microbiol **149**(2): 119-35.
104. Matsushiro, A., K. Sato, et al. (1999). "Induction of prophages of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 with norfloxacin." J Bacteriol **181**(7): 2257-60.
105. Maurer, C., C. Lazizzera, et al. (2008). "Characterization of inducible stx2-positive Escherichia coli O157:H7/H7- strains isolated from cattle in France." J Appl Microbiol.
106. Mead, P. S., L. Slutsker, et al. (1999). "Food-related illness and death in the United States." Emerg Infect Dis **5**(5): 607-25.
107. Melton-Celsa, A. R., J. F. Kokai-Kun, et al. (2002). "Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A2 peptide in the context of the appropriate B pentamer." Mol Microbiol **43**(1): 207-15.
108. Moon, H. W., A. L. Baetz, et al. (1983). "Immunization of swine with heat-stable Escherichia coli enterotoxin coupled to a carrier protein does not protect suckling pigs against an Escherichia coli strain that produces heat-stable enterotoxin." Infect Immun **39**(2): 990-2.
109. Mora, A., J. E. Blanco, et al. (2005). "Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain." Res Microbiol.
110. Morabito, S., R. Tozzoli, et al. (2003). "A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of Escherichia coli O157:H7 is frequently present in attaching and effacing E. coli." Infect Immun **71**(6): 3343-8.
111. Morgan, D., C. P. Newman, et al. (1993). "Verotoxin producing Escherichia coli O 157 infections associated with the consumption of yoghurt." Epidemiol Infect **111**(2): 181-7.
112. Mundy, R., S. Schuller, et al. (2007). "Functional studies of intimin in vivo and ex vivo: implications for host specificity and tissue tropism." Microbiology **153**(Pt 4): 959-67.

113. Muniesa, M. and J. Jofre (1998). "Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene." Appl Environ Microbiol **64**(7): 2443-8.
114. Muniesa, M., J. Recktenwald, et al. (2000). "Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin." Infect Immun **68**(9): 4850-5.
115. Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **11**(1): 142-201.
116. Naylor, S. W., J. C. Low, et al. (2003). "Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host." Infect Immun **71**(3): 1505-12.
117. O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, et al. (1982). "Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*." J Infect Dis **146**(6): 763-9.
118. O'Brien, A. D., T. A. Lively, et al. (1983). "Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis." Lancet **2**(8349): 573.
119. O'Brien, A. D., L. R. Marques, et al. (1989). "Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933." Microb Pathog **6**(5): 381-90.
120. O'Brien, A. D., J. W. Newland, et al. (1984). "Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea." Science **226**(4675): 694-6.
121. Oethinger, M., I. Podglajen, et al. (1998). "Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 2089-94.
122. Ogden, I. D., M. MacRae, et al. (2004). "Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal?" FEMS Microbiol Lett **233**(2): 297-300.
123. Orth, D. and R. Wurzner (2006). "What makes an enterohemorrhagic *Escherichia coli*?" Clin Infect Dis **43**(9): 1168-9.
124. Ostroff, S. M., P. I. Tarr, et al. (1989). "Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections." J Infect Dis **160**(6): 994-8.
125. Ozeki, S., T. Deguchi, et al. (1997). "Development of a rapid assay for detecting *gyrA* mutations in *Escherichia coli* and determination of incidence of *gyrA* mutations in clinical strains isolated from patients with complicated urinary tract infections." J Clin Microbiol **35**(9): 2315-9.
126. Panos, G. Z., G. I. Betsi, et al. (2006). "Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection?" Aliment Pharmacol Ther **24**(5): 731-42.
127. Paton, A. W., T. Beddoe, et al. (2006). "AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP." Nature **443**(7111): 548-52.

