



HAL
open science

Escherichia coli entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques : contamination des effluents d'origine bovine

Maryse Michèle Um

► **To cite this version:**

Maryse Michèle Um. Escherichia coli entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques : contamination des effluents d'origine bovine. Science des productions animales. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. ⟨NNT : 2016TOU30161⟩. ⟨tel-01581202⟩

HAL Id: tel-01581202

<https://theses.hal.science/tel-01581202v1>

Submitted on 4 Sep 2017

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.



HAL Authorization



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Maryse Michèle UM

le vendredi 4 novembre 2016

Titre :

Escherichia coli entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques :
contamination des effluents d'origine bovine

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Microbiologie

Unité de recherche :

Institut de Recherche en Santé Digestive – UMR INSERM 1220/INRA 1416/ENVT/UPS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Professeur Hubert BRUGERE

Docteur Delphine BIBBAL

Jury :

Professeure Christine ROQUES, Université Paul Sabatier Toulouse
(Présidente du jury)

Docteur Isabelle KEMPF, ANSES Ploufragan (Rapporteur)

Docteur Evelyne FORANO, INRA Clermont-Ferrand (Rapporteur)

Docteur Jean-Yves MADEC, ANSES Lyon (Examineur)

Docteur Delphine BIBBAL, ENV de Toulouse (Examineur)

Professeur Hubert BRUGERE, ENV de Toulouse (Examineur)

Je remercie :

Les membres du jury,

Pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Pr. Hubert BRUGERE,

Pour son soutien et son encadrement sans failles.

Dr. Delphine BIBBAL,

Pour son encadrement et ses conseils.

Pr. Eric OSWALD,

Pour sa présence et ses bonnes idées pour faire avancer la science.

Monique KEROUREDAN,

Pour son aide dans les expérimentations et procédures administratives.

L'ensemble de l'équipe 2 de l'IRSD,

Pour leur présence, nos aventures et nos liens.

Mes proches,

Pour leur soutien indéfectible et leur présence.

Les obstacles, les embuches, la paresse intellectuelle, la haine, la méchanceté gratuite, l'ignorance, la bêtise, la pollution mentale...

Ils m'ont fait découvrir des potentialités insoupçonnées.

PREAMBULE

Ce travail a fait l'objet à la date du 14/11/2016

 *Des publications suivantes:*

I-/ “Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health”

Maryse Michèle Um, Olivier Barraud, Monique Kérouédan, Margaux Gaschet, Thibault Stalder, Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, Hubert Brugère, Delphine Bibbal.
Water Research, 2016 Jan 1, **88**:30-8. Epub 2015 Sep 28.

 *Des 4 communications orales suivantes :*



I-/ « *Escherichia coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons isolées d'effluents d'abattoirs bovins »

Um Maryse Michèle, Bibbal Delphine, Kérouédan Monique, Stalder Thibault, Barraud Olivier, Casellas Magali, Gaschet Margaux, Oswald Eric, Dagot Christophe, Ploy Marie-Cécile, Brugère Hubert.

Communication effectuée lors du 10ème Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM).

A l'Institut Pasteur de Paris, du 31 Mars au 1^{er} Avril 2014



II-/ « *Escherichia coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons isolées d'effluents d'abattoirs bovins »

Um Maryse Michèle, Bibbal Delphine, Kérouédan Monique, Stalder Thibault, Barraud Olivier, Casellas Magali, Gaschet Margaux, Oswald Eric, Dagot Christophe, Ploy Marie-Cécile, Brugère Hubert

Communication effectuée lors du 6^{ème} Colloque International Francophone de Microbiologie Animale (CIFMA).

A l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) du 15 au 16 Mai 2014



III-/ « **Antimicrobial resistance and carriage of integrons in *Escherichia coli* strains isolated in wastewater of cattle slaughterhouses in France** »

Um Maryse Michèle, Bibbal Delphine, Kérourédan Monique, Oswald Eric, Brugère Hubert.

Communication effectuée lors du 6th International Water and Health seminar for PhD Students.

A Cannes du 16 au 18 Juin 2014

Cette communication orale a fait l'objet d'un prix du comité scientifique appelé « Water and Health Award »



PRICE OF SCIENTIFIC COMMITTEE AS BRINGING THE BEST CONTRIBUTION TO THE ADVANCEMENT OF WATER SAFETY.



(Prix SUEZ pour la meilleure contribution à l'avancée de la sécurité de l'eau)



IV-/ « **Antibiorésistance comparée d'*Escherichia coli* productrices ou non de shigatoxines** »

Communication effectuée lors du 12^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM)

A l'Institut Pasteur de Paris du 21 au 23 Mars 2016.

Les résumés soumis pour ces communications orales sont présentés dans les chapitres 7 et 8.

 *Des posters suivants:*



I-/ “Antimicrobial resistance and carriage of integrons in *Escherichia coli* strains isolated from wastewater of cattle slaughterhouses in France”

Maryse Michèle Um, Delphine Bibbal, Monique Kérouédan, Thibault Stalder, Olivier Barraud, Magalie Casellas, Margaux Gaschet, , Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, Hubert Brugère.

Poster présenté lors du congrès « 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE) » à Ghent (Belgique) du 30 Juin au 3 Juillet 2013.

II-/ **FOOD MICRO 2014** “Prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* and quantification of integrons in bovine wastewater slaughterhouse effluents”

Maryse Michèle Um, Delphine Bibbal, Monique Kérouédan, Thibault Stalder, Olivier Barraud, Magalie Casellas, Margaux Gaschet, , Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, **Hubert Brugère**.

Présenté lors du congrès « 24th International Committee on Food Microbiology and Hygiene conference (Food Micro) » à Nantes du 1 au 4 Septembre 2014.

3rd International symposium on the environmental dimension of antibiotic resistance
17 May - 21 May 2015 - Wernigerode, Germany



III-/ “Antimicrobial resistance and integron carriage in *Escherichia coli* strains isolated from cattle slaughterhouse effluents”

Maryse Michèle Um, Olivier Barraud, Monique Kérouédan, Margaux Gaschet, Thibault Stalder, Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, Hubert Brugère, Delphine Bibbal.

Poster présenté lors du congrès « 3rd International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance (EDAR 3) » à Wernigerode (Allemagne) du 17 au 21 Mai 2015.

Pour la présentation de ce poster, j'ai obtenu une bourse de la « Federation of European Microbiological Societies » :



Bourse de la fédération des sociétés européennes de Microbiologie (FEMS) obtenue le 10 Avril 2015 pour présenter mes travaux de recherche à l'EDAR 3.



IV-/ **“Antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes**

O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28 isolated from slaughtered adult cattle in France”

Maryse Michèle Um, Monique Kérourédan, Estelle Loukiadis, Frederic Auvray, Eric Oswald, Hubert Brugère, **Delphine Bibbal.**

Présenté lors du congrès « 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE) » à Tours du 29 Juin au 1 Juillet 2015

V-/ **“Antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28 isolated from cattle slaughtered in France”**

Maryse Michèle Um, Delphine Bibbal, Monique Kérourédan, Estelle Loukiadis, Frederic Auvray, Eric Oswald, **Hubert Brugère.**

Présenté lors du congrès « 61st International Congress of Meat Science and Technology (iCOMST) » à Clermont-Ferrand du 23 au 28 Août 2015.



VI-/ **“Antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28 isolated from cattle slaughtered in France”**

Delphine Bibbal, Maryse Michèle Um, Monique Kérourédan, Estelle Loukiadis, Frederic Auvray, Eric Oswald, Hubert Brugère.

Présenté lors du congrès « 9th Triennial International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* (VTEC) meeting » à Boston (Etats-Unis) du 13 au 16 Septembre 2015.

Les posters sont présentés dans les Chapitres 7 et 8

Table des matières

PREAMBULE.....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	13
FIGURES	13
TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES.....	17
INTRODUCTION.....	21
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
PARTIE I. DONNEES GENERALES SUR LES <i>E.coli</i> ENTEROHEMORRAGIQUES ET/OU RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES.....	27
Chapitre 1. LES <i>E. COLI</i> ENTEROHEMORRAGIQUES	27
1.1 Définition des EHEC.....	27
1.2 Facteurs de virulence des EHEC	30
1.2.1 Les shigatoxines	30
1.2.2 Le Locus d'attachement et d'effacement (LEE).....	35
1.2.3 Le plasmide de virulence des EHEC	38
1.2.4 Facteurs d'adhésion autres que ceux codés par le LEE.....	41
1.3 Infections humaines liées aux EHEC	43
1.3.1 Physiopathologie des infections liées aux EHEC.....	43
1.3.2 Signes cliniques des infections liées aux EHEC	43
1.3.3 Traitement des infections liées aux EHEC.....	45
1.4 Epidémiologie des infections humaines liées aux EHEC.....	47
1.4.1 Epidémiologie descriptive	47
1.4.2. Epidémiologie analytique.....	49
1.5 Détection des EHEC.....	52
1.5.1 Méthodologie de la détection des EHEC.....	52
1.5.2 Détection des STEC hautement pathogènes par la méthode ISO 13136:2012.....	55
Chapitre 2. LES <i>E. COLI</i> RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES	59
2.1 Définition et détermination de la résistance aux antibiotiques.....	59
2.1.1 Résistance naturelle aux antibiotiques.....	59
2.1.2 Résistance acquise aux antibiotiques.....	60
2.2 Origine génétique de la résistance acquise	60
2.2.1 Les mutations chromosomiques	61
2.2.2 Les gènes de résistance.....	61
2.3 Les éléments génétiques mobiles	66
2.3.1 Les intégrons mobiles ou de résistance	68
2.3.2 Les transposons de résistance.....	73
2.3.3 Les plasmides de résistance.....	75

2.4 Lien entre les intégrons et la résistance phénotypique chez <i>E. coli</i>	76
Chapitre 3. LIEN VIRULENCE-RESISTANCE PHENOTYPIQUE.....	79
3.1 Problématique du lien virulence-résistance chez les souches d' <i>E. coli</i> pathogènes.....	79
3.2 Incidence des souches STEC antibiorésistantes	80
3.3 Mécanismes de l'association virulence-résistance chez les EHEC	82
PARTIE II. VOIES DE CONTAMINATION DE L'HOMME ET ROLE DES EFFLUENTS	
D'ORIGINE BOVINE	85
Chapitre 4. VOIES DE CONTAMINATION DE L'HOMME PAR DES EHEC ET/OU <i>E. COLI</i>	
ANTIBIORESISTANTES : ROLE DE L'ENVIRONNEMENT	85
4.1 L'environnement, lieu de Transfert Horizontal de Gènes de résistance (THG) : problème de santé publique.....	86
4.2 Dissémination d' <i>E. coli</i> antibiorésistantes et porteuses d'intégrons dans l'environnement : problème de santé publique	87
4.3 Dissémination des EHEC dans l'environnement : problème de santé publique.....	88
Chapitre 5. LES EFFLUENTS D'ORIGINE BOVINE : SOURCES D'EHEC ET/OU <i>E. COLI</i>	
RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES.....	91
5.1 Nature des effluents d'origine bovine et charge bactérienne	91
5.1.1 Nature des effluents d'origine bovine	91
5.1.2 Charge bactérienne des effluents d'origine bovine	92
5.2 Les fèces de bovins prélevés à l'abattoir : source d' <i>E. coli</i> résistantes et porteuses d'intégrons	93
5.2.1 Les <i>E. coli</i> résistantes dans les fèces de bovins	93
5.2.2 Les STEC résistantes dans les fèces de bovins.....	94
5.2.3 Les <i>E. coli</i> porteuses d'intégrons dans les fèces de bovins et effluents d'élevage	94
5.3 Les effluents d'abattoirs de bovins : source d' <i>E. coli</i> entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes, et d' <i>E. coli</i> porteuses d'intégrons.	95
5.3.1 Les <i>E. coli</i> entérohémorragiques et/ou résistantes dans les effluents d'abattoirs et impact des traitements épuratoires	95
5.3.2 Les <i>E. coli</i> antibiorésistantes dans les effluents d'abattoirs et impact des traitements épuratoires	96
5.3.3 Les <i>E. coli</i> porteuses d'intégrons dans les effluents d'abattoirs et impact des traitements épuratoires	97
ETUDE EXPERIMENTALE.....	99
Chapitre 6. OBJECTIFS DE LA THESE.....	101
Chapitre 7. ETUDE 1. La comparaison de l'incidence des souches d' <i>E. coli</i> pathogènes et/ou résistantes isolées dans des effluents d'abattoirs de bovins montrent des risques différents pour la santé publique.....	107
7.1 MATERIELS ET METHODES	107
7.1.1 Les stations d'épuration des eaux usées d'abattoir et prélèvements.....	107
7.1.2 Dénombrement et isolement des <i>E. coli</i>	110
7.1.3 Isolement des STEC du top 5 après enrichissement.....	110

7.1.4	Détection et caractérisation des isolats d' <i>E. coli</i> positives pour les gènes <i>stx</i> et <i>eae</i>	111
7.1.5	Détection et caractérisation des isolats d' <i>E. coli</i> antibiorésistantes	113
7.1.6	Détection et caractérisation des isolats d' <i>E. coli</i> porteuses d'intégrons et caractérisation des régions variables d'intégron	114
7.1.7	Phylotypage des isolats d' <i>E. coli</i>	114
7.1.8	Analyses statistiques.....	114
7.2	RESULTATS	115
7.2.1	Impact du traitement épuratoire sur les populations d' <i>E. coli</i>	115
7.2.2	Composition génétique des populations d' <i>E. coli</i>	117
7.2.3	Caractéristiques des isolats d' <i>E. coli</i> positifs pour les gènes <i>stx</i> et <i>eae</i>	119
7.2.4	Caractéristiques des isolats d' <i>E. coli</i> antibiorésistants et positifs pour <i>intI</i>	121
7.3	DISCUSSION	125
7.3.1	Impact du traitement épuratoire sur les populations d' <i>E. coli</i>	125
7.3.2	Dissémination des souches d' <i>E. coli</i> pathogènes	126
7.3.3	Dissémination de souches d' <i>E. coli</i> antibiorésistantes	127
7.3.4	Co-occurrence du gène <i>intI1</i> et du phénotype MDR.....	128
7.4	VALORISATION DES RESULTATS OBTENUS.....	129
7.4.1	Publication n°1	129
7.4.2	Communications orales	140
7.4.2.1	Communication n°1.....	140
7.4.2.2	Communication n°2.....	142
7.4.2.3	Communication n°3.....	144
7.4.3	Poster n°1	146
Chapitre 8. ETUDE 2. Etude comparative des profils d'antibiorésistance de souches d' <i>E. coli</i> productrices de shigatoxines et entéropathogènes de sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, et O145:H28 <i>versus</i> des <i>E. coli</i> ne possédant pas les caractéristiques des EHEC du top 5 (non-STEC et aEPEC du top 5) isolées de fèces de bovins adultes.		
8.1	MATERIELS ET METHODES	153
8.1.1	Collections de STEC et aEPEC du top 5 et <i>E. coli</i> ne possédant pas les caractéristiques des STEC et aEPEC du top 5 (non-STEC et aEPEC du top 5).....	153
8.1.2	Détection et caractérisation des isolats d' <i>E. coli</i> antibiorésistantes et des gènes d'antibiorésistance.....	155
8.1.3	Phylotypage des isolats d' <i>E. coli</i>	155
8.1.4	Expression des gènes <i>stx</i> : mise en évidence par le test de cytotoxicité sur des cellules Vero en culture	156
8.1.5	Expression phénotypique du gène <i>eae</i> codé par le LEE : mise en évidence de l'adhésion par le test FAS sur des cellules HeLa en culture	157
8.1.6	Procédures de transformation	157
8.2	RESULTATS	158
8.2.1	Résistance et caractéristiques des souches STEC et aEPEC du top 5.	158

8.2.2	Résistance et caractéristiques des <i>E. coli</i> non-STEC et aEPEC du top 5	162
8.2.3	Test de cytotoxicité et test FAS pour les souches STEC du top 5 résistantes et sensibles.	164
8.2.4	Localisation des gènes de résistance chez les souches STEC	167
8.3	DISCUSSION	171
8.4	VALORISATION DES RESULTATS OBTENUS.....	175
8.4.1	Communication orale n°1	175
8.4.2	Poster n°1 et n°2.....	177
8.4.3	Poster n°3	179
Chapitre 9.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	180
9.1	Effluents de station d'épuration d'abattoirs de bovins adultes et de veaux : vecteurs d' <i>E. coli</i> entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes.....	180
9.2	Résistance des souches STEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes à l'abattoir et comparaison avec les <i>E. coli</i> non-STEC et aEPEC du top 5 isolées chez les mêmes bovins	185
ANNEXE DE LA PARTIE 7.1	Démarche expérimentale pour la caractérisation phénotypique et génotypique des <i>E. coli</i> antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de résistance	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	(Total de références=446).....	192
RESUME.....		217
SUMMARY		217

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1. Diagramme de Venn illustrant le système de classification des EHEC/STEC et AEEC.....	28
Figure 2. Mode d'action des shigatoxines.....	32
Figure 3. Structure du LEE d' <i>E. coli</i> O157:H7.....	36
Figure 4. Test FAS.	37
Figure 5. Carte d'un plasmide de virulence d'une EHEC O157:H7 (pO157).	39
Figure 6. Nombre de cas de SHU de 1996 à 2014 et incidence annuelle pour 100 000 enfants <15 ans en France (A) et les sérotypes les plus impliqués en 2014 (B).....	48
Figure 7. Mécanismes moléculaires et EGM impliqués dans la dissémination de gènes d'antibiorésistance.	67
Figure 8. Organisation générale d'un intégron.	69
Figure 9. Représentation graphique d'un intégron de classe 1.	71
Figure 10. Schéma d'un Tn21 impliqué dans la mobilisation des IMs1.....	71
Figure 11. Représentation d'un transposon complexe de résistance Tn3.	74
Figure 12. Carte du transposon Tn21 porté en copies identiques par le plasmide de virulence des EHEC pO26-CRL ₁₁₁ et les plasmides de résistance pO26-CRL ₁₂₅ et pO111-CRL ₁₁₅	75
Figure 13. Relations épidémiologiques et voies de transmission des <i>E. coli</i> entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes des bovins à l'homme.	86
Figure 14. Circuits de dissémination des <i>E. coli</i> antibiorésistantes et intégrons dans l'environnement à partir de diverses sources.	88
Figure 15. Origine des effluents d'abattoir et d'élevage, et flux d' <i>E. coli</i> dans ces effluents.....	92
Figure 16. Quelle est la fréquence des <i>E. coli</i> entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes dans les effluents et boues de stations d'épuration d'abattoir de bovins adultes et d'abattoir de veaux?.....	103
Figure 17. Quelle est la résistance des souches STEC, des aEPEC et des <i>E. coli</i> ne possédant pas les caractéristiques de STEC et aEPEC du top 5 (non-STEC et aEPEC du top 5), isolées de fèces de bovins adultes à l'abattoir?	105
Figure 18. Points de prélèvement au niveau des STEPs d'abattoirs utilisant le procédé conventionnel de boues activées.	108
Figure 19. Démarche expérimentale pour le criblage en pool des gènes stx et eae au niveau de la collection des 3 182 isolats d' <i>E. coli</i> obtenus sans enrichissement.	112
Figure 20. Distribution des phylogroupes pour les 160 <i>E. coli</i> isolées dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes (A) et de veaux (B).....	118
Figure 21. Distribution des phylogroupes pour les 160 <i>E. coli</i> isolées dans la STEP d'abattoir de veaux.	118

Figure 22. Pourcentages d' <i>E. coli</i> antibiorésistantes isolées de STEPs d'abattoirs de bovins adultes (bandes vides) et de veaux (bandes pleines).....	122
Figure 23. Nombre de souches STEC et aEPEC du top 5 testées par sérotype.....	159
Figure 24. Activité cytotoxique des souches STEC du top 5 résistantes (A) et sensibles (B) sur les cellules Vero.....	165
Figure 25. Test FAS des souches STEC du top 5 (O103:H2, <i>stx</i> _{1a} , <i>eae-ε</i>) L24-O103-1 antibiorésistante et K146-O103-1 sensible sur des cellules HeLa.....	166
Figure 26. Profils des plasmides extraits par la méthode de Kado et Liu.	170
Figure 27. Incidence du nombre d' <i>E. coli</i> viables (CFU/ml ou CFU/g), pourcentages d' <i>E. coli</i> résistantes à au moins un antibiotique (%R _{≥1} Atb), résistantes à plus de 3 classes d'antibiotiques (%MDR) et porteuses d'intégon de classe 1 (% <i>intI1</i>) dans les deux stations d'épuration d'abattoirs de bovins étudiées.	180
Figure 28. Résistance des souches STEC et aEPEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes à l'abattoir, comparaison de leur résistance avec les <i>E. coli</i> ne possédant pas les caractéristiques des STEC et aEPEC du top 5 (non-STECS et aEPEC du top 5) et localisation des gènes majoritaires de résistance sur le plasmide de virulence des EHEC.....	186
Figure 29. Schéma détaillé du site d'insertion du transposon Tn21 dérivant du locus complexe de gènes d'antibiorésistance (CRL) du pO26-CRL ₁₁₁	188

TABLEAUX

Tableau 1. Les 5 EHEC typiques majeures et leurs marqueurs génétiques associés.	29
Tableau 2. Toxicité des souches positives pour Stx1 et Stx2.	33
Tableau 3. Mécanismes de résistance acquise décrits chez <i>E. coli</i>	63
Tableau 4. Principales classes d'intégrons de résistance (IM) et intérêt épidémiologique.	72
Tableau 5. Gènes de résistance transférables présents chez des <i>E. coli</i> isolées chez l'homme et chez l'animal.	85
Tableau 6. Caractéristiques des effluents d'abattoirs de bovins adultes et de veaux au moment de l'échantillonnage	109
Tableau 7. Dénombrements d' <i>E. coli</i> et pourcentages d'isolats d' <i>E. coli</i> positives pour <i>stx</i> et <i>eae</i> dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes et de veaux.	116
Tableau 8. Pourcentages d' <i>E. coli</i> antibiorésistantes, positives pour <i>int11</i> , <i>int12</i> dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes et veaux.	116
Tableau 9. Caractéristiques des <i>E. coli</i> positives pour les gènes <i>stx</i> et <i>eae</i> isolées dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes et de veaux	120
Tableau 10. Fréquence des gènes d'antibiorésistance (ARGs) chez les <i>E. coli</i> isolées de STEPs d'abattoirs de bovins adultes et veaux.	123
Tableau 11. Phénotype de résistance et réseau de cassettes de gènes des <i>E. coli</i> isolées dans la STEP d'abattoir de veaux	124
Tableau 12. Nombre des STEC et aEPEC étudiées par sérotype	154
Tableau 13. Profils d'antibiorésistance des STEC et aEPEC du top 5, fréquence des <i>E. coli</i> ne possédant pas les caractéristiques des STEC et aEPEC du top 5 (non-STEC et aEPEC du top 5) isolées des mêmes bovins porteurs.	160
Tableau 14. Distribution des phylogroupes des souches STEC et aEPEC du top 5 et <i>E. coli</i> non-STEC et aEPEC du top 5	161
Tableau 15. Caractéristiques des <i>E. coli</i> positives pour les marqueurs génétiques associés aux EHEC	163
Tableau 16. Nombre des STEC et aEPEC étudiées par sérotype et nombre de souches positives pour le gène <i>ehxA</i>	168
Tableau 17. Résultat des expérimentations de transformation avec l'ADN plasmidique extrait des souches STEC du top 5 résistantes.	169

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

A/E : attachement/effacement	<i>cdt</i> : gène codant pour la cyclomoduline Cdt (« <i>cytholethal distening toxin</i> »)
AA : adhérence agrégative (« <i>aggregative adherence</i> »)	CEF : céphalothine
AAC : acétyltransferases	CHL : chloramphénicol
AAD : adényltransferases	CHO : (« <i>chinese hamster ovary cell</i> »)
AAF : fimbriae d'adhésion agrégative (« <i>aggregative adherence fimbriae</i> »)	CIP : ciprofloxacine
ADEME : agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie	CLSI : (« <i>clinical and laboratory standards institute</i> »)
ADN : acide désoxyribonucléique	CMI : concentration minimale inhibitrice
AEEC : <i>E. coli</i> attachante/effaçante (« <i>attaching/effacing E. coli</i> »)	CMY : résistance médiée par une céphalomycine
aEPEC : <i>E. coli</i> entéropathogènes atypiques (« <i>atypical enteropathogenic E. coli</i> »)	CNR: centre national de référence
Afa : adhésine afimbriale (« <i>afimbrial adhesin</i> »)	CRL : locus complexe de gènes d'antibiorésistance (« <i>complex antibiotic-resistance gene locus</i> »)
AFSSA : agence française de sécurité sanitaire des aliments	CR-SMAC : Céfixime Rhamnolipide Sorbitol MacConkey Agar
AMC : amoxicilline plus acide clavulanique	CS : séquences constantes= région conservée (« <i>conserved region</i> »)
AMP : ampicilline	CT-RMAC : Céfixime tellurite-MacConkey-Rhamnose
ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	CT-SMAC: Céfixime tellurite-sorbitol MacConkey Agar
ANT : nucléotidyltransferases	CTX : céfotaxime
APH : phosphotransférases	CTX-M : « <i>bêta-lactamase active on cefotaxime</i> »
ARGs : gènes d'antibiorésistance (« <i>antibioresistant genes</i> »)	CXM : Céfuroxime
ARNr : acide ribonucléique ribosomique	DA : adhérence diffuse (« <i>diffuse adherence</i> »)
<i>bfp</i> : gène codant pour les <i>pili</i> Bfp (« <i>bundle-forming pili</i> »)	DAEC : <i>E. coli</i> d'adhésion diffuse (« <i>diffusely adherent E. coli</i> »)
BLSE : bêta-lactamase à Spectre Elargi	DBO : demande biologique en oxygène
C3G : céphalosporines de troisième génération	DBO5 : demande biologique en oxygène sur 5 jours
C4G : céphalosporines de quatrième génération	DCO : demande chimique en oxygène
CA-SFM/EUCAST : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie/ (« <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> »)	DMEM : « <i>dulbecco's minimum essential medium containing non-essential amino acids</i> »
CAZ : ceftazidime	<i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i>
CDC : centre pour le contrôle et la prévention des maladies (« <i>U.S. centers for disease control and prevention</i> »)	<i>eae</i> : gène codant pour l'intimine
	EAEC : = EA _g EC, <i>E. coli</i> entéro-agrégatifs (« <i>enteroaggregative E. coli</i> »)
	EAF : facteur d'adhésion des EPEC (« <i>E. coli adherence factor</i> »)

ECDC : centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (« *European Centre for Disease Prevention and Control* »)

ecf : gène codant le fragment conservé *eae*

Efa : facteur d'adhésion des EHEC (« *EHEC factor for adherence* »)

EFSA : autorité européenne de sécurité des aliments (« *European Food Safety Authority* »)

EFTA : association européenne du libre-échange

EGM : élément génétique mobile

EHEC : *E. coli* entérohémorragique (« *enterohemorrhagic E. coli* »)

ehx : gène codant pour l'entérohémolysine des EHEC

EIEC : *E. coli* entéroinvasifs (« *enteroinvasive E. coli* »)

ELISA : dosage immuno-enzymatique (antigène ou anticorps) sur support solide (« *enzyme-linked immunosorbent assay* »)

ENVT : école nationale vétérinaire de toulouse

EPEC : *E. coli* entéropathogènes (« *enteropathogenic E. coli* »)

esc : gène codant pour le système de sécrétion de type III chez les EPEC (initialement appelé *sep* «*secretion of EPEC proteins*»)

esp : gène codant pour les protéines Esp (« *EPEC secreted protein* »)

espP : gène codant pour la sérine protéase *espP*

ETEC: *E. coli* entérotoxigéniques (« *Enterotoxigenic E. coli* »)

etp : gène codant pour l'appareil du système de sécrétion de type II

ExPEC : *E. coli* pathogènes extra-intestinales (« *extraintestinal pathogenic E. coli* »)

FAS : coloration fluorescente de l'actine (« *fluorescent actin staining* »)

FDA : administration en charge du médicament et des aliments (« *U.S. food and drug administration* »).

FEP : céfépime

FQL : fluoroquinolone

FWD : (« *Food-and Waterborne Diseases and Zoonoses* »)

Gb3 : globotrioolysylcéramide

Gb4 : globotétraosylcéramide

GCs : cassettes de gènes (« *gene cassette* »)

GEN : gentamicine

HeLa : cellules tumorales du col utérin d'Henrietta Lacks

IMS : immuno-séparation magnétique (« *immunomagnetic separation* »)

IMs : intégrons mobiles ou intégrons de résistance

INRA : institut national de la recherche agronomique

intI : = *int*, gène d'intégrase

InVS : institut national de veille sanitaire

IRSD : institut de santé digestive

IS : séquence d'insertion (« *insertion sequence* »)

ISCR : (« *atypical class of insertion sequences with common regions* »)

KAN : kanamycine

katP : gènes codant pour la catalase-peroxydase

KatP

kb : =kpb, kilo paire de base

LB : milieu luria bertani

LEE : *locus* d'effacement des entérocytes (« *locus of enterocyte effacement* »)

LEX : cefalexine

lifA : gène codant pour le facteur LifA (« *lymphocyte inhibitory factor A* »)

Lpf : « *long polar fimbriae* »

LPS : lipopolysaccharide

MAC : gélose MacConkey Agar

MAT : microangiopathie thrombotique

MDR : phénotype de résistance à plus de 3 classes d'antibiotiques (« *multidrug resistant* »)

MEM : milieu minimum de Eagle (« *minimum Eagle's medium* »)

MES : matières en suspension

MET : méthyltransférases

MH : gélose mueller-hinton
MLEE : (« *multi-locus enzyme electrophoresis* »)
MLST : (« *multi-locus sequence typing* »)
mTSB : bouillon tryptone soja modifié
NAL : acide nalidixique
ND : non déterminé
Nle : effecteur du système de sécrétion de type III non codé par le LEE (« *non LEE-encoded effector* »)
NM : souche non mobile
NT : non typable
NTEC : *E. coli* nécrotoxigènes (« *Enterotoxigenic E. coli* »)
OI : « *O Island* »
ORF : cadre ouvert de lecture (« *open reading frame* »)
orfX : gène codant pour une protéine de fonction inconnue
OXA : β-lactamase, (« *active on oxacillin* »)
PAI : îlot de pathogénicité (« *pathogenicity island* »)
pb : paire de base
PBRT : (« *pcr-based replicon typing* »)
Pc : promoteur de cassettes dans les intégrons
PCR : (« *polymerase chain reaction* »)
per : gène codant pour le régulateur Per (« *plasmid-encoded regulator* »)
PFGE : électrophorèse en champ pulse (« *pulsed-field gel electrophoresis* »)
PLP : protéines de liaison à la pénicilline
PSE : β-lactamase, (« *Pseudomonas-specific enzyme* »)
PTT : purpura thrombotique et thrombocytopénique
REG : reticulum endoplasmique
RMAC : gélose MacConkey-Rhamose
RT : (« *replicon type* »)
RTX : famille de toxines, (« *repeats in toxin* »)
saa : gène codant pour la protéine Saa (« *STEC autoagglutinating adhesin* »)
SEC : substances extractibles au chloroforme

Sfp : adhésine fimbriaire des EHEC O157 fermentant le sorbitol (« *sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae* »)
SHU : syndrome hémolytique et urémique
SMAC : gélose Sorbitol MacConkey Agar
stcE : gène codant pour la zinc metalloprotéase StcE
STEC : *E. coli* productrices de shigatoxines (« *Shiga-toxin producing E. coli* »)
STEP : Station d'épuration des eaux usées
STR : Streptomycine
stx : gènes codant pour les Stx
Stx : Shigatoxine= vérotoxine =vérocytotoxine
SVF : sérum de veau foetal
T3SS : système de sécrétion de type III
TAE : Tris, Acétate, EDTA
Taq polymérase : enzyme isolée chez *Thermus aquaticus*
TEM : β-lactamase, temoneira
TET : tétracycline
THG : transfert horizontal de gènes
Tir : récepteur de l'intimine (« *translocated intimin receptor* »)
TMP : triméthoprim
Tn : transposon
tnpA : gène codant pour la transposase et tnpR code pour une recombinase site-spécifique
toxB : gène codant pour l'adhésine putative ToxB
TSS : solides en suspension totaux
TTSS: système de sécrétion de type III (« *type three secretion system* »)
UFC : unité formant colonie
UMR : unité mixte de recherche
USDA : (« *U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service* »)
Vero : (= (« *Verda Reno* ») ou cellules épithéliales rénales d'une espèce de singe africain
VIDAS-ICE : (« *VIDAS Immuno-concentration E. coli* »)

INTRODUCTION

Dans le cadre de ma thèse, j'ai été accueillie dans l'équipe 2 : « Pathogénie et commensalisme des entérobactéries » de l'Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD), UMR INSERM 1220/ INRA 1416/ ENVT/ Université Toulouse 3, dirigée par le Professeur Eric Oswald. Au sein de cette équipe, un axe de recherche est consacré à l'épidémiologie des souches pathogènes pour l'homme et/ou résistantes aux antibiotiques. J'ai réalisé ma thèse dans cet axe, sous la direction du Professeur Hubert Brugère et la codirection du Docteur Delphine Bibbal ; tous les deux enseignants chercheurs au département d'Hygiène et Industrie des Aliments de l'ENVT. Le sujet de ma thèse était : **l'étude des *Escherichia coli* entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques: contamination des effluents d'origine bovine.**

Les *E. coli* sont une espèce bactérienne majoritairement commensale mais elles peuvent aussi être pathogènes. Parmi les *E. coli* pathogènes intractables, les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de colite hémorragique et de syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'homme. Les principaux réservoirs de ces souches sont les bovins.