128. Paton, A. W. and J. C. Paton (1996). "Enterobacter cloacae producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome." J Clin Microbiol **34**(2): 463-5.
129. Paton, A. W. and J. C. Paton (1998). "Detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO111, and rfbO157." J Clin Microbiol **36**(2): 598-602.
130. Paton, A. W., P. Srimanote, et al. (2001). "Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic Escherichia coli strains that are virulent for humans." Infect Immun **69**(11): 6999-7009.
131. Paton, A. W., M. C. Woodrow, et al. (1999). "Molecular characterization of a Shiga toxigenic Escherichia coli O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome." J Clin Microbiol **37**(10): 3357-61.
132. Perna, N. T., G. F. Mayhew, et al. (1998). "Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7." Infect Immun **66**(8): 3810-7.
133. Phillips, B., K. Tyerman, et al. (2005). "Use of antibiotics in suspected haemolytic-uraemic syndrome." Bmj **330**(7488): 409-10.
134. Pierard, D., G. Muyldermans, et al. (1998). "Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal Escherichia coli isolates." J Clin Microbiol **36**(11): 3317-22.
135. Pluschke, G. and M. Achtman (1984). "Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 Escherichia coli differs with O antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns." Infect Immun **43**(2): 684-92.
136. Pradel, N., Y. Bertin, et al. (2008). "Molecular analysis of shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France." Appl Environ Microbiol **74**(7): 2118-28.
137. Pruijboom-Brees, I. M., T. W. Morgan, et al. (2000). "Cattle lack vascular receptors for Escherichia coli O157:H7 Shiga toxins." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10325-9.
138. Rahn, K., S. A. Renwick, et al. (1997). "Persistence of Escherichia coli O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment." Epidemiol Infect **119**(2): 251-9.
139. Ramachandran, V., M. A. Hornitzky, et al. (2001). "The common ovine Shiga toxin 2-containing Escherichia coli serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type." J Clin Microbiol **39**(5): 1932-7.
140. Rasmussen, M. A., W. C. Cray, Jr., et al. (1993). "Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic Escherichia coli." FEMS Microbiol Lett **114**(1): 79-84.

141. Read, S. C., R. C. Clarke, et al. (1992). "Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources." Mol Cell Probes **6**(2): 153-61.
142. Reid, S. D., D. J. Betting, et al. (1999). "Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR." J Clin Microbiol **37**(8): 2719-22.
143. Reid, S. D., C. J. Herbelin, et al. (2000). "Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*." Nature **406**(6791): 64-7.
144. Riley, L. W., R. S. Remis, et al. (1983). "Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype." N Engl J Med **308**(12): 681-5.
145. Ritchie, J. M., P. L. Wagner, et al. (2003). "Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates." Appl Environ Microbiol **69**(2): 1059-66.
146. Roldgaard, B. B., F. Scheutz, et al. (2004). "VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute a minor part of VTEC O157 isolates from Danish cattle." Int J Med Microbiol **294**(4): 255-9.
147. Sanderson, M. W., T. E. Besser, et al. (1999). "Fecal *Escherichia coli* O157:H7 shedding patterns of orally inoculated calves." Vet Microbiol **69**(3): 199-205.
148. Schmidt, H. and M. Hensel (2004). "Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis." Clin Microbiol Rev **17**(1): 14-56.
149. Schmidt, H., M. Montag, et al. (1993). "Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples." Infect Immun **61**(2): 534-43.
150. Schmidt, H., J. Scheef, et al. (2000). "A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons." Appl Environ Microbiol **66**(3): 1205-8.
151. Schmidt, H., W. L. Zhang, et al. (2001). "Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*." Infect Immun **69**(11): 6863-73.
152. Senerwa, D., O. Olsvik, et al. (1989). "Colonization of neonates in a nursery ward with enteropathogenic *Escherichia coli* and correlation to the clinical histories of the children." J Clin Microbiol **27**(11): 2539-43.
153. Sheng, H., J. Y. Lim, et al. (2006). "Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa." Infect Immun **74**(8): 4685-93.
154. Shere, J. A., K. J. Bartlett, et al. (1998). "Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin." Appl Environ Microbiol **64**(4): 1390-9.
155. Smith, D., M. Blackford, et al. (2001). "Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen." J Food Prot **64**(12): 1899-903.