Les bovins peuvent également héberger des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques.

Ces souches d'*E. coli* pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques peuvent être transmises à l'homme soit par contact direct avec les bovins, soit indirectement *via* l'ingestion d'aliments d'origine bovine crus ou insuffisamment cuits, mais aussi à travers l'environnement.

D'où l'importance de considérer dans une logique d'une seule santé (« *One Health* »), que la présence d'EHEC et de l'antibiorésistance dans les environnements impactés par les bovins représente un enjeu majeur de santé.

Dans la cadre de ma thèse, nous nous sommes focalisés sur la contamination des effluents d'origine bovine à l'origine de la dissémination environnementale des *E. coli* pathogènes et/ou porteuses de résistance. En effet, cette dissémination survient par 2 voies : soit à travers les effluents d'élevage (fèces, lisier, fumier) qui sont épandus sur les parcours agricoles, soit par les effluents et boues de stations d'épuration (STEPS) d'abattoirs qui sont rejetés ou épandus dans les milieux récepteurs à la sortie des STEPs.

L'objectif de ce travail de thèse était de **préciser la contamination des effluents d'origine bovine par des souches d'*E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes**. Il s'est déroulé en deux parties.

La première partie de ma thèse s'inscrivait dans le cadre de l'étude « Défi viande », financée par l'ANR, où avec deux autres équipes de recherche (l'UMR IMSERM 1092 et l'EA4330 GRESE de l'Université de Limoges), l'équipe « Pathogénie et commensalisme des entérobactéries » a participé à l'évaluation des impacts environnementaux des effluents de la filière viande bovine et notamment l'évaluation de l'antibiorésistance en tant qu'impact sanitaire majeur.

L'étude consacrée à cette 1^{ère} partie consistait à évaluer la fréquence des souches d'*E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes dans les effluents de station d'épuration des eaux usées (STEPs) de deux abattoirs, l'un où étaient abattus uniquement des bovins adultes et l'autre uniquement des veaux de boucherie. Ces deux stations d'épuration utilisaient un traitement épuratoire à base de boues activées.

Les objectifs de cette étude étaient :

- d'évaluer le risque de dissémination dans l'environnement des *E. coli* antibiorésistantes, porteuses d'intégrons et pathogènes par les effluents liquides et boues d'abattoirs des deux catégories d'abattoirs de bovins;
- et d'évaluer l'impact du traitement épuratoire sur ces souches.

La deuxième partie de ma thèse a été consacrée à l'étude de la résistance de souches *E. coli* potentiellement pathogènes isolées de fèces de bovins. Ces souches avaient été préalablement isolées au cours d'une étude visant à évaluer la prévalence de bovins porteurs d'*E. coli* productrices de shigatoxines appartenant aux cinq sérotypes majeurs O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 dans quatre catégories de bovins adultes abattus en France et dont les viandes peuvent être utilisées pour la fabrication de steaks hachés.

Il s'agissait de mieux caractériser la résistance des souches STEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes dans des abattoirs français.

Les objectifs de cette étude étaient :

- de réaliser une étude comparative entre les profils de résistance des souches STEC du top 5 (O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7) *versus* des *E. coli* ne présentant aucune caractéristique des EHEC du top 5 isolées chez les mêmes bovins;

- et de vérifier chez les STEC résistantes, l'hypothèse de la localisation des gènes de résistance aux antibiotiques sur le plasmide de virulence des EHEC.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I. DONNEES GENERALES SUR LES *E.coli* ENTEROHEMORRAGIQUES ET/OU RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES

Chapitre 1. LES *E. COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES

1.1 Définition des EHEC

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des souches pathogènes responsables de maladies graves chez l'homme telles que la colite hémorragique ou le Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU). Les souches EHEC possèdent toutes le gène *stx*, codant pour les shigatoxines. Ces shigatoxines sont capables d'induire des lésions de l'endothélium vasculaire intestinal, rénal et cérébral (O'Loughlin and Robins-Browne, 2001). L'ensemble des souches qui possèdent le gène *stx* sont des *E. coli* productrices de shigatoxines (STEC) (Figure 1).

Les EHEC typiques possèdent un îlot de pathogénicité appelé « Locus of Enterocyte Effacement » (LEE), qui regroupe des gènes codant pour l'ensemble des protéines responsables des lésions A/E dans le côlon et la partie distale de l'iléon (McDaniel et al., 1995). L'ensemble des souches possédant le LEE (le gène marqueur est *eae*) est regroupé sous le terme d'« Attaching and Effacing *E. coli* » (AEEC).

Les EHEC dites « atypiques » sont des STEC qui ne possèdent pas le gène *eae* et ne produisent donc pas de lésions A/E (Nataro and Kaper, 1998). Pour ces souches, l'adhésion au niveau du tube digestif de l'hôte se produit par d'autres mécanismes d'adhésion que par attachement et effacement (ANSES, 2010).

C'est le cas pour la souche épidémique entéroaggrégative et entérohémorragique *E. coli* de sérotype O104:H4 (3 816 cas de gastroentérite incluant 54 morts, 845 SHU en 2011), qui produisait une shigatoxine mais était négative pour le gène *eae*. Il s'agissait d'une souche hybride dont le « progéniteur » était une *E. coli* O104:H4 possédant un fond génétique des *E. coli* entéroaggrégatives (les EAEC sont AAF/III+). Elle avait perdu le plasmide AAF/III de la souche progénitrice et acquis un autre plasmide qui codait pour l'adhésion aux cellules épithéliales *via* le fimbriae de l'adhésion agrégative de type I (AAF/I) (Frank et al., 2011; Mellmann et al., 2011).

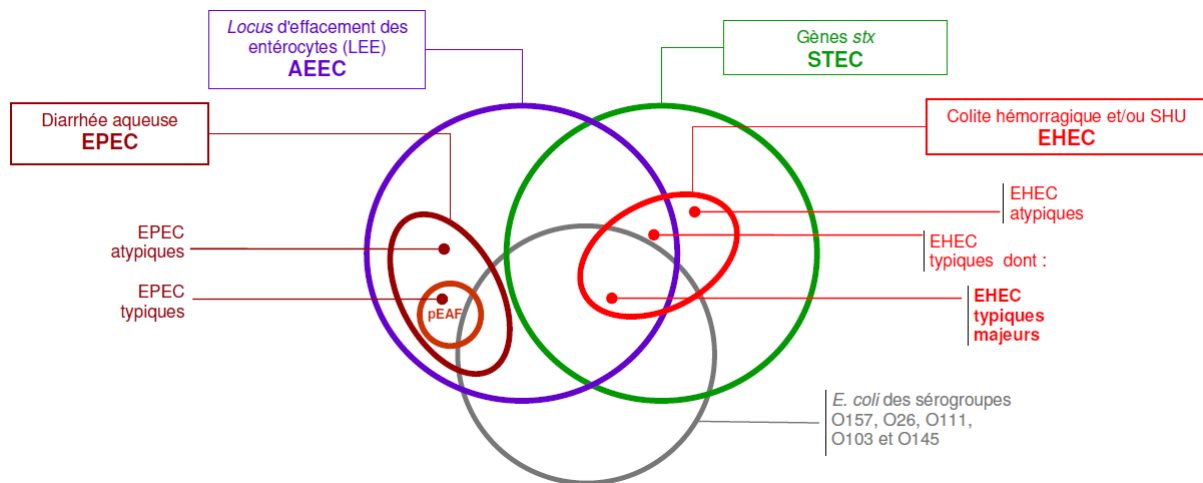


Figure 1. Diagramme de Venn illustrant le système de classification des EHEC/STEC et AEEC. De (Naylor et al., 2005; ANSES, 2010).

Le terme EHEC est à réserver aux souches qui ont été isolées chez des patients atteints de colite hémorragique et/ou de SHU. Toutes les souches STEC, qu'elles soient isolées de fèces de bovins, d'aliments ou de l'environnement ne sont pas nécessairement pathogènes pour l'homme. La difficulté est d'identifier quelle souche STEC pourrait être responsable de maladie chez l'homme. Plusieurs facteurs peuvent rentrer en jeu : la grande plasticité génomique des *E. coli*, les statuts sanitaires des individus, et la grande variabilité des symptômes allant des formes sévères d'une colite hémorragique et/ou SHU à des cas de diarrhée légère ou un portage asymptomatique.

Une définition précise des caractéristiques et du fond génétique des STEC qui pourrait causer des symptômes sévères, légers, ou alors l'absence de signes cliniques s'avère donc difficile (Caprioli et al., 2014). Cette définition est pourtant essentielle à établir pour identifier des souches d'*E. coli* dans les aliments ou dans l'environnement qui seraient potentiellement pathogènes pour l'homme.

L'étude de Karmali et ses collaborateurs fut la première à présenter un système cohérent de classification des STEC pathogènes. Ce système définit l'assignation des STEC isolées de patients ou de réservoirs animaux en cinq « séropathotypes », sur la base de : (i) l'incidence relative des sérotypes dans les infections humaines, (ii) la fréquence de leur implication dans des épidémies, et (iii) leur association à une maladie sévère.

En France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a identifié cinq EHEC appartenant à 5 sérotypes principalement impliqués dans les épidémies et infections humaines. Elles sont appelées « EHEC du top 5 » ou « EHEC

typiques majeures ». Les cinq sérotypes sont les suivants : O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 (AFSSA, 2008; ANSES, 2010) (Tableau 1). Toutes ces souches sont positives pour les gènes *stx* et *eae*. Plus spécifiquement, les sérotypes O157:H7 et O145:H28 sont connus pour être associés au sous-type *eae*- γ 1 et les sérotypes O26:H11, O103:H2 et O111:H8 respectivement aux sous-types *eae*- β 1, *eae*- ϵ et *eae*- θ . Enfin, ces souches sont également positives pour les marqueurs génétiques associés à l'îlot de pathogénicité OI-122 (AFSSA, 2008; ANSES, 2010).

Tableau 1. Les 5 EHEC typiques majeures et leurs marqueurs génétiques associés.

5 EHEC typiques majeures (« EHEC du top 5 »)	Marqueurs génétiques associés aux 5 EHEC typiques majeures
EHEC O157:H7	<i>rfbE</i> _{O157} , <i>flic</i> _{H7} , <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> , <i>eae</i> - γ , (OI-122)
EHEC O26:H11	<i>wzx</i> _{O26} , <i>flic</i> _{H11} , <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> , <i>eae</i> - β , (OI-122)
EHEC O145:H28	<i>ihp1</i> _{O145} , <i>flic</i> _{H28} , <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> , <i>eae</i> - γ , (OI-122)
EHEC O103:H2	<i>wzx</i> _{O103} , <i>flic</i> _{H2} , <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> , <i>eae</i> - ϵ , (OI-122)
EHEC O111:H8	<i>wbd1</i> _{O111} , <i>flic</i> _{H8} , <i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i> , <i>eae</i> - θ , (OI-122)

Selon l'AFSSA (AFSSA, 2008), lorsque des STEC possédant les mêmes caractéristiques que les EHEC du top 5 sont détectées dans la chaîne alimentaire, en dehors d'un contexte clinique chez l'homme, on parle de « STEC du top 5 ». Les STEC du top 5 sont donc considérées comme « hautement pathogènes ».

Lorsque des *E. coli* possédant les caractéristiques d'une EHEC typique (*stx1* et/ou *stx2*, *eae*) sont détectées dans la chaîne alimentaire, elles sont considérées comme « pathogènes » pour l'homme (ANSES, 2010).

Aux Etats-Unis, les EHEC de sérotype O121 et O45 sont également fréquemment impliquées dans des cas graves de toxi-infections alimentaires dues aux STEC. Par conséquent, la surveillance des STEC de sérogroupes O121 et O45 a été incluse en plus des STEC du top 5 dans le programme de surveillance des STEC le long de la chaîne alimentaire (USDA, 2012).

Conclusion 1. 1 : Définition des EHEC et intérêt pour la partie expérimentale

*Les EHEC qui sont un sous-type de STEC, sont responsables de symptômes graves chez l'homme. L'ANSES a défini 5 EHEC majeures comme étant les plus impliquées dans les infections à EHEC en France. Ce sont des STEC positives pour les gènes *stx*, *eae*, et appartenant aux sérotypes : O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28. Par conséquent, leur détection dans la chaîne alimentaire ou dans l'environnement conduit à les*

considérer comme des « STEC du top 5 » et comme hautement pathogènes pour l'homme. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes donc concentrés sur la recherche des STEC du top 5.

1.2 Facteurs de virulence des EHEC

1.2.1 Les shigatoxines

Les shigatoxines (Stxs) sont les facteurs de virulence essentiels des EHEC. Les shigatoxines appartiennent au groupe des toxines protéiques bactériennes AB5 composées de deux sous-unités. Elles ont pour cibles les cellules endothéliales du côlon, des reins et du cerveau chez l'homme. Les différences de toxicité *in vitro* et *in vivo*, de leurs séquences en acides aminés ou des séquences nucléotidiques des gènes *stx*, permettent de distinguer deux grands types de Stx : Stx1 et Stx2.

Elles sont produites principalement par les *E. coli* isolées de sources humaines et non-humaines, par *Shigella dysenteriae* type 1, et sporadiquement par *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Shigella flexneri*.

1.2.1.1 Détection de la production de shigatoxines

La production de shigatoxines est la condition nécessaire pour l'apparition de SHU chez l'homme. La méthode de référence pour la détection de la production des toxines Stxs est le test de cytotoxicité sur cellules Vero (Verda Reno ou cellules épithéliales rénales de singe africain). Les cellules Vero ont l'avantage de posséder les récepteurs pour tous les sous-types de Stxs (Gb3 et Gb4) (Paton and Paton, 1998b). Les toxines Stx sont également nommées vérotoxines, en raison de leur effet cytotoxique sur les cellules Vero.

Le principe de ce test est de mettre en interaction un surnageant de bouillon de culture de STEC (additionné d'un promoteur de production de shigatoxines) avec une couche de cellules Vero en culture. La toxicité sur cellules Vero est observée au microscope ou mesurée au lecteur d'absorbance après l'interaction de 72 h à 37°C. C'est un test démontré comme sensible (Rahn et al., 1996) mais, il demeure chronophage et coûteux pour une utilisation en routine.

1.2.1.2 Support génétique des shigatoxines

Les gènes des sous unités composant Stx sont codés par un opéron présent sur le génome d'un phage lysogénique appelé « lambda phage ou phage-Stx ». Le phage-Stx est intégré dans le chromosome des souches STEC, d'où l'appellation de prophage (Herold et al., 2004).

Les phages-Stx peuvent insérer leur ADN dans le chromosome de la bactérie, au niveau d'un site préférentiel unique ou d'autres sites d'intégration secondaires (Hayashi et al., 2001; Schmidt, 2001; Serra-Moreno et al., 2007).

Le gène *stx* est localisé dans la dernière région du génome du prophage ; son expression est sous le contrôle des gènes du phage. Par conséquent, c'est l'induction du phage qui déclenche la production accrue de Stx.

A la suite de l'induction, le phage-Stx peut infecter d'autres bactéries *in vivo* et *in vitro*. En effet, la transmission de gènes *stx* par les phages-Stx a été montrée au sein des populations d'*E. coli*. Cette transmission a été démontrée dans des aliments *in vitro* (Imamovic et al., 2009) ; elle a aussi été observée *in vivo*, avec la transmission du gène *stx* d'une EHEC O26 à une aEPEC O26 chez un patient (Bielaszewska et al., 2007).