156. Stein, P. E., A. Boodhoo, et al. (1992). "Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*." Nature **355**(6362): 748-50.
157. Strauch, E., R. Lurz, et al. (2001). "Characterization of a Shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*." Infect Immun **69**(12): 7588-95.
158. Strockbine, N. A., M. P. Jackson, et al. (1988). "Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1." J Bacteriol **170**(3): 1116-22.
159. Su, C. and L. J. Brandt (1995). "Escherichia coli O157:H7 infection in humans." Ann Intern Med **123**(9): 698-714.
160. Swimm, A. I. and D. Kalman (2008). "Cytosolic extract induces Tir translocation and pedestals in EPEC-infected red blood cells." PLoS Pathog **4**(1): e4.
161. Synge, B. A., M. E. Chase-Topping, et al. (2003). "Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows." Epidemiol Infect **130**(2): 301-12.
162. Tarr, C. L. and T. S. Whittam (2002). "Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **184**(2): 479-87.
163. Tarr, P. I., M. A. Neill, et al. (1989). "Genotypic variation in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients in Washington, 1984-1987." J Infect Dis **159**(2): 344-7.
164. Teel, L. D., A. R. Melton-Celsa, et al. (2002). "One of two copies of the gene for the activatable shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage." Infect Immun **70**(8): 4282-91.
165. Trabulsi, L. R., R. Keller, et al. (2002). "Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*." Emerg Infect Dis **8**(5): 508-13.
166. Tran, J. H. and G. A. Jacoby (2002). "Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5638-42.
167. Tschape, H., R. Prager, et al. (1995). "Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source." Epidemiol Infect **114**(3): 441-50.
168. Van Donkersgoed, J., T. Graham, et al. (1999). "The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and salmonella in the feces and rumen of cattle at processing." Can Vet J **40**.
169. Varma, J. K., K. D. Greene, et al. (2003). "An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building." Jama **290**(20): 2709-12.
170. Vazquez-Laslop, N., H. Lee, et al. (2006). "Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins." J Bacteriol **188**(10): 3494-7.

171. Vila, J., J. Ruiz, et al. (1996). "Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of Escherichia coli." Antimicrob Agents Chemother **40**(2): 491-3.
172. Voigt, W., A. Fruth, et al. (2006). "Enterobacterial autoinducer of growth enhances shiga toxin production by enterohemorrhagic Escherichia coli." J Clin Microbiol **44**(6): 2247-9.
173. Wagner, P. L., M. N. Neely, et al. (2001). "Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic Escherichia coli strain." J Bacteriol **183**(6): 2081-5.
174. Waldor, M. K. and D. I. Friedman (2005). "Phage regulatory circuits and virulence gene expression." Curr Opin Microbiol **8**(4): 459-65.
175. Walterspiel, J. N., S. Ashkenazi, et al. (1992). "Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I." Infection **20**(1): 25-9.
176. Weinstein, D. L., M. P. Jackson, et al. (1988). "Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from Escherichia coli strain responsible for edema disease of swine." J Bacteriol **170**(9): 4223-30.
177. Widiasih, D. A., N. Ido, et al. (2004). "Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing Escherichia coli from naturally infected cattle." Epidemiol Infect **132**(1): 67-75.
178. Wong, C. S., S. Jelacic, et al. (2000). "The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of Escherichia coli O157:H7 infections." N Engl J Med **342**(26): 1930-6.
179. Yamamoto, T., S. Kojio, et al. (2003). "60Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing Escherichia coli induces Stx phage." FEMS Microbiol Lett **222**(1): 115-21.
180. Yoh, M., E. K. Frimpong, et al. (1999). "Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7." Can J Microbiol **45**(9): 732-9.
181. Yoon, J. W., J. Y. Lim, et al. (2005). "Involvement of the Escherichia coli O157:H7(pO157) ecf operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs." Infect Immun **73**(4): 2367-78.
182. Yoshida, H., M. Bogaki, et al. (1991). "Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of Escherichia coli." Antimicrob Agents Chemother **35**(8): 1647-50.
183. Yu, M. and D. B. Haslam (2005). "Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3." Infect Immun **73**(4): 2524-32.
184. Zhang, W., M. Bielaszewska, et al. (2005). "Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in Escherichia coli." Appl Environ Microbiol **71**(1): 558-61.

185. Zhang, W. L., B. Kohler, et al. (2002). "Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing Escherichia coli strains." J Clin Microbiol **40**(12): 4486-92.
186. Zhang, X., A. D. McDaniel, et al. (2000). "Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice." J Infect Dis **181**(2): 664-70.
187. Zhao, T., M. P. Doyle, et al. (1995). "Prevalence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in a survey of dairy herds." Appl Environ Microbiol **61**(4): 1290-3.

ANNEXES

Annexe 1 : Critères de compte rendu de cas d'infections à STEC chez l'homme (adapté de l'avis sur auto-saisine du 18 octobre 2007, EFSA)

Critères cliniques

Diarrhées à STEC

Toute personne ayant au moins un des symptômes suivants :

- Diarrhée
- Douleur abdominale

SHU

Toute personne avec une apparition soudaine des symptômes précédents, suivis par au moins 2 des 3 autres suivants :

- Anémie hémolytique
- Thrombocytopénie
- Insuffisance rénale

Critères de laboratoire

Au moins un des 2 suivants :

- Isolement d'un STEC des fèces
- Détection de gène(s) *stx1* ou *stx2* à partir des fèces

Uniquement pour les SHU :

Une réponse antigénique spécifique contre un sérotype d'*E. coli*

Si possible, l'isolement et la caractérisation supplémentaire du sérotype, type de phage, gènes *eae* et sous-types de *stx1/stx2*

Critères épidémiologiques

Au moins l'un des 5 liens épidémiologiques suivants :

- Transmission inter-humaine
- Exposition à une source commune
- Transmission de l'animal à l'homme
- Exposition à de la nourriture ou de l'eau de boisson contaminés
- Exposition environnementale