Les phages-Stx représentent donc des éléments génétiques mobiles qui jouent un rôle important dans l'expression des gènes *stx* et participent à leur transfert ; ils peuvent favoriser l'émergence de nouvelles souches pathogènes pour l'homme.

1.2.1.3 Structure / mode d'action des shigatoxines

Les shigatoxines sont composées de 2 sous unités majeures ; il s'agit de la sous unité A, qui est liée de façon non covalente à l'autre sous-unité B. La sous-unité B est un pentamère constitué de 5 sous-unités identiques.

La sous-unité B a pour rôle de se lier au récepteur Gb3 (Globotriaosylcéramide) des cellules endothéliales cibles chez l'homme, il est indispensable pour le transport de la shigatoxine à l'intérieur de la cellule cible.

La sous-unité A agit sur les ribosomes des cellules endothéliales cibles en altérant la synthèse protéique par une activité *N*-glycosidase ; c'est-à-dire par la suppression d'un résidu adénine de l'ARNr 28S au niveau du ribosome 60S.

Les shigatoxines Stx1 et Stx2 ont le même mode d'action et elles utilisent un transport rétrograde pour atteindre le cytoplasme des cellules cibles (Sandvig et al., 2010; Melton-Celsa,

2014). Ce transport rétrograde de Stx a été mis en évidence pour la première fois chez l'homme au niveau des cellules vasculaires glomérulaires et mésangiales des reins (Warnier et al., 2006).

L'action de Stx commence par sa liaison au récepteur Gb3. Ensuite, le complexe toxine-récepteur (Stx-Gb3) fusionne avec l'endosome, et rejoint l'appareil de Golgi avant le réticulum endoplasmique (REG) (Figure 2).

Au niveau du REG, le lien entre les chaînes A1 et A2 de la sous unité A est rompu. Seule la toxine A1 quitte le REG pour atteindre les ribosomes cibles, probablement en perturbant la voie de dégradation des protéines associée au REG (Spooner and Lord, 2012). Une fois le ribosome atteint, A1 retire une adénine au niveau de la sous-unité ribosomale 28S, ce qui va entraîner la dissociation du ribosome d'avec le facteur d'élongation 1 (Obrig et al., 1987). Cette dissociation va, par conséquent, stopper la synthèse protéique.

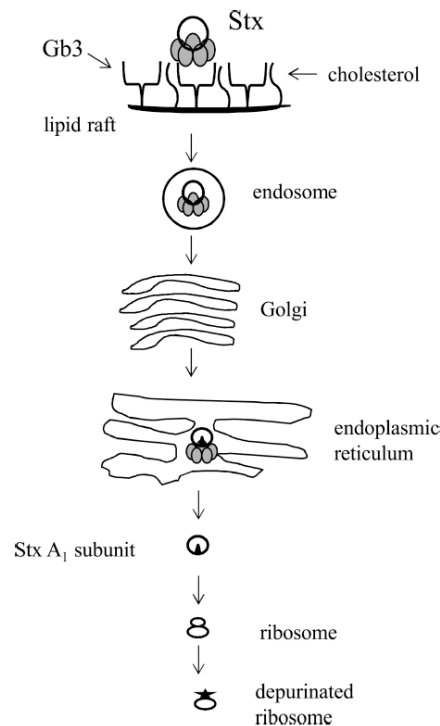


Figure 2. Mode d'action des shigatoxines.

Stx se lie au récepteur Gb3 et le complexe (Stx-Gb3) fusionne avec l'endosome. Seule la sous-unité Stx A₁ va rejoindre le cytoplasme par transport rétrograde puis arrêter la synthèse protéique en dissociant le ribosome. De (Melton-Celsa, 2014).

1.2.1.4 Les sous-types de shigatoxines

La famille des shigatoxines est divisée en deux branches, Stx1 et Stx2. Des sous-types de Stx1 et Stx2 ont été identifiés. Pour Stx1 il s'agit de Stx1a, Stx1c et Stx1d et pour Stx2, il s'agit de : Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d (Stx2dact), Stx2e, Stx2f, Stx2g. Ils se distinguent par leurs différences d'activité biologique, de réactivité immunologique, de récepteur au niveau des cellules cibles et par leur capacité à être activés par l'élastase du mucus intestinal (Scheutz et al., 2012).

D'un point de vue épidémiologique, les *E. coli* productrices de Stx2 sont associées à des symptômes plus graves que celles productrices de Stx1 (Luna-Gierke et al., 2014). Les sous-types et toxicité de Stx1 et Stx2 sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Toxicité des souches positives pour Stx1 et Stx2.

Modifié à partir de (Scheutz, 2014)

Sous-types de Stx	Souches de références ^a	Souches cliniques Stx+ associées à des symptômes sévères; Différence(s) avec Stx1a ou Stx2a	Références
Stx1a	EDL933 (Stx1a ; Stx2a)	Oui	(Riley et al., 1983)
Stx1c	DG131/3	Non	(Paton et al., 1995; Koch et al., 2001)
Stx1d	MHI813	Non; toxicité inférieure à Stx1a	(Burk et al., 2003)
Stx2a	EDL933 (Stx1a ; Stx2a)	Oui	(Riley et al., 1983)
Stx2b	EH250	Non	(Pierard et al., 1998)
Stx2c	031	Oui; toxicité faible sur cellules Vero et chez la souris par rapport à Stx2a	(Paton et al., 1993)
Stx2d(Stx2dact)	C165-02	Oui; toxicité plus élevée après incubation avec élastase, toxicité faible sur cellules Vero	(Persson et al., 2007)
Stx2e	S1191	Non; liaison au récepteur Gb4, associée à la pathologie chez le porc	(Weinstein et al., 1988)
Stx2f	T4/97	Non; détectée initialement au niveau de STEC de pigeons	(Schmidt et al., 2000)
Stx2g	7v	Non; le gène <i>stx2g</i> n'est pas amplifié par les amorces de <i>stx2a</i>	(Leung et al., 2003)

a, Les informations sur les souches de références sont données dans la publication (Scheutz et al., 2012).

-Stx1

❖ Stx1a

Une étude sur des STEC isolées de patients ou des sources environnementales a montré que le sous-type Stx1a était impliqué dans les infections légères ou portage asymptomatique comparativement à l'association Stx2a-Stx2c qui était associée à une forte virulence et à la capacité à causer des cas de SHU (Orth et al., 2007).

❖ Stx1c et Stx1d

Les autres sous-types de Stx1 qui sont Stx1c et Stx1d sont rarement détectés dans des cas de pathologie humaine. Lorsqu'ils ont été associés à des STEC isolés de patients, les symptômes étaient atténués (Zhang et al., 2002a; Friedrich et al., 2003; Kumar et al., 2012).

-Stx2

❖ Stx2a

Le sous-type Stx2a en association ou non avec Stx2c semblent être le plus hautement corrélé aux manifestations sévères chez l'homme tels que le SHU (Eklund et al., 2002; Persson et al., 2007; Kawano et al., 2008). Au Danemark, lors d'une épidémie à EHEC O157:H7, les souches positives pour *stx2a* étaient associées au plus grand nombre de SHU (30%) comparativement aux souches *stx2c* (3%), *stx1a* (0%) (Soborg et al., 2013). Lors d'expérimentations *in vitro* et *in vivo*, la toxine purifiée Stx2a présentait plus de toxicité sur des cellules rénales humaines et dans des modèles de souris comparativement à Stx1 et Stx2c (Fuller et al., 2011).

❖ Stx2b

Elle est associée à des symptômes légers chez l'homme (Pierard et al., 1998; Stephan and Hoelzle, 2000) et dans des modèles d'infections de souris (Fuller et al., 2011). Lindgren *et al.* ont montré que Stx2b et Stx2c avaient des activités cytotoxiques réduites sur cellules Vero par rapport à Stx2d (Lindgren et al., 1994).

❖ Stx2c

Stx2c est occasionnellement associé au SHU mais présente un risque plus faible que Stx2a (Eklund et al., 2002; Friedrich et al., 2002). *In vitro*, Stx2c présente une activité cytotoxique plus faible sur les cellules Vero comparativement à Stx2a, et son activité est neutralisée par certains anticorps monoclonaux (Schmidt et al., 1994).

❖ Stx2d

Ce sous type est encore appelé « Stx2d activable », car lorsqu'elle est incubée avec de l'élastase (protéase produite dans le mucus intestinal des mammifères), sa cytotoxicité sur cellules Vero est augmentée (Kokai-Kun et al., 2000). Stx2d a été associée à plusieurs formes de diarrhée mais pas de SHU dans l'étude de Friedrich *et al.* (Friedrich et al., 2002). Cependant, une association entre des STEC positives pour *stx2d* et des cas de SHU a été montrée chez des patients de 21 ans (Bielaszewska et al., 2006).

In vitro, l'étude de Fuller *et al.* a montré que Stx2d purifiée était au moins 25 fois plus toxique que Stx2b et Stx2c sur des cellules Vero et sur des cellules épithéliales des tubules proximaux de reins humains. *In vivo*, chez des souris, Stx2d et Stx2a étaient 40 à 400 fois plus toxiques que Stx1 (Fuller et al., 2011). Par ailleurs, Lindgren *et al.* ont montré que Stx2d présentait un effet cytotoxique similaire à celui de Stx2a chez des souris (Lindgren et al., 1994).

❖ Stx2e, Stx2f, Stx2g

Il existe d'autres variants de Stx2a : Stx2e, Stx2f, Stx2g qui ont été associés uniquement à des STEC d'origine animale (Scheutz, 2014).

1.2.2 Le Locus d'attachement et d'effacement (LEE)

La physiopathologie des EHEC nécessite la colonisation du tube digestif. Chez les EHEC typiques, elle est caractérisée par le développement de lésions d'attachement-effacement (A/E) aux entérocytes. L'apparition des lésions A/E résulte de l'action combinée de facteurs de virulence codés par des gènes regroupés sur un large îlot de pathogénicité chromosomique appelé « Locus of Enterocyte Effacement » (PAI-LEE) qui est conservé chez toutes les AEEC (McDaniel et al., 1995).

1.2.2.1 Structure du LEE

Le LEE d'EHEC O157:H7 a une taille de 43 kb et comparativement aux EPEC, il contient des séquences d'un prophage de 7,5 kb appelé « prophage remnant » dont le rôle n'a pas encore été élucidé (Perna et al., 1998; Stevens and Frankel, 2014) (Figure 3).

La structure du LEE se compose de 41 gènes différents organisés en 3 régions majeures (Delahay et al., 2001; Deng et al., 2004; Stevens and Frankel, 2014). Il s'agit : (i) du système de sécrétion de type III (TTSS) qui exporte les molécules effectrices de virulence en les injectant dans la cellule hôte (Jarvis et al., 1995), (ii) d'une région d'adhésion qui est l'intimine codée

par le gène *eae* et son récepteur de translocation Tir qui est transloqué dans la membrane cellulaire de l'hôte par le TTSS, (iii) de plusieurs protéines sécrétées (Esp) faisant partie du TTSS. Les protéines sécrétées sont impliquées dans la modification du signal de transduction au niveau de la cellule hôte lors de la formation des lésions A/E (Deng et al., 2004; Pallen et al., 2005).

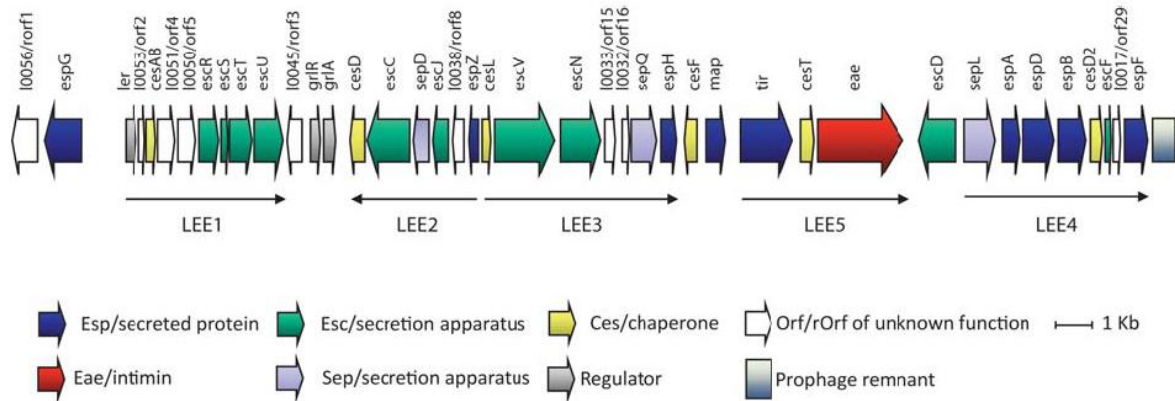


Figure 3. Structure du LEE d'*E. coli* O157:H7.

Les 41 gènes du LEE sont représentés en flèches épaisses. Le prophage présent sur le LEE des EHEC dont la fonction est inconnue est représenté sous la forme d'un rectangle. De (Stevens and Frankel, 2014).

-L'intimine

Parmi les facteurs de virulence codés par le LEE, le gène *eae* a été identifié comme codant pour l'intimine ; c'est l'un des principaux gènes conservés au sein du LEE (Jerse et al., 1990; Bertin et al., 2004). L'intimine est une protéine de la membrane externe impliquée dans l'adhésion étroite entre la bactérie et l'entérocyte. Plusieurs sous-types et variants ont été identifiés.

-Les sous-types et variants de l'intimine

Certains sous-types, notamment γ et ϵ semblent être plus spécifiquement exprimés par des souches EHEC (Oswald et al., 2000; Fitzhenry et al., 2002), mais la plupart des autres sous-types sont retrouvés chez les EPEC ou des AEEC d'origine animale et non pathogènes pour l'homme (Higgins et al., 1999; Oswald et al., 2000).

Les différents variants de l'intimine des EHEC typiques et autres AEEC, semblent influencer le tropisme cellulaire et la spécificité du site de colonisation de la muqueuse intestinale chez l'hôte (Fitzhenry et al., 2002; Torres et al., 2005). Les 17 variants du gène *eae* qui ont été identifiés sont : $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\xi R/\beta 2B$, $\delta/\kappa/\beta 2O$, $\gamma 1$, $\theta/\gamma 2$, $\epsilon 1$, $\nu R/\epsilon 2$, ζ , η , $\iota 1$, $\mu R/\iota 2$, λ , μB , νB , ξB (Zhang et al., 2002b; Blanco et al., 2005).

1.2.2.2 Test d'adhésion au cours des lésions A/E

Les lésions A/E vont entraîner des modifications considérables du cytosquelette des cellules épithéliales de l'intestin. Il s'agit notamment de l'accumulation de filaments d'actine polymérisée directement sous les bactéries adhérentes conduisant à la formation de structures en piédestal appelées « pedestal-like structure ».

L'accumulation de fortes concentrations de filaments d'actine a été observée pour la première fois par Knutton et ses collaborateurs. Cette étude a conduit au développement de la méthode de diagnostic pour les EPEC appelée Fluorescent-Actin Staining test (test FAS) (Knutton et al., 1989).

Le principe de cette méthode est la mise en évidence de l'accumulation de filaments d'actine *via* un marqueur fluorescent appelé « Fluorescein isothiocyanate (FTIC)-labelled phalloïdine », suite à l'interaction entre des EPEC et des cellules épithéliales en culture (Oswald et al., 2000; Stevens et al., 2002) (Figure 4).

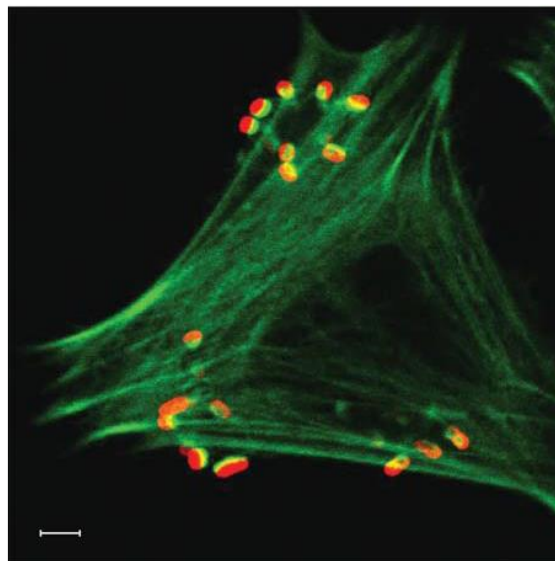


Figure 4. Test FAS.