Informations complémentaires

Période d'incubation 2 à 10 jours, le plus souvent 3-4 jours

Classification de cas

A. Cas possible de SHU :

Toute personne remplissant les critères cliniques de SHU

B. Cas probable :

Toute personne remplissant les critères cliniques avec un lien épidémiologique

C. Cas confirmé :

Toute personne remplissant les critères cliniques et de laboratoire

Annexe 2 : Caractéristiques des 46 isolats HSVR et des 3 souches de référence

Origine	eae	ehly	Kat	H7	Sorbitol	Date d'arrivée	Prélèvement	Abattoir/dép. élevage	VT1	VT 2	CPE	PFGE
HSVR 3	+	+	+	+	-	03/08/1998	Environnement	Corbas	-	+	+	6
HSVR 4	+	+	+	+	-	17/08/1998	Oreille	Corbas dép73 CN	-	+	+	5
HSVR 7	+	+	+	+	-	05/10/1998	Oreille	Corbas dép23	-	+	+	6
HSVR 8	+	+	+	+	-	05/10/1998	Oreille	Corbas dép86 CN	-	+	+	6
HSVR 9	+	+	+	+	-	05/10/1998	Oreille	Corbas	-	+	+	6
HSVR 10	+	+	+	-	+	05/10/1998	Oreille	Corbas dép 23CN	-	+	-	8
HSVR 11	+	+	+	+	-	12/10/1998	Environnement	Corbas	-	+	+	3
HSVR 12	+	+	+	+	-	12/10/1998	Environnement	Corbas	-	+	+	3
HSVR 13	+	+	+	+	-	12/10/1998	Environnement	Corbas	-	+	+	3
HSVR 40	+	+	+	-	-	22/04/1999	Oreille	Socopa dép52	-	+	-	4
HSVR 63	+	+	+	+	-	27/09/1999	Environnement	Corbas	-	+	+	4
HSVR 73	+	+	+	+	-	22/04/1999	Oreille	Socopa dép71	-	+	+	4
HSVR 80	+	+	+	+	-	14/02/2000	Oreille	Corbas dép16	-	+	+	7
HSVR 81	+	+	+	+	-	14/02/2000	Oreille	Corbas dép16	-	+	+	7
HSVR 82				+	-	14/02/2000	Oreille	Corbas dép16	-	+	+	
HSVR 84	+	+	+	+	-	22/02/2000	Oreille	Corbas dép42	-	+	+	2
HSVR 85	+	+	+	+	-	22/02/2000	Oreille	Corbas dép16	-	+	+	
HSVR 86	+	+	+	+	-	22/02/2000	Oreille	Corbas dép03	-	+	+	
HSVR 87	+	+	+	+	-	22/02/2000	Oreille	Corbas dép71	-	+	+	
HSVR 89	+	+	+	+	-	22/02/2000	Oreille	Corbas dép03	-	+	+	2
HSVR 90	+	+	+	+	-	22/02/2000	Oreille	Corbas dép16	-	+	+	2
HSVR 91	+	+	+	+	-	11/04/2000	Environnement	Tarare dép38	-	+	+	2
HSVR 99	+	+	+	+	-	11/04/2000	Environnement	Tarare	-	+	+	5
HSVR 100				-	+	16/05/2000	Oreille	Tarare dép 71	-	-	+	
HSVR 105	+	+	+	+	-	05/06/2000	Oreille	Corbas dép 16	-	+	+	4
HSVR 114	+	+	+	+	-	17/10/2000	Oreille	Tarare dép 23	-	+	+	4
HSVR 116	+	+	+	+	-	20/11/2000	Oreille	Corbas dép 87	-	+	+	5
HSVR 117	+	+	+	+	-	20/11/2000	Oreille	Corbas dép 16	-	+	+	1
HSVR 118	+	+	+	+	-	20/11/2000	Oreille	Corbas dép 36	-	+	+	1
HSVR 119	+	+	+	+	-	11/27/2000	Oreille	16	-	+	+	1
HSVR 120	+	+	+	+	-	27/11/2000	Oreille	Corbas dép 16	-	+	-	7
HSVR 121	+	+	+	+	-	27/11/2000	Oreille	Corbas dép 87	-	+	+	5
HSVR 122	+	+	+	+	-	27/11/2000	Oreille	corbas dép 23	-	+	-	7
HSVR 123	+	+	+	+	-	27/11/2000	Oreille	Corbas dép 23	-	+	-	7
HSVR 124	+	+	+	+	-	27/11/2000	Oreille	Corbas dép 23	-	+	+	1
HSVR 125	+	+	+	+	-	27/11/2000	Oreille	Corbas dép 16	-	+	-	7
HSVR 126	+	+	+	+	-	27/11/2000	Oreille	Corbas dép 16	-	+	-	7
HSVR 134				+	-	03/04/2001	Oreille	Corbas dép 87	-	+	+	
HSVR 135				+	-	03/04/2001	Oreille	Corbas dép 24	-	+	+	
HSVR 137				+	-	03/04/2001	Oreille	Corbas dép 23	-	+	+	
HSVR 138				+	-	03/04/2001	Oreille	Corbas dép 23	-	-	+	
HSVR 139				+	-	03/04/2001	Oreille	Corbas dép 23	-	+	+	
HSVR 140				+	-	03/04/2001	Oreille	Corbas dép 69	-	+	+	
HSVR 148	+	+		+		9/19/2002	Fèces	57	-	+		
HSVR 149	+	+		+		9/19/2002	Fèces	57	-	+		
HSVR 150	+	+		+		9/23/2002	Fèces	49	-	+		
ATCC 43888							Selles humain		-	-		
ATCC 43889							Selles patient		-	+		
ATCC 43895							Hamburger cru		+	+		

Annexe 3 : Schéma de dépôt des disques d'antibiotiques pour les antibiogrammes

Pour la boîte carrée n°1 :

AMX	TIC	PIP	FEP
CF	AMC	CAZ	TZP
FOX	CXM	TCC	ATM
XNL	CEQ	CTX	IMP

Pour la boîte carrée n°2 :

K	TM C	GM	APR
S	AN	NET	TE
CS	C	FFC	NA
ENR	OFX	TMP	SSS

Liste des antibiotiques :

Amoxicilline (Amx), Ticarcilline (Tic), Piperacilline (Pip), Céfépime (FEP), Céfaloine (CF), Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC), Ceftazidime (CAZ), Piperacilline + Tazobactam (TZP), Céfoxitine (FOX), Céfuroxime (CXM), Ticarcilline + acide clavulanique (TCC), Aztréonam (ATM), Ceftiofur (XNL), Cefquinome (CEQ), Céfotaxime (CTX), Imipénème (IPM), Kanamycine (K), Tobramycine (TM), Gentamicine (GM), Apramycine (APR), Streptomycine (S), Amikacine (AN), Nétilmicine (NET), Tétracycline (TE) Chloramphénicol (C), Florfénicol (FFC) (disques Schering-Plough), , Colistine (CS), A. nalidixique (NA), Enrofloxacin (ENR), Ofloxacin (OFX), Triméthoprime (TMP) Sulfamides (SSS).

Annexe 4 : Amorces PCR

Gène cible	Amorces	Séquence des amorces	Amplicon (bp)	Programme PCR	Référence
<i>stx</i> commun	ES149 ES151	CgAAATCCCCTCTgTATTTgCC gAgCgAAATAATTTATATgT	323	94°C 4 min 94°C 30 s 49°C 40 s X 40 72°C 30 s 72°C 7 min	(Read, Clarke et al. 1992)
<i>stx 1</i>	LP30 LP31	CAGTTAATgTggTggCgAAgg CACCAgACAATgTAACCGCTg	348	94°C 3 min 94°C 30 s 64°C 30 s X 30 72°C 30 s 72°C 5 min	(Cebula, Payne et al. 1995)
<i>stx 2</i>	LP43 LP44	ATCCTATTCCGgggAgTTTACg gCgTCATCgTATACACAggAgC	584	94°C 3 min 94°C 30 s 64°C 30 s X 30 72°C 30 s 72°C 5 min	(Cebula, Payne et al. 1995)
<i>eae</i>	B52 B53	AggCTTCgTCACAgTTg CCATCgTCACCAgAggA	570	94°C 3 min 94°C 1.5 min 55°C 1.5 min X 30 72°C 1.5 min 72°C 5 min	(Reid, Betting et al. 1999)
<i>ehx</i>	EHXF EHXR	gCATCATCAAgCgTACgTTCC AATgAgCCAAGCTggTTAAgCT	534	95°C 5 min 95°C 1 min 60°C 2 min X 35 72°C 2.5 min 72°C 7 min	(Paton and Paton 1998)
<i>uidA</i>	PT2 PT3	gCgAAAAGTgTggAATTggg TgATgCTCCATCACTTCCTg	252	94°C 3 min 94°C 30 s 60°C 40 s X 30 72°C 30 s 72°C 5 min	(Cebula, Payne et al. 1995)

Annexe 5 : Gamme de dilution d'acide nalidixique et d'enrofloxacin **pour milieu liquide**