Accumulation des filaments d'actine (en jaune) sous la souche EHEC O103:H3 (référéncée PMK5), visualisée au microscope laser confocal après interaction avec des cellules HeLa. Echelle = 5µm. De (Stevens et al., 2002).

1.2.3 Le plasmide de virulence des EHEC

La production de Stxs et la colonisation intestinale sont considérées comme essentielles. Cependant, d'autres facteurs peuvent être impliqués dans la pathogénie des EHEC.

En plus des Stxs et du LEE présents sur le chromosome bactérien, tous les isolats cliniques d'*E. coli* O157:H7 possèdent un plasmide de virulence hautement conservé appelé pO157 (Schmidt et al., 1994), dont la taille varie de 93,6 à 104 kb (Schmidt et al., 1996).

Ce plasmide est également présent chez des souches O26:H11 et dans la majorité des STEC isolées chez les humains (Levine et al., 1987; Beutin et al., 1994). Pour ces sérotypes, la taille du plasmide de virulence peut varier de 70 à 200 kb (Hales et al., 1992).

1.2.3.1 Structure du plasmide de virulence des EHEC

La structure du plasmide pO157 a été élucidée grâce au séquençage. Des séquences complètes ont été publiées pour plusieurs plasmides de virulence des EHEC O157:H7 (Burland et al., 1998; Makino et al., 1998).

Des études épidémiologiques suggèrent une forte corrélation entre la présence du plasmide de virulence des EHEC et le développement du SHU chez les patients (Schmidt and Karch, 1996). L'étude de Levine et ses collaborateurs sur la distribution de ce plasmide dans des souches cliniques d'EHEC en Amérique du Nord a montré que parmi 107 O157:H7, 44 O26:H11, et 26 STEC non-O157:H7 et non-O26:H11, respectivement 99%, 77%, et 81 % possédaient le plasmide de virulence des EHEC (Levine et al., 1987). Une autre étude menée en Europe a montré des résultats similaires. Parmi 26 STEC cliniques de sérotypes autres que O157:H7 et O26:H11, 60% des souches portaient le plasmide de virulence des EHEC (Willshaw et al., 1992).

La structure du pO157 est dynamique et comprend différents éléments génétiques mobiles tels que des transposons, des prophages, des séquences d'insertion (IS) ainsi que des parties d'autres plasmides. L'actuel pO157 a été formé à partir d'intégration de fragments génétiques d'origines et évolutions différentes, dans un plasmide de type « F-like » (Lim et al., 2010). Il contient 100 séquences ouvertes de lecture (ORFs) dont 43 montrent des similitudes avec des protéines et des fonctions connues. Parmi ces 100 ORFs, 35 protéines sont soupçonnées d'implication dans la pathogenèse des infections dues aux EHEC O157:H7, et 19 gènes ont été caractérisés (Burland et al., 1998) (Figure 5).

Les gènes les mieux décrits sont : le gène d'entérohémolysine A (*ehxA*), d'adhésine putative (*toxB*), de la catalase-peroxydase (*katP*) (Brunder et al., 1996), d'une sérine protéase (*espP*)

aussi pour la synthèse et le transport de l'entérohémolysine A. Le gène *ehxA* est considéré comme un marqueur fiable pour le diagnostic des *E. coli* O157:H7 et d'autres EHEC (Levine et al., 1987; Brunder et al., 1999).

❖ Structure d'*ehxA*

L'entérohémolysine A appartient à la famille des cytotoxines capables de former des pores. Elles sont appelées « Repeats in ToXin » (RTX). Ces toxines sont également exprimées par d'autres bactéries pathogènes pour l'homme et les animaux, dont *Pasteurella haemolytica*. La structure génétique du gène *ehxA* présente 60% d'homologie avec le gène *hlyA* codant pour l'hémolysine exprimée par les *E. coli* uropathogènes (Bauer and Welch, 1996).

❖ Rôle d'*ehxA* dans la pathogenèse des EHEC

Plusieurs études montrent que l'entérohémolysine A est hautement conservée chez différents sérotypes d'EHEC, mais son rôle est encore sujet de spéculations. Il semblerait que la lyse des érythrocytes causée par l'entérohémolysine A conduise à la libération d'hème et d'hémoglobine, qui serviraient ensuite comme source de fer à la bactérie. Par conséquent, la croissance d'*E. coli* O157:H7 et l'infection de l'hôte seraient favorisées (Nataro and Kaper, 1998).

Beutin et ses collaborateurs ont rapporté qu'en Allemagne, 90% des STEC isolées chez les patients possédaient le gène *ehxA* (Beutin et al., 1994). Par ailleurs, dans une étude épidémiologique sur les STEC O111:H-, le phénotype entérohémolytique était associé chez 16 des 18 patients souffrant de SHU et chez seulement 4 des 18 patients présentant une diarrhée sans SHU (Schmidt and Karch, 1996). D'un point de vue immunologique, il a été montré que des patients avec SHU pouvaient développer des anticorps anti-entérohémolysine (Schmidt et al., 1995).

- Adhésine putative (*toxB*)

Le gène *toxB* est codé sur une séquence du pO157 de 9,5 kb. ToxB est impliquée dans le phénotype d'adhésion d'*E. coli* O157:H7 à des cellules épithéliales Caco-2 grâce à l'augmentation de la sécrétion des protéines codées par le système de sécrétion de type III (TTSS) et semble ainsi contribuer à la colonisation du tractus digestif de l'hôte (Nicholls et al., 2000; Tatsuno et al., 2001). L'analyse des séquences montre que les gènes *toxB* et *efa-1/lifA* partagent en moyenne 50% d'homologie en acides aminés (Caprioli et al., 2005). Les gènes *efa-1/lifA* sont fréquemment détectés au niveau de l'îlot OI-122 sur le chromosome des EPEC

et des EHEC non-O157 (Morabito et al., 2003). Il a été montré que leurs activités biologiques étaient similaires, notamment l'inhibition de l'activation des lymphocytes gastro-intestinaux de l'hôte (Klapproth et al., 2000; Morabito et al., 2003).

1.2.4 Facteurs d'adhésion autres que ceux codés par le LEE

Des EHEC atypiques (négatives pour le LEE) ont été associées à des formes graves de la maladie telle que le Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU). Il a été montré qu'elles possédaient des facteurs d'adhésion aussi efficaces que ceux du LEE pour pouvoir coloniser la muqueuse du côlon de l'hôte (McWilliams and Torres, 2014).

En effet, l'adhésine Saa « *STEC autoagglutinating adhesin* » a été détectée au niveau d'une souche STEC O113:H21 (98NK2) isolée de patients atteints de SHU (Paton et al., 2001). Une autre adhésine appelée AA « *Aggregative Adhesion* » a été détectée chez une STEC O111:H2 responsable de SHU (Morabito et al., 1998).

D'autres adhésines ont été décrites chez des souches EHEC typiques et atypiques. Elles sont classées en : (i) adhésines fimbriaires (*fimbriae* Lpf et Sfp, *pilus* de type IV, et les protéines codées par les îlots génomiques (« *O Islands* ») OI-1, OI-47, OI-141 et OI-154), (ii) adhésines non fimbriaires (EfaI, Iha, OmpA) (ANSES, 2010).

L'adhésine non fimbriaire EfaI détectée chez une EHEC O111:H- clinique typique a été décrite comme contribuant à l'adhésion *in vitro* de la souche EHEC sur des cellules épithéliales CHO (« *Chinese Hamster Ovary* ») (Nicholls et al., 2000). Elle est codée par le gène *efal* (« *EHEC factor for adherence* »), qui appartient à un locus de 15 kb indépendant du LEE.

1.2.4.1 Les « *O Islands* »

D'autres facteurs de virulence potentiels sont décrits uniquement chez les STEC à l'origine d'épidémies et de SHU. Il s'agit des îlots de pathogénicité « *O Islands* » qui sont des segments génétiques détectés uniquement dans le génome des EHEC et qui sont absents chez les *E. coli* non pathogènes. Les OIs ont été associés à des épidémies et maladies sévères (Shen et al., 2005). L'étude de Shen et ses collaborateurs a montré que la présence des 4 OIs OI-1, -47, -141, -154 était associée à la capacité de ces souches à coloniser les tractus digestif humain et animal. En effet, sur 69 STEC de 39 sérotypes différents, seuls les STEC O157:H7 typiques mobiles (exemple EDL933) et non mobiles possédaient ces 4 OIs.

Par ailleurs, la comparaison des génomes de 2 souches d'*E. coli*, une EHEC O157:H7 (EDL933) et une commensale MG1655 a montré que les OIs n'étaient présents qu'au niveau du génome de la souche EHEC O157:H7 (Perna et al., 2001).

La structure des OIs est composée de gènes *nle* (non LEE-encoded factor) codant pour le système de sécrétion de type III et les protéines secrétées Esp (Tobe et al., 2006). Au total, 14 gènes *nle* (*nleA-G*, *G2-1*, *2-3*, *5-2*, *6-2*, *9*, *H1-2*, *H1-1*, *ent/espL2*) ont été identifiés comme étant plus fréquemment présents dans des souches EHEC que chez des STEC n'ayant jamais provoqué de maladie grave (Coombes et al., 2008).

Il a été montré que plus des souches STEC contenaient des OIs complets (possédaient le maximum de gènes *nle*) plus elles étaient associées à des formes graves de maladie comme le SHU ou à des épidémies. Ce résultat a été observé avec l'OI-122, qui code aussi pour le gène appelé « PagC-like virulence factor » (Perna et al., 2001; Karmali et al., 2003), mais aussi avec les OI-71 et OI-57 (Coombes et al., 2008).

Pour une nouvelle approche de l'évaluation moléculaire du risque lié aux STEC, l'étude de Bugarel et ses collaborateurs avait suggéré la combinaison des gènes *nleB*, *nleE*, *nleH1-2*, *ent/espL2* comme marqueurs génétiques potentiels des EHEC (Bugarel et al., 2010).

Conclusion I.2 : Les facteurs de virulence et intérêt pour la partie expérimentale

La recherche de principaux facteurs de virulence ainsi que la réalisation des tests phénotypiques dans ce travail de thèse nous permettra de mieux appréhender le pouvoir pathogène des souches d'E. coli étudiées.

*Le plasmide de virulence des EHEC porte des gènes additionnels de virulence dont le gène d'entérohémolysine A (*ehxA*), qui est le marqueur constant de sa présence. Des gènes de résistance aux antibiotiques ont déjà été détectés sur le plasmide de virulence des EHEC (voir ci-après). D'où l'intérêt dans ce travail de thèse de rechercher la présence du marqueur *ehxA* chez les souches d'E. coli étudiées.*

1.3 Infections humaines liées aux EHEC

1.3.1 Physiopathologie des infections liées aux EHEC

Les STEC peuvent induire la pathologie avec un degré de sévérité allant du portage bénin, par simple transit (Stephan and Untermann, 1999), au décès (Denno et al., 2012). L'évolution clinique après contamination de l'homme par les STEC est en général :

(i) Dans un premier temps, la colonisation du tube digestif qui va entraîner l'apparition de diarrhée aqueuse.

(ii) Dans un deuxième temps, les Stxs libérées par les STEC au niveau des cellules intestinales vont altérer les tissus épithéliaux, endothéliaux et conduire à l'apparition d'une diarrhée sanglante. Le passage systémique des Stxs et du LPS (lipopolysaccharide), va entraîner la sécrétion de cytokines chez l'hôte.

(iii) Dans certains cas, dans un troisième temps, l'action des Stxs et cytokines sur les cellules endothéliales cibles du rein et du cerveau, vont conduire à une microangiopathie thrombotique (MAT) (lésion des cellules endothéliales de la microcirculation suivie d'un gonflement cellulaire, d'adhérence plaquettaire et de thrombose).

Si le tissu vasculaire des reins est atteint, la MAT se manifestera par un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU), particulièrement chez les enfants et les patients âgés.

Si c'est celui du cerveau, la microangiopathie se manifestera par un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez le patient adulte (Andreoli et al., 2002).

Les EHEC O157:H7 étant la cause majeure de SHU dans le monde, la plupart des données cliniques concernent ce sérotype.

1.3.2 Signes cliniques des infections liées aux EHEC

- Colite hémorragique

Le signe clinique le plus fréquent des infections aux EHEC est la colite hémorragique (Bouvet et al., 2003). La colite hémorragique causée par *E. coli* O157:H7 est caractérisée par des crampes abdominales et une diarrhée aqueuse non sanglante dont 10% des patients se remettent. Chez les autres patients (90%), la diarrhée non sanglante évolue en diarrhée sanglante au bout de 3 jours avec des selles contenant des quantités de sang allant de l'état de traces à des selles ne contenant que du sang. La diarrhée sanglante persiste de 2 à 4 jours et 90% des patients sont souvent rétablis au bout de 6 à 8 jours (Griffin et al., 1988; Pai et al., 1988; Ostroff et al., 1989). Pour environ 10% de patients non rétablis, cette diarrhée sanglante peut se compliquer d'un SHU (Bouvet et al., 2003).

Pour certaines infections à STEC O157:H7 et la majorité des sérotypes de STEC autres que O157:H7, la diarrhée ne contient pas souvent de traces de sang visibles (Davis et al., 2014).

- Syndrome Hémolytique et Urémique

Le SHU a été décrit pour la première fois chez un patient Suisse en 1955 (Gasser et al., 1955) et associé à une infection à STEC O157:H7 pour la première fois par Karmali et ses collaborateurs (Karmali et al., 1983). C'est la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez les nourrissons. Le SHU est caractérisé par les 4 symptômes suivants :

- (i) l'apparition brutale d'anémie hémolytique (taux d'hémoglobine < 80g/L avec 2 à 10% de fragments d'hématies ou schizocytes) ;
- (ii) une thrombocytopénie (nombre de plaquettes = 40 à 50 000/mm³) ;
- (iii) une insuffisance rénale aiguë c'est-à-dire des taux élevés d'urée et de créatinine sanguine (>60 µmol/l si <2 ans, >70 µmol/l si ≥2 ans) (Fong et al., 1982; Kaplan and Proesmans, 1987) ;
- (iv) des atteintes du système nerveux central reportées chez 20 à 50% des cas (convulsions, torpeur, accident vasculaire cérébral, coma) (Steinborn et al., 2004; Nathanson et al., 2010; Weissenborn et al., 2012).

L'atteinte du système nerveux est actuellement la principale cause de décès associé aux infections à EHEC en France (Decludt et al., 2000).

Les pourcentages de patients souffrant d'infection à *E. coli* O157:H7, qui développeront le SHU, varient selon l'âge : il survient chez 10% des enfants de moins de 10 ans, et chez 10 à 20% des personnes âgées de plus de 65 ans.

Le pronostic de séquelles rénales va être déterminé par un élément majeur qui est la persistance de l'oligoanurie (plus de 8 j) ; elle permet de prédire la survenue de séquelles rénales chroniques (Dolislager and Tune, 1978; Oakes et al., 2008; Balestracci et al., 2012).

Le SHU est catégorisé en fonction de la présence ou l'absence de diarrhée prodromique, on parle de SHU typique ou SHU atypique (Griffin and Tauxe, 1991) :

-Le SHU typique est la forme la plus commune (86-91%) (Lopez et al., 1989; Martin et al., 1990; Rowe et al., 1991). Il représente 90% des cas de SHU chez les enfants. Il touche surtout les enfants de moins de 3 ans et survient une semaine après l'apparition des symptômes digestifs.

-Le SHU atypique se manifeste chez une minorité de patients souffrant de SHU. La diarrhée sanglante n'est pas observée. Cependant, les fèces contiennent des *E. coli* O157:H7 tel qu'observé chez des enfants en Argentine (Miceli et al., 1999). Des cas de SHU atypiques ont

aussi été décrits chez des enfants malades suite à l'ingestion de hamburgers contaminés par *E. coli* O157:H7 aux USA (Brandt et al., 1994).

Les STEC de sérotypes autres que O157:H7 peuvent causer des SHU, mais la probabilité de survenue d'atteinte rénale grave a été décrite comme faible. *Les STEC O157:H7 demeurent donc la cause majeure de SHU post diarrhéique* (Davis et al., 2014).

- Purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT)

Le PTT a été décrit pour la première fois en 1925 (Moschcowitz, 1925). Mais, il a été associé pour la première fois à une infection à STEC O157:H7 en 1990 (Kovacs et al., 1990). Il touche surtout l'adulte et la diarrhée prodromique est généralement absente (Hofmann, 1993; Bouvet et al., 2003).

Le PTT est caractérisé, comme le SHU, par : une anémie hémolytique, une thrombocytopenie, l'atteinte nerveuse et rénale, ainsi que de la fièvre (Amorosi and Ultmann, 1966). La distinction majeure mais pas catégorique proposée entre le SHU et le PTT est la présence d'insuffisance rénale plus fréquente et grave dans les cas de SHU, tandis qu'on observe une grave affection neurologique dans les cas de PTT (Remuzzi, 1987).

Les manifestations cliniques de la plupart des PTT chez l'adulte sont dues : à la formation de thrombi plaquettaires (agrégation des plaquettes), et à des dépôts de fibrine au niveau des artéριοles. Ces dépôts de fibrine sont dus à l'accumulation dans le plasma de molécules à haut poids moléculaire (facteur Von Willebrand : protéine synthétisée par les globules blancs et les cellules endothéliales, qui est nécessaire à l'agrégation plaquettaire).

Le PTT peut durer quelques jours à plusieurs semaines. La progression de la maladie, l'atteinte du système nerveux central et des reins et les signes neurologiques (modification de comportement, confusion, atteinte focale, hémiparésie qui se terminent en coma) sont la cause principale des décès observés (Bouvet et al., 2003).

1.3.3 Traitement des infections liées aux EHEC

Aucune thérapie idéale n'existe et l'usage des antibiotiques demeure très controversé pour les infections dues aux EHEC. Le traitement antibiotique des infections à STEC n'est pas recommandé car il est susceptible d'entraîner la lyse bactérienne et le relargage accru des Stxs, ce qui augmenterait le risque de développer le SHU chez les patients (Wong et al., 2000). Cependant, l'antibiothérapie a toujours été largement utilisée chez les patients atteints de diarrhée du voyageur causée par des EAaggEC (*E. coli* entéroaggrégatives) ; c'est le cas de l'azithromycine (de la Cabada Bauche and Dupont, 2011; Hill and Beeching, 2010).

L'azithromycine a donc également été utilisée pour traiter des patients lors de l'épidémie due à la souche EHEC O104:H4 entéroaggrégative ; elle a permis la réduction du portage de la souche épidémique chez les patients (Nitschke et al., 2012). Il a aussi été démontré que l'azithromycine permettait de diminuer l'expression de *stx* au niveau des souches STEC (Ohara et al., 2002; McGannon et al., 2010). Par ailleurs, une récente revue a clarifié le risque associé à un traitement antibiotique lors d'une infection à STEC et d'un portage chronique de STEC (Agger et al., 2015). Cette étude propose un traitement antibiotique avec des inhibiteurs de la synthèse protéique et de la paroi cellulaire en fonction des profils des patients, des sérotypes, des profils de la virulence et de la durée de la maladie. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont à l'étude actuellement (Melton-Celsa, 2014).

Les résultats d'essai de vaccination pour les infections dues aux STEC ont montré plus d'efficacité, comparativement à l'immunisation directe des humains, pour réduire le portage au niveau du réservoir bovin et diminuer ainsi la transmission aux humains (Smith, 2014).

Par ailleurs, les vaccins conjugués parentéraux à base de lipopolysaccharides O157 ont certes montré un effet immunogénique chez les adultes et les enfants (Szu and Ahmed, 2014), néanmoins, la détermination de la population susceptible de présenter une forte incidence d'EHEC demeure un problème majeur pour l'élaboration d'une stratégie de vaccination des humains contre les infections dues aux EHEC (Tauxe, 1998).

Conclusion 1.3 : Infections humaines liées aux EHEC et intérêt pour la partie expérimentale

Les EHEC sont responsables de cas de diarrhée sanglante pouvant se compliquer chez 10% des patients d'un SHU, et la mort peut survenir dans moins de 5% des cas de SHU. L'usage des antibiotiques est controversé, cependant l'usage de l'azithromycine chez les patients, semble diminuer le portage des EHEC. Par conséquent, dans ce travail de thèse, nous avons recherché la résistance à l'azithromycine pour les souches STEC du top 5.

1.4 Epidémiologie des infections humaines liées aux EHEC

14.1 Epidémiologie descriptive

En France, la surveillance des infections aux EHEC est basée sur la surveillance du SHU chez les enfants de moins de 15 ans, car la recherche des STEC dans les selles n'est pas effectuée en routine dans les laboratoires d'analyses. Cette surveillance a été mise en place en 1996, par l'Institut de veille sanitaire (InVS) en collaboration avec la Société de néphrologie pédiatrique. Elle porte sur les cas survenant chez les enfants de moins de 15 ans qui présentent un diagnostic clinique de SHU (début brutal d'une anémie hémolytique + insuffisance rénale).

L'infection à STEC est ensuite confirmée au Centre national de référence (CNR) des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* et au laboratoire associé au CNR par :

- la mise en évidence d'anticorps sériques dirigés vers le lipopolysaccharide des sérogroupes de STEC les plus fréquemment rencontrés (O157, O103, O26, O145, O91, O111 et O128, O55) ;
- puis par l'isolement des souches de STEC ou la détection par PCR de gènes *stx* et *eae* dans les selles.

-Fréquences

Le dernier rapport de l'InVS rapporte que 117 cas de SHU, dont un décès, ont été notifiés en 2014. L'incidence annuelle de SHU était de 0,99 cas/100 000 enfants de moins de 15 ans (Figure 6). Depuis le début du programme de surveillance en 1996, l'incidence annuelle du SHU est comprise entre 0,6 et 1,3 cas/100 000 enfants; l'incidence la plus élevée étant observée chez les enfants de moins de 3 ans.

-Les sérogroupes incriminés

En 2014, le séro groupe le plus fréquent était O157, suivis d'O80 et d'O26. Pour le séro groupe O26, 5 cas de coinfection avec un autre séro groupe ont été rapportés. Les incidences d'infections dues à O111 et O103 étaient plus faibles (Figure 6).

En 2013, la France, l'Allemagne, l'Irlande et les Pays-Bas ont rapporté 4 cas de SHU associés au séro groupe O104 avec l'antigène H non identifié.

A

Année	Nombre de cas de SHU	Incidence annuelle	Année	Nombre de cas de SHU	Incidence annuelle
1996	81	0,66	2006	104	0,87
1997	92	0,75	2007	74	0,62
1998	76	0,59	2008	112	0,94
1999	93	0,76	2009	109	0,91
2000	79	0,64	2010	122	0,99
2001	74	0,61	2011	162	1,32
2002	73	0,60	2012	145	1,20
2003	80	0,66	2013	152	1,22
2004	87	0,72	2014	117	0,99
2005	122	1,01	Total	1954	

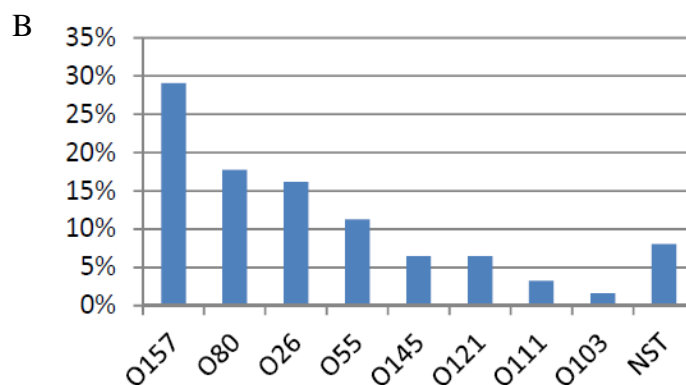


Figure 6. Nombre de cas de SHU de 1996 à 2014 et incidence annuelle pour 100 000 enfants <15 ans en France (A) et les sérotypes les plus impliqués en 2014 (B).

De InVS (<http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Syndrome-hemolytique-et-uremique/Donnees-epidemiologiques-du-SHU-chez-l-enfant-age-de-moins-de-15-ans-en-France>).

En Europe, la surveillance des infections à STEC fait partie du système de surveillance appelé FWD (« Food-and Waterborne Diseases and Zoonoses ») (<http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/fwd/Pages/>). Il est coordonné par le Centre pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC) et l’Autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA). Ces données sont publiées chaque année dans un rapport appelé *European Union Summary Reports on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks*.

Par ailleurs, le long de la chaîne alimentaire, les activités de surveillance sont obligatoires d’après la Directive 2003/99/EC (Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC) et les données

sont collectées avec celles des infections humaines. Le FWD est un système de surveillance passif qui collecte les données d'infections humaines associées aux STEC au niveau des pays de l'Union européenne (UE) et de l'Association européenne de libre-échange (EFTA), basées sur les cas confirmés au laboratoire : sérotype, gènes de virulence (*stx1*, *stx2*, *eae*) de la souche infectieuse, et sur les manifestations cliniques, en particulier l'apparition de SHU, mais aussi les cas probables et les cas possibles.

En 2013, le nombre de cas d'infections confirmées dues au STEC était de 6 043 et le nombre de décès était de 13 dans l'UE (EFSA and ECDC, 2015). Le taux de notification était de 1,59 cas pour 100 000 habitants, supérieur de 5,9% par rapport à 2012. Le sérotype le plus incriminé était O157 suivi par O26, O103, O145, O91, O111 et O146.

Un pic du nombre de cas avait été observé lors de l'été 2011; il était associé à l'épidémie de STEC EAaggEC O104:H4 qui a affecté 3 800 personnes en Allemagne et des cas associés dans 15 autres pays (EFSA and ECDC, 2013). A la suite de l'épidémie, le nombre de cas de détection de STEC rapportés était toujours en augmentation, probablement un effet de la sensibilisation accrue des laboratoires pour tester d'autres sérotypes en dehors des O157.

Aux Etats-unis, le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) a établi un réseau actif de surveillance pour les cas d'infections dues aux STEC et autres toxi-infections alimentaires appelé « FoodNet » (www.cdc.gov/foodnet/) et les rapports sont publiés annuellement (<http://www.cdc.gov/foodnet/reports/>). Ce réseau a été établi en 1995 en collaboration avec l'USDA (« U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service ») et l'administration en charge du médicament et des aliments (FDA). Le dernier rapport du réseau FoodNet a rapporté 444 cas dus à O157 et un total de 697 cas associés à d'autres sérotypes qu'O157 (en majorité O26 suivi d'O103, O111, O121, O45, et O145).

1.4.2. Epidémiologie analytique

1.4.2.1 Réservoirs des STEC

Les *E. coli* productrices de shigatoxines sont très souvent isolées chez de nombreuses espèces animales. Ces données sont bien documentées dans de nombreuses revues (Caprioli et al., 2005; Ferens and Hovde, 2011; Persad and LeJeune, 2014).

Le portage des STEC pour la majorité des espèces animales est asymptomatique, car elles ne possèdent pas les récepteurs de shigatoxine au niveau des cellules vasculaires cibles (sauf Gb4, récepteur de Stx2e chez le Porc) (Pruimboom-Brees et al., 2000).

D'un point de vue épidémiologique, les animaux porteurs de STEC peuvent être classés en : (i) espèces réservoirs, (ii) hôtes accidentels (*spillover hosts*), et (iii) culs de sac épidémiologiques (*dead-end hosts*) (Persad and LeJeune, 2014).

-Les réservoirs de STEC

Les bovins sont connus comme le réservoir naturel des STEC (Gyles, 2007), mais d'autres espèces de ruminants tels que les caprins, ovins, et les cervidés peuvent également être des réservoirs.

Les réservoirs de STEC sont capables de maintenir le portage des STEC en l'absence d'exposition aux STEC. Ils sont une source de transmission de STEC aux autres espèces animales.

- Les bovins

L'étude de Bibbal et ses collaborateurs ont rapporté des prévalences de 4,5% de STEC du top 5 chez les jeunes bovins laitiers prélevés à l'abattoir en France. Le sérotype O157:H7 était le plus détecté (Bibbal et al., 2014b; Bibbal et al., 2015). La proportion des bovins porteurs de STEC du top 5 a été évaluée à 1,8% chez les bovins adultes abattus en France.

Selon l'EFSA, parmi les 4 658 échantillons de fèces (23 campagnes de prélèvements dont 19 officielles) prélevés dans des fermes et aux abattoirs en 2013, 6,7% étaient positifs pour les STEC et 1,4% étaient positifs pour le sérotype O157. L'Autriche a rapporté la plus grande proportion de bovins positifs, 30,5% des bovins de plus de 2 ans et 33,8% des bovins de 1 à 2 ans, prélevés par écouvillonnage rectoanal, étaient positifs pour les STEC (EFSA and ECDC, 2015).

- Les caprins et ovins

En 2013, 22,7% des prélèvements chez les caprins et ovins étaient positifs pour les STEC, mais aucun n'appartenait au sérotype O157. Chez les caprins, les sérotypes les plus fréquents étaient O145 et O146 (17 isolats sur 799 prélèvements de petits ruminants). Au Pays-Bas, des proportions supérieures à 70% ont été rapportées chez les caprins ; les sérotypes les plus rapportés étaient O76, O146, O113, O103 (EFSA and ECDC, 2015).

-Les hôtes accidentels de STEC

Les hôtes accidentels de STEC peuvent être : les porcs (Trotz-Williams et al., 2012; EFSA and ECDC, 2015), les chiens (Hogg et al., 2009), les chevaux (Chalmers et al., 1997; Lengacher et al., 2010), et même la volaille, notamment les dindes (Doane et al., 2007). Comme les réservoirs naturels de STEC, ils peuvent transmettre les STEC à d'autres hôtes. Cependant, ils sont

incapables de maintenir la colonisation intestinale lorsqu'ils ne sont plus exposés à une source de STEC.

-Les culs-de-sac épidémiologiques

Les espèces aquatiques, notamment les poissons et les fruits de mer (Gourmelon et al., 2006; Bennani et al., 2011) sont considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques de STEC. Ils sont incapables de transmettre les STEC aux autres espèces animales de façon naturelle. Par conséquent, ces espèces animales ne sont une source de contamination que lorsqu'elles sont consommées.

1.4.2.2 Modes de transmission

Les infections humaines par des souches EHEC peuvent survenir par la consommation d'aliments contaminés, par la contamination interhumaine, le contact avec les animaux porteurs et excréteurs (notamment les bovins) ou l'ingestion d'eau contaminée (voir Partie II).

En ce qui concerne les épidémies, en 2013, 73 épidémies d'origine alimentaire ont été rapportées à l'EFSA, dont 12 définitivement élucidées. Les principales sources de contamination étaient la viande de bœuf et les produits à base de viande de bœuf, suivies par des végétaux, des jus de fruits et produits associés. Des fromages, des poissons et des produits de la pêche, des herbes et épices et d'autres aliments ont également été incriminés (EFSA and ECDC, 2015).

Conclusion 1.4 : Epidémiologie des infections humaines liées aux EHEC et intérêt pour la partie expérimentale

Les bovins sont les réservoirs naturels de STEC et la source principale de contamination pour l'homme. La transmission des STEC des bovins à l'homme via des sources environnementales telles que l'eau, les fruits et végétaux contaminés devient de plus en plus préoccupante. Par conséquent, nous nous sommes intéressés dans notre étude à la recherche des STEC et à leur caractérisation au niveau des effluents d'origine bovine qui pourraient se retrouver dans l'environnement.

1.5 Détection des EHEC

1.5.1 Méthodologie de la détection des EHEC

Les données sur les STEC détectées dans les aliments et chez les animaux sont reportées annuellement et de façon obligatoire par les Etats Membres de l'UE à l'EFSA, selon la directive 2003/99/EC. En 2009, l'EFSA a établi des spécifications techniques pour la surveillance et la déclaration des STEC détectées chez les animaux et les aliments (EFSA, 2009). Ces spécifications encouragent à déclarer les données sur les sérogroupes des STEC du top 5. En effet, la surveillance de leur présence dans la chaîne alimentaire permet d'identifier quels animaux et aliments sont les sources d'infection humaine.

Cependant, l'interprétation des données des différentes investigations n'est pas nécessairement comparable en raison des différences dans les techniques d'échantillonnage et méthodes d'analyse.

Les STEC ont des prévalences faibles. Par conséquent, la nature de la matrice conditionne la méthode de recherche des STEC. La recherche des STEC dans des matrices complexes, tels que les aliments ou les échantillons environnementaux, va donc fréquemment nécessiter une étape préalable d'enrichissement. De plus, l'isolement sur milieux traditionnels pourrait s'avérer difficile à cause de l'état viable non cultivable (VNC) des STEC, qui peut se produire dans les matrices complexes (Oliver, 2005).

1.5.1.1 Conditions d'enrichissement des échantillons pour la détection des STEC

L'efficacité d'un protocole d'enrichissement repose sur les paramètres suivants : la température, le temps d'incubation et la nature du bouillon d'enrichissement. Le protocole standard de référence pour l'isolement d'*E. coli* O157 dans les aliments ISO 16654:2001 (ISO, 2001) , recommande les conditions d'enrichissement suivantes : milieu tryptone soja modifié (mTSB) additionné de Novobiocine (inhibition des bactéries à coloration de gram positive), incubation à 41,5° C pendant 18-24h. Le milieu mTSB est un mélange de soja et caséine digérés qui fournissent des aminoacides et composés azotés nécessaires à la croissance des bactéries aérobies anaérobies facultatives (MacFaddin, 1985; Marshall, 1993).

Pour les autres sérogroupes des STEC du top 5, il n'existe pas de protocole d'enrichissement standard cependant, certains protocoles ont été décrits dans la littérature (Posse et al., 2008b).

1.5.1.2 Détection biochimique

-Propriétés biochimiques des *E. coli* O157:H7

Les STEC de sérotypes O157:H7 présentent les mêmes caractéristiques biochimiques que les autres sérotypes à l'exception de leur incapacité à fermenter le sorbitol après 48 h (Farmer et al., 1985). Elles ont aussi la particularité de ne pas produire de β -D-glucuronidase (Thompson et al., 1990). Cependant, des *E. coli* O157:H7 et O157:H- fermentant le sorbitol et produisant la β -D-glucuronidase ont déjà été décrites (Karch and Bielaszewska, 2001).

-Les géloses pour la détection des *E. coli* O157:H7

Des géloses spécifiques sont utilisées pour la détection et l'isolement des STEC O157:H7 du fait de leurs particularités biochimiques.

- La gélose MacConkey (MAC)

Il s'agit d'une gélose sélective pour la croissance des entérobactéries. Elle contient du lactose (colonies roses après fermentation), du cristal violet (inhibe la croissance des bactéries à coloration de Gram +) et des sels biliaires.

- La gélose Sorbitol MacConkey (SMAC)

Il s'agit de gélose MAC où le lactose a été remplacé par le sorbitol pour améliorer la sélectivité pour les O157:H7 (sorbitol-). Avec cette gélose, des STEC O157:H7 ont pu être détectées dans des fèces de patients infectés avec une sensibilité de 100% et spécificité de 85% (March and Ratnam, 1986). Cependant, d'autres *E. coli* et entérobactéries telles que *Proteus* spp. et *Aeromonas* spp. sont sorbitol-, par conséquent l'ajout de céfixime (contre *Proteus*) améliore la sélectivité des géloses SMAC (Chapman et al., 1991).

- La gélose Céfixime tellurite-sorbitol MacConkey (CT-SMAC)

Il s'agit d'une gélose SMAC supplémentée en tellurite de potassium et céfixime. Le tellurite de potassium présente une forte sélectivité pour les STEC O157. Un taux de détection proche de 100% (396/397) a été observé pour la recherche de STEC O157 dans des fèces d'origine humaine après isolement sur CT-SMAC (Zadik et al., 1993). Chapman et Siddons ont également montré que les *E. coli* O157:H7 étaient mieux détectées à partir de fèces humains sur des CT-SMAC incubées à 37°C (Chapman and Siddons, 1996). Les STEC O157 qui sont

sorbitol + sont aussi détectées sur des géloses CT-SMAC ; elles sont identifiées par la couleur rose des colonies, contrairement aux STEC O157 sorbitol – qui ont des colonies incolores. C'est cette gélose qui est préconisée par la méthode ISO 16654 :2001 pour la détection des *E. coli* O157 (ISO, 2001).

D'autres géloses en dehors des dérivés de MAC ont été utilisées pour la détection des STEC O157 dans le but de réduire la croissance des autres bactéries fermentant ou non le sorbitol. Il s'agit de Rainbow O157, CHROMagar O157, ChromID O157 :H7 (Bettelheim, 1998a; b; 2005) et la gélose X-gal supplémentée en sorbitol (Posse et al., 2008a).

-Les géloses pour la détection des *E. coli* autres que O157

Les STEC autres qu'O157 ne sont pas isolées de façon sélective sur des géloses SMAC. D'autres géloses ont été développées pour ces souches.

- Les géloses CT-MacConkey-Rhamnose (CT-RMAC)

La majorité des STEC O26 ont la particularité de ne pas fermenter le rhamnose (rhamnose-) et d'être hautement résistantes au tellurite de potassium (Hiramatsu et al., 2002). En routine, ce sont les géloses CT-RMAC qui sont utilisées pour l'isolement sélectif des STEC O26.

- Autres géloses pour l'isolement des STEC O103, O111 et O145 en fonction du profil fermentaire

C'est sur la base de ces particularités que des géloses composées d'un chromophore (X-gal) et de mélanges de sucres ont été mises au point (Posse et al., 2008a).

Enfin, Posse et ses collaborateurs ont récemment montré que l'utilisation des géloses CT-SMAC pour l'isolement des STEC O157 sorbitol- et sorbitol +, O103, O111 ont présenté de bons rendements de détection. Il en était de même pour les géloses CT-RMAC utilisées pour l'isolement des STEC O26, et les géloses CT-RaMAC (Céfixime Tellurite-MacConkey-Raffinose) pour la détection des STEC O145 (Posse et al., 2008b).

1.5.1.3 Méthodes de détection des STEC à partir des caractéristiques immunologiques

En routine, des méthodes de détection immunologiques sont utilisées lors de la recherche des STEC à la suite d'un enrichissement préalable. Leur principe repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les antigènes somatiques O, lors d'une détection basée sur le sérotype, ou alors d'anticorps anti-Stx. Pour les *E. coli* O157, deux méthodes ont été validées ; il s'agit de l'immuno-séparation magnétique (IMS) et du VIDAS ICE (« VIDAS Immuno-concentration *E.*

coli »). Pour les STEC non-O157, l'IMS fut longtemps le seul test utilisé, mais d'autres tests sont à l'étude.

L'IMS repose sur l'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'anticorps. C'est le cas du test Dynabeads anti-*E. coli* O157. Avec cette méthode, les complexes billes-bactéries formés sont isolés et concentrés à l'aide d'un champ magnétique.

Pour le protocole de détection ISO 16654, les *E. coli* O157 immunoconcentrées par IMS sont isolées sur gélose CT-SMAC pour permettre ensuite leur identification.

L'IMS a été décrit comme un meilleur moyen de détection des *E. coli* O157, par rapport à l'isolement direct sur gélose (Chapman et al., 1994). L'IMS à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre les antigènes O26, O111, O103 et O145 est également utilisée (Auvray et al., 2007).

1.5.1.4 Méthodes de détection des STEC par la biologie moléculaire

Les méthodes moléculaires permettent de s'affranchir de l'état Viable Non-Cultivable, de la méthode culturo-dépendante et du manque de spécificité de la méthode immunologique. Leur objectif est de détecter les marqueurs génétiques associés aux EHEC. Elles peuvent être appliquées soit par l'amplification de fragments de gènes spécifiques, soit directement sur l'ensemble du génome par hybridation (ADN-ADN).

Les gènes ciblés par PCR sont ceux associés aux EHEC ou codant pour des facteurs impliqués dans leur pathogénie. Plusieurs « screenings » sont décrits. Par exemple: (i) la recherche des marqueurs génétiques associés aux STEC du top 5 : *stx*₁, *stx*₂, *eae*, et *ehxA* par PCR conventionnelle (Paton and Paton, 1998a), (ii) la recherche des gènes des STEC du top 5 (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O111:H8 et O103:H2) par PCR en temps réel (Perelle et al., 2004; Madic et al., 2011), (iii) la recherche des sous-types du gène *stx* (*stx*₁ et *stx*₂) par PCR en temps réel (Scheutz et al., 2012), et (iv) la recherche des sous-types γ , β , ϵ , et θ du gène *eae* par PCR en temps réel (Madic et al., 2011).

Une nouvelle méthode internationale pour la détection des STEC dans les aliments a été publiée fin 2012 ; il s'agit de l'ISO 13136:2012 (ISO, 2012). C'est une méthode horizontale, associant toutes les méthodes sus-décrites.

1.5.2 Détection des STEC hautement pathogènes par la méthode ISO 13136:2012

Cette méthode est applicable aux produits destinés à la consommation humaine et animale, aux échantillons environnementaux dans les secteurs de production et manipulation des aliments, et aux échantillons des environnements de production primaire.

La méthode ISO 13136:2012 décrit l'identification des 5 EHEC typiques majeures en 3 étapes:

- (i) une étape d'enrichissement préalable des échantillons, l'extraction d'ADN et la recherche des gènes marqueurs de virulence des STEC, *stx* et *eae*, par PCR en temps réel ;
- (ii) sur les échantillons dont les ADN sont positifs pour *stx* et *eae*, la recherche des gènes marqueurs des sérogroupes des 5 EHEC typiques majeures O157, O111, O26, O103, O145 par PCR en temps réel ;
- (iii) l'isolement des souches EHEC à partir des échantillons positifs pour *stx* et *eae* et au moins un marqueur de sérotype par IMS, et étalement des concentrats sur géloses sélectives (exemple CT-SMAC pour O157:H7). Enfin la présence des marqueurs génétiques associés aux EHEC est confirmée au niveau des isolats d'*E. coli* par PCR (ISO, 2012).

La publication de Bibbal et ses collaborateurs a montré l'intérêt d'ajouter à cette méthode une étape de PCR en temps réel pour rechercher dans les extraits d'ADN, les 4 sous-types du gène *eae* associés aux STEC du top 5 (*eae-γ1*, *eae-β1*, *eae-ε*, *eae-θ*) (Bibbal et al., 2014b).

Les aEPEC détectées lors de la recherche des EHEC

Lors de cette recherche de souches STEC, les isolats d'*E. coli* positifs pour *stx* sont classés comme STEC. Ceux positifs pour *eae* mais négatifs pour *stx* sont classés comme des *E. coli* entéropathogènes atypiques (aEPEC).

Les aEPEC se distinguent des EPEC typiques (tEPEC) par leur mécanisme d'adhésion aux cellules épithéliales humaines (Trabulsi et al., 2002) et leur évolution génétique (Lacher et al., 2007). Le mécanisme d'adhésion des tEPEC est codé le plasmide appelé « *E. coli* Adherence Factor » (EAF). Il est absent chez les aEPEC.

Sur le plasmide EAF sont présents 2 opérons importants : *bfp* qui code pour une protéine appelée « type IV Bundle-Forming Pilus » (BFP) et *per* codant pour un activateur de transcription pour le LEE appelé Plasmid encoded regulator (Per) (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Frankel et al., 1998).

La distinction entre les tEPEC et aEPEC chez les souches *eae+* et *stx-* se fait donc par la recherche du marqueur de virulence spécifique des tEPEC (*bfp*). Les *E. coli eae+*, *bfp+* sont considérées comme des tEPEC et celles *eae+*, *bfp-* comme des aEPEC.

La détection des aEPEC à l'occasion de la recherche de STEC chez les bovins serait due à l'origine génétique de ces souches. Elles proviendraient de souches EHEC ayant probablement

perdu le phage-Stx. En effet, plusieurs études ont montré que les aEPEC et EHEC de sérotype O26, O103, O111, O145 portaient les mêmes gènes de virulence : ceux codés par les plasmides de virulence, par le LEE et en dehors du LEE (Kozub-Witkowski et al., 2008; Miko et al., 2010).

La majorité des aEPEC ont été isolées chez les bovins (Gyles, 1994; Trabulsi et al., 2002). L'association entre les sérotypes O26:H11 et les bovins est bien connue (Saridakis, 1994), celle entre le sérotype O103:H2 et les ruminants est également bien documentée partout dans le monde (Sekse et al., 2013; Bibbal et al., 2015; Moore, 2015).

Conclusion 1. 5 : Détection des EHEC et intérêt pour la partie expérimentale

Les STEC O157:H7 possèdent des particularités biochimiques (sorbitol-, résistance au tellurite de potassium) qui permettent de les identifier sur des géloses spécifiques (SMAC, CT-SMAC). D'autres méthodes sont utilisées pour détecter les STEC ; il s'agit de méthodes immunologiques et de biologie moléculaire (recherche de marqueurs de virulence associés aux STEC du top 5). Actuellement, une nouvelle méthode horizontale, l'ISO 13136:2012, incluant ces 3 principales approches permet l'identification de toutes les STEC du top 5.

Pour ce travail de thèse, deux méthodes de détection des STEC du top 5 ont été utilisées :

-une première basée sur une collection d'ADN d'isolats d'E. coli obtenus sans enrichissement ; elle consistait au « criblage en pool » par PCR des marqueurs génétiques associés aux EHEC (stx, eae), puis à l'identification des souches positives et la recherche des marqueurs des sérotypes des STEC du top 5.

-une seconde proche de l'ISO 13136:2012 avait pour but d'améliorer la sensibilité de la détection des 5 EHEC typiques majeures.

Chapitre 2. LES *E. COLI* RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES

2.1 Définition et détermination de la résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques utilisés pour les animaux d'élevage appartiennent en majorité aux mêmes classes d'antibiotiques que ceux utilisés en médecine humaine. Selon l'EFSA, l'antibiorésistance est le principal effet indésirable de l'usage des antibiotiques chez les humains et les animaux (EFSA and ECDC, 2016).

D'un point de vue thérapeutique, une bactérie est considérée comme résistante lorsqu'elle possède l'aptitude à résister à l'action d'un antibiotique auquel elle était préalablement sensible. La notion de « breakpoint » est utilisée pour classer les bactéries comme sensibles et résistantes afin de guider la thérapie (Leclercq et al., 2013a).

L'émergence de microorganismes résistants peut survenir indépendamment de la présence d'antibiotiques. En revanche, l'augmentation et la dissémination des bactéries résistantes survient à la suite de pression de sélection due à l'exposition aux antibiotiques. C'est donc l'usage abusif et/ou l'utilisation inadaptée des antibiotiques, que ce soit chez les patients ou les animaux ou leur relargage dans l'environnement qui, en fin de compte, va favoriser l'augmentation des proportions de bactéries résistantes (Roca et al., 2015).

La résistance aux antibiotiques est rencontrée soit chez les bactéries naturellement insensibles à des antibiotiques donnés, soit chez des bactéries ayant acquis la résistance.

2.1.1 Résistance naturelle aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être naturelle ou intrinsèque. La résistance intrinsèque est l'aptitude innée, universellement présente dans le génome d'une espèce bactérienne, de résister à l'action d'un antibiotique particulier.

La résistance naturelle est encore appelée insensibilité car elle existe chez des bactéries qui n'ont jamais été sensibles un antibiotique donné. Cette insensibilité naturelle peut être due à l'inaccessibilité de la molécule à l'intérieur de la cellule bactérienne, c'est le cas d'*Enterococcus faecalis* vis-à-vis des lincosamides-macrolides (Moellering and Weinberg, 1971; Zimmermann et al., 1971).

Elle peut être également due à la faible affinité de l'antibiotique pour sa cible chez la bactérie, à la production naturelle d'enzymes qui inactivent les molécules, ou encore, à l'éviction des molécules par exporteurs actifs codés par le chromosome bactérien (Hollenbeck and Rice, 2012).

2.1.2 Résistance acquise aux antibiotiques

La résistance acquise peut se manifester par plusieurs mécanismes :

- un changement de la perméabilité de la paroi bactérienne, qui va entraîner une restriction d'accès des antibiotiques au site cible ;
- un efflux actif de l'antibiotique hors de la cellule bactérienne ;
- l'inactivation enzymatique de l'antibiotique par la bactérie ;
- l'acquisition de voies métaboliques alternatives à celles inhibées par l'antibiotique ;
- la modification des cibles de l'antibiotique ;
- la surproduction de l'enzyme cible.

L'évaluation de la résistance au sein de la population bactérienne se fait par des méthodes phénotypiques et génotypiques. Les phénotypes de résistance des souches isolées sont déterminés par la recherche de la sensibilité d'une souche bactérienne à divers antibiotiques.

Ceci par :

- Des méthodes de dilution en milieu liquide ou gélosé : par la mise en contact d'un inoculum bactérien avec des concentrations croissantes d'antibiotiques (selon une progression géométrique de raison 2) dans des milieux liquides. Après incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est donnée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible (CA-SFM/EUCAST, 2014).
- Des méthodes de diffusion, dont l'antibiogramme: par la mesure du diamètre d'inhibition autour de disques permettant la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé ensemencé avec la culture bactérienne. La valeur du diamètre permet de déterminer si la souche est sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique considéré en se référant aux valeurs critiques (CA-SFM/EUCAST, 2014).