Gamme de dilution pour l'enrofloxacin

Etapas de sélection	Concentration par tube de culture (2,3 ml final)	Quantité par tube (2 ml) et concentration de la dilution/ml	Dilution/solution mère à 1500 µg/ml	Pour 13.5 ml de dilution	
				Volume de solution mère d'enrofloxacin	Volume d'H ₂ O ultra-pure +1% NaOH
1 ^{ère}	0,087 µg/ml	2 µg	1/750	18 µl	13,5 ml
2 ^{ème}	0,43 µg/ml	10 µg	1/150	90 µl	13,4 ml
3 ^{ème}	0,87 µg/ml	20 µg	1/75	180 µl	13,3 ml
4 ^{ème}	4,3 µg/ml	100 µg	1/15	900 µl	12,6 ml
5 ^{ème}	8,7 µg/ml	200 µg	2/15	1,8 ml	11,7 ml
6 ^{ème}	21,7 µg/ml	500 µg	1/3	4,5 ml	9 ml
7 ^{ème}	43,5 µg/ml	1000 µg	2/3	9 ml	5,5 ml
8 ^{ème}	65,2 µg/ml	1500 µg	1	(76,53 mg)	50 ml

Gamme de dilution pour l'acide nalidixique

Etapas de sélection	Concentration par tube de culture (2,3 ml ou 11.5 ml final)	Quantité par tube (2 ml) et concentration de la dilution/ml	Dilution/solution mère à 1500 µg/ml	Pour 13.5 ml de dilution	
				Volume de solution mère d'acide nalidixique	Volume d'H ₂ O ultra-pure +1% NaOH
1 ^{ère}	0,1 µg/ml	2,3 µg	1/750	18 µl	13,5 ml
2 ^{ème}	0,5 µg/ml	11,5 µg	1/150	90 µl	13,4 ml
3 ^{ème}	1 µg/ml	23 µg	1/75	180 µl	13,3 ml
4 ^{ème}	5 µg/ml	115 µg	1/15	900 µl	12,6 ml
5 ^{ème}	10 µg/ml	230 µg	2/15	1,8 ml	11,7 ml
6 ^{ème}	25 µg/ml	575 µg	1/3	4,5 ml	9 ml
7 ^{ème}	50 µg/ml	1150 µg	2/3	9 ml	4,5 ml
8 ^{ème}	75 µg/ml	1725 µg	1	(88 mg)	50 ml

Annexe 6 : Gamme de dilution d'acide nalidixique et d'enrofloxacin **pour milieu solide**

Gamme de dilution pour l'enrofloxacin

Etapas de sélection	Concentration par boîte à chaque étape de sélection	Quantité par tube (2 ml) et concentration de la dilution/ml	Dilution/solution mère à 2 mg/ml	Pour 13,5 ml de dilution (13 boîtes)	
				Volume de solution mère d'enrofloxacin	Volume d'H ₂ O ultra-pure +1% NaOH
1 ^{ère}	0,05 µg/ml	1 µg	1/2000	3,5 µl	13,5 ml
2 ^{ème}	0,1 µg/ml	2 µg	1/1000	6,8 µl	13,5 ml
3 ^{ème}	0,5 µg/ml	10 µg	1/200	34 µl	13,5 ml
4 ^{ème}	1 µg/ml	20 µg	1/100	68 µl	13,4 ml
5 ^{ème}	5 µg/ml	100 µg	1/20	338 µl	13,2 ml
6 ^{ème}	10 µg/ml	200 µg	1/10	675 µl	12,8 ml
7 ^{ème}	25 µg/ml	500 µg	¼	3,375 ml	10,1 ml
8 ^{ème}	50 µg/ml	1000 µg	½	6,75 ml	6,75 ml
9 ^{ème}	75 µg/ml	1500 µg	¾	10,125 ml	3,4 ml
10 ^{ème}	100 µg/ml	2000 µg	1	(102,04 mg)	50 ml