Dans un deuxième temps, les génotypes de résistance sont déterminés grâce à la recherche par PCR des déterminants génétiques de résistance (tableau II.3.2.1) et/ou supports génétiques de résistance (intégrons, transposons, plasmides).

2.2 Origine génétique de la résistance acquise

On parle de résistance acquise chez des bactéries qui étaient préalablement sensibles. L'acquisition de la résistance par les bactéries peut être liée à des mutations chromosomiques qui vont altérer la structure des protéines bactériennes existantes (Spratt, 1994), mais elle peut aussi être la conséquence d'un transfert horizontal et acquisition de nouveaux supports génétiques de résistance entre des bactéries d'espèces et/ou de genres semblables ou différents (Maiden, 1998; Ochman et al., 2000).

2.2.1 Les mutations chromosomiques

L'acquisition de la résistance peut survenir par mutation spontanée sur des gènes chromosomiques (Boerlin and Reid-Smith, 2008). Plusieurs exemples ont été décrits dans la littérature (van Hoek et al., 2011).

C'est le cas de la résistance aux glycopeptides de type VanD décrite chez *Enterococcus faecium* BM4339. Elle survient par mutation du cadre de lecture au niveau du gène chromosomique (*ddl*) codant pour l'enzyme cytoplasmique appelée D-Ala-D-Ala ligase. Cette mutation va induire la formation d'une ligase altérée (Casadewall and Courvalin, 1999).

Des polymorphismes simples de nucléotide ou SNPs («Single Nucleotide Polymorphisms») peuvent être la cause de résistance contre des antibiotiques synthétiques, tels que les sulfamides, le triméthoprim (Huovinen et al., 1995), et les quinolones (Hooper, 2000; Ruiz, 2003).

Les mutations au sein du gène chromosomique *rpsL* codant pour la protéine ribosomale S12 sont bien connues comme responsables d'un niveau élevé de résistance à la streptomycine (Nair et al., 1993).

2.2.2 Les gènes de résistance

Les gènes de résistance vis-à-vis d'une famille d'antibiotiques peuvent varier et ont été bien décrits (McDermott et al., 2003; van Hoek et al., 2011) (Tableau 3). La résistance aux aminoglycosides, céphalosporines, fluoroquinolones (FQL) et sulfamides est disséminée chez les *E. coli* isolées des animaux et des humains et peut compromettre l'efficacité thérapeutique (Hammerum and Heuer, 2009). Les gènes de résistance aux autres antibiotiques utilisés strictement en médecine vétérinaire (phénicolés) peuvent être impliqués dans des phénomènes de co-résistance. Par exemple, le florfenicol est d'usage strictement vétérinaire et la résistance au florfenicol n'est pas surveillée en médecine humaine. Cependant, le risque pour la santé publique tient principalement dans les phénomènes de co-sélection de gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques qui peuvent se produire quand plusieurs gènes de résistance sont présents par exemple sur un même plasmide (Bouchardon et al., 2006).

La résistance aux fluoroquinolones (FQL) et à certaines β -lactamines, notamment les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération (C3G-C4G) est devenue préoccupante en santé publique. Ces 3 classes sont d'importance critique pour le traitement des infections chez l'homme. L'Arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotiques d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue à l'article R. 5141-117-2 précise les substances antibiotiques pour lesquelles l'usage doit être

restreint en médecine vétérinaire (Art.1 de l'arrêté), voire interdit (Art.2 de l'arrêté) (Journal officiel de la République française du 25 mars 2016).

*Dans notre étude, en plus de la résistance aux β -lactamines, aminoglycosides, sulfamides et triméthopri-
me, macrolides, phénicolés et tétracyclines, nous avons donc également recherché
la résistance aux 4 générations de céphalosporines et aux quinolones. Les mécanismes et gènes
de résistance à ces classes d'antibiotiques sont présentés dans le Tableau 3. Une attention
particulière a été portée aux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques critiques pour
la médecine humaine (FQL, C3G-C4G) et à l'azithromycine, à cause de son intérêt
thérapeutique contre les EHEC.*

Tableau 3. Mécanismes de résistance acquise décrits chez *E. coli*.

Familles d'antibiotiques	Mode d'action des antibiotiques	Mécanisme de résistance	Protéines codées	Gènes de résistance
<p>β-lactamines</p> <p>Pénicillines et dérivés : Ampicilline Amoxicilline+acide clavulanique</p> <p>Inhibiteurs de β-lactamases (IBL): Acide clavulanique</p> <p>Céphalosporines : Céfalexine (C1G) Céfuroxime(C2G) Céfotaxime(C3G) Ceftazidime(C3G) Céfépime (C4G)</p> <p>Carbapénèmes : Ertapénème</p>	<p>Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux penicillin-binding-protein (PBPs)</p>	<p>Plusieurs mécanismes mais le plus important :</p> <p>Inactivation enzymatique</p>	<p>Différentes β-lactamases en fonction de:</p> <p>1-/La capacité à hydrolyser peu ou plusieurs β-lactamases: 1-1/β-lactamases à spectre étroit 1-2/β-lactamases à spectre modéré 1-3/ β-lactamases à large spectre (résistance contre pénicillines & céphalosporines, non-inhibées par certains IBL) 1-4/ β-lactamases à spectre étendu (BLSEs) résistance contre (pénicillines & C1G, C2G, C3G) inhibées par IBL et Non-résistantes aux carbapénèmes NB: Les enzymes BLSEs sont: -TEM (hors TEM1 et 2) -SHV (hors SHV1) -CTX-M -CMY</p> <p>2/Les caractéristiques moléculaires : β-lactamases de classe Ambler A (CTX-M), C (CMY), β-lactamases classe D (OXA) qui ne sont pas des BLSE β-lactamases classe B (métallo-enzymes)</p> <p>3/ Les caractères biochimiques : 3-1/Les groupes 1, 2,4 : serine-β-lactamases 3-2/Le groupe 3 : métallo-β-lactamases</p>	<p>Les gènes les plus prévalents</p> <p>1-/<i>bla</i>_{TEM} (187 variants), 1-/<i>bla</i>_{SHV} (141 variants)</p> <p>1-4/<i>bla</i>_{CTX-M} (119 variants) 1-4/<i>bla</i>_{CMY} (72 variants). NB : Tous les <i>bla</i>_{CTX-M} et <i>bla</i>_{CMY} codent pour les BLSEs</p> <p>2-1-/β-lactamases classe A : <i>bla</i>_{P(1-3)}</p> <p>2-2-/β-lactamases classe B <i>bla</i>_{IMP(1-8)} et <i>bla</i>_{VIM(1-4)}</p> <p>2-3-/β-lactamases classe C <i>bla</i>_{OXA} (219 variants) NB : Tous les gènes codent pour des BLSE sauf <i>bla</i>_{OXA}</p>
<p>Quinolones Acide Nalidixique</p> <p>Fluoroquinolones (FQL) Ciprofloxacine Enrofloxacin</p>	<p>Inhibition de l'action des enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV essentielles pour la réplication bactérienne</p>	<p>1/ Mutations ponctuelles chromosomiques au niveau des cibles de l'ADN ou entraînant la réduction de la perméabilité membranaire et la surexpression des pompes à efflux</p> <p>2/Résistance plasmidique 2-1/Protection des cibles 2-2/ Inactivation enzymatique 2-3/Efflux actif (extrusion des FQL)</p>	<p>2-1/Pentapeptide repeat proteins codées par <i>qnr</i></p> <p>2-2/Aminoglycoside acetyl transferase (acétylation de la ciprofloxacine)</p> <p>2-3/Pompes à efflux</p>	<p>1/Mutations sur les gènes <i>gyrA</i>, <i>gyrB</i>, <i>parC</i>, <i>parE</i></p> <p>2-1/<i>qnrA</i>, <i>qnrB</i>, <i>qnrC</i>, <i>qnrD</i>, <i>qnrS</i></p> <p>2-2/<i>aac(6)-Ib-cr</i></p> <p>2-3/<i>qepA</i>, <i>oqxA</i>, <i>oqxB</i></p>
<p>Tétracyclines</p>	<p>-Inhibition de la synthèse</p>	<p>1/ Efflux actif</p>	<p>Pas de données</p>	<p>1/ <i>tet</i> (A), <i>tet</i>(B), 2 <i>otr</i>, <i>trc</i> (25 au total)</p>

	protéique par interaction avec les ribosomes -Action sur la membrane bactérienne	2/ Protéines des protéines ribosomales (RPPs) 3/ Inactivation enzymatique		2/ 10 <i>tet</i> & 1 <i>otr</i> (RPPs) 3/ 3 <i>tet</i> seulement chez les Gram-
Aminoglycosides Streptomycine Kanamycine Gentamicine Néomycine Amikacine	-Inhibition de la synthèse protéique -Altération des membranes cellulaires bactériennes	1-/Inactivation par modification enzymatique 2-/Production de 16S rRNA méthylases 3-/Autres : -Efflux actif -Diminution de la perméabilité -Altération du ribosome	1-1/ Adényltransférases/ Nucleotidyltransférases (ANT/AAD) 1-2-/Acétyltransférases (AAC) 1-3-/ Phosphotransférases (APH) 2-/ Methyltransférases (MET)	1-1/ <i>strA-strB</i> , <i>aadA1a</i> , <i>aadA1b</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadB</i> , <i>ant</i> , <i>sph</i> 1-2-/ <i>aacA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aac(6')</i> 1-3-/ <i>aph</i> 2-/ <i>arm</i> , <i>npm</i> , <i>rmt</i> , <i>spc</i>
Phénicolés Chloramphénicol Florfenicol	-Inhibition de la synthèse protéique par interaction avec les ribosomes 70S	1-/ Inactivation enzymatique 2-/ Efflux	1-/Chloramphénicol Acétyltransférases type A et B 2-/ Chloramphénicol exporter	1-/ <i>catA1</i> , <i>catA2</i> , <i>catA3</i> , <i>catB</i> 2-/ <i>cmIA</i> , <i>floR</i> , <i>fexA</i> , <i>cmrA</i>
Triméthoprime	-Inhibition de de la dihydrofolate réductase (DHFR) chromosomique par compétition de son site de fixation bactérien	Acquisition d'un gène non-allélique semblable à DHFR situé sur un plasmide pour induire une voie métabolique alternative	Dihydrofolate réductases alternatives de classe A et B insensible aux antibiotiques	<i>dfrA1</i> , <i>dfrA5</i> , <i>dfrA7</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrA17</i> <i>dfrB1</i> , <i>dfrB2</i> , <i>dfrB3</i>
Sulfamides	-Inhibition de de la dihydroptéroate synthase (DHPS) chromosomique par compétition de son site de fixation bactérien	Acquisition d'un gène non-allélique semblable à DHPS situé sur un plasmide pour induire une voie métabolique alternative	Dihydroptéroate synthase alternative	<i>Sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>
Macrolides Azithromycine	-Inhibition de la synthèse protéique. Cette inhibition a lieu par l'attachement à la sous unité ribosomale 50S de la bactérie	1-/Méthylases d'ARNr pour protéger la cible 2-/ Efflux actif 3-/Inactivation enzymatique	1-/Méthylases d'ARNr 2-/Pompes à efflux 3-1/Estérases 3-2/Phosphotransférases codées par un plasmide	1-/ <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> 2-/ <i>msr(A)</i> , <i>mef(A)</i> 3-1/ <i>ere(A)</i> , <i>ere(B)</i> 3-2/ <i>mph(A)</i> , <i>mph(B)</i> , <i>mph(D)</i>

2.2.2.1 Mécanismes de résistance à l'azithromycine

Les macrolides agissent par l'inhibition de la synthèse protéique. Cette inhibition a lieu par l'attachement à la sous unité ribosomale 50S de la bactérie (Weisblum, 1995; Roberts, 2002). La résistance à l'azithromycine a déjà été rapportée chez des bactéries à coloration de Gram négative parmi lesquelles *E. coli* (Akiba et al., 1960) et récemment chez *Shigella sonnei* (Boumghar-Bourtchai et al., 2008). Les mécanismes de résistance à l'azithromycine sont les suivants : (i) le plus commun, qui est la production de méthylases d'ARNr, codé par les gènes *erm*(A), (B), (C) ; (ii) les pompes à efflux codés par les gènes *msr*(A), *mef*(A) ; (iii) l'inactivation des macrolides par les estérases codées par les gènes *ere* (A), (B) et les phosphotransférases codées par les gènes *mph*(A), (B) et (D).

Le gène *mph*(A) porté par un plasmide et conférant la résistance à l'azithromycine a été détecté chez la souche de *Shigella sonnei* UCN59. Il était à l'origine de l'échec thérapeutique observé lors d'une épidémie de shigellose à Paris en 2007 (Boumghar-Bourtchai et al., 2008). Ce gène a également été détecté au niveau de souches d'*E. coli* multirésistantes ou non, isolées dans des fèces prélevés d'humains sains à travers le monde (Phuc Nguyen et al., 2009).

Pourquoi étudier la résistance à l'Azithromycine?

L'azithromycine en se fixant à la sous unité ribosomale 50S de la bactérie, inhibe la synthèse des toxines protéiques par les bactéries et donc la synthèse des shigatoxines chez *E. coli* (Ohara et al., 2002; Pedersen et al., 2008; McGannon et al., 2010). L'usage de l'azithromycine a montré un effet bénéfique sur la réduction du portage chez les patients infectés par les EHEC entéroaggrégative O104:H4 (voir ci-avant le traitement des EHEC). Un groupe de travail du Haut Conseil de Santé Publique étudie la pertinence de l'utilisation de cet antibiotique chez des patients atteints de diarrhée associée aux EHEC. Une étude récente sur la détermination de la résistance de 508 souches EHEC cliniques a montré que toutes étaient sensibles (CMI<16 mg/L) à l'exception de deux souches atypiques (Jost et al., 2016).

Conclusion 2.2.2 Les gènes de la résistance d'E. coli et intérêt pour l'étude expérimentale

Le mécanisme de résistance le plus répandu chez E. coli est l'inactivation enzymatique. C'est le cas de la résistance à plusieurs antibiotiques qui sont utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment, les aminoglycosides, céphalosporines, fluoroquinolones et sulfamides. Les gènes de résistance à ces antibiotiques sont disséminés chez les E. coli isolées d'animaux et d'humains. Les gènes bla_{CTX-M} et PMQR sont souvent détectés chez des E. coli multirésistantes impliquées dans des infections nosocomiales et communautaires. De plus en

plus, ils sont retrouvés chez les animaux d'élevage, notamment chez les bovins. Les gènes de résistance (présentés dans le tableau II.2.2) peuvent participer à la dissémination de la résistance par des phénomènes de cosélection ou résistance croisée.

Par ailleurs, l'azithromycine est l'un des rares antibiotiques utilisés contre les infections associées aux EHEC. Dans le cadre de ce travail de thèse, pour contribuer à l'évaluation du risque pour la santé publique dû à la dissémination environnementale d'E. coli potentiellement pathogènes et/ou résistantes nous avons recherché la présence des principaux gènes de résistance du tableau 3. Nous avons également caractérisé, chez des souches STEC du top 5 isolées de fèces de bovins, le niveau de résistance à l'azithromycine.

2.3 Les éléments génétiques mobiles

Les gènes de résistance sont communément associés à des éléments génétiques mobiles (EGM). Ils sont appelés « mobilome ». Les bactéries disposent d'un matériel génétique permettant le flux de gènes de résistance via des EGM qui sont : les plasmides, les transposons et les intégrons. Ces flux peuvent avoir lieu non seulement entre bactéries d'une même espèce et d'un même genre mais aussi entre plusieurs genres bactériens. Les EGM sont variablement présents dans la population bactérienne, par conséquent ils ne portent pas d'éléments essentiels pour le fonctionnement bactérien.

En principe, les gènes de résistance peuvent être acquis à partir de n'importe quelle source, mais en pratique le flux de gènes est probablement structuré par l'écologie, et selon les espèces qui partagent les mêmes niches écologiques et sources similaires de gènes de résistance. C'est le cas du mobilome qui lie les entérobactéries, dont les *E. coli*, présentes chez les humains et l'environnement (Wellington et al., 2013).

Dans le cadre de ce travail de thèse dédié à l'évaluation de la contamination des effluents d'abattoirs de bovins par des souches d'E. coli antibiorésistantes, nous nous sommes particulièrement intéressés aux souches porteuses d'intégrons. Nous avons évalué si le portage d'intégrons