Gamme de dilution pour l'acide nalidixique

Etapas de sélection	Concentration par boîte à chaque étape de sélection	Quantité par tube (2 ml) et concentration de la dilution/ml	Dilution/solution mère à 20 mg/ml	Pour 13,5 ml de dilution (13 boîtes)	
				Volume de solution mère d'acide nalidixique	Volume d'H ₂ O ultra-pure +1% NaOH
1 ^{ère}	5 µg/ml	0,1 mg	1/200	67,5 µl	13,43 ml
2 ^{ème}	10 µg/ml	0,2 mg	1/100	135 µl	13,36 ml
3 ^{ème}	50 µg/ml	1 mg	1/20	675 µl	12,83 ml
4 ^{ème}	100 µg/ml	2 mg	1/10	1,35 ml	13,3 ml
5 ^{ème}	200 µg/ml	4 mg	1/5	2,7 ml	10,8 ml
6 ^{ème}	500 µg/ml	10 mg	½	6,75 ml	7,75 ml
7 ^{ème}	750 µg/ml	15 mg	¾	10,125 ml	3,375 ml
8 ^{ème}	1000 µg/ml	20 mg	1	(1010,1 mg)	50 ml

LISTE DES ABREVIATIONS

A/E	<u>A</u> ttachement/ <u>E</u> ffacement
BHI	" <u>B</u> rain <u>H</u> eart <u>I</u> nfusion"
bp	" <u>B</u> ase <u>P</u> air"
BPI	" <u>B</u> actéricidal <u>P</u> ermeability <u>I</u> ncreasing protein"
CMI	<u>C</u> oncentration <u>M</u> inimale <u>I</u> nhibitrice
CS	" <u>C</u> oli <u>S</u> urface antigen"
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
EAEC	<i>E. coli</i> entéroaggrégatives
ECDC	" <u>E</u> uropean <u>C</u> enter for <u>D</u> isease prevention and <u>C</u> ontrol"
EFSA	" <u>E</u> uropean <u>F</u> ood <u>S</u> afety <u>A</u> uthority"
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasives
ELISA	" <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay"
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogéniques
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes
FAS	" <u>F</u> luorescent <u>A</u> ctin <u>S</u> taining"
GB3	Globotriosylcéramide
GB4	Globotetraosylcéramide
GEA	<u>G</u> astro- <u>E</u> ntérite <u>A</u> iguë
IMS	" <u>I</u> mmuno- <u>M</u> agnetic <u>S</u> eparation"
LPS	" <u>L</u> ipo <u>P</u> oly <u>S</u> accharide"
MarA	" <u>M</u> ultiply <u>A</u> ntibiotic- <u>R</u> esistant" A
MGE	" <u>M</u> obile <u>G</u> enetic <u>E</u> lement"
Morons	"more DNA"
MUG	4-MethylUmbelliferyl-b-D-Glucuronide
NASBA	" <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid <u>S</u> equence- <u>B</u> ased <u>A</u> mplification"
PAI	" <u>P</u> athogenic <u>I</u> sland"
PFGE	"Pulsed Field Gel Electrophoresis"
QRDR	" <u>Q</u> inolone <u>R</u> esistance <u>D</u> etermining <u>R</u> egion"
QS	<i>Quorum Sensing</i>
STEC	" <u>S</u> higa <u>T</u> oxin producing <i>E. Coli</i> "
RPLA	" <u>R</u> eversed <u>P</u> assive <u>L</u> atex <u>A</u> gglutination"

RT-qPCR	" <u>R</u> ea <u>l</u> <u>T</u> ime <u>q</u> uantitative <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction"
SMAC	" <u>S</u> orbitol <u>M</u> ac <u>C</u> onkey"
SNC	<u>S</u> ystème <u>N</u> erveux <u>C</u> entral
Stx	" <u>S</u> higa like <u>T</u> o <u>X</u> ins"
Tir	" <u>T</u> ranslocated <u>I</u> ntimin <u>R</u> eceptor"
TTSS	"Type Three Secretory System"
TSB	" <u>T</u> rypticase <u>S</u> oja <u>B</u> roth"
UFC	<u>U</u> nité <u>F</u> ormant <u>C</u> olonie
VFA	" <u>V</u> olatile <u>F</u> atty <u>A</u> cids"
WB	" <u>W</u> estern <u>B</u> lot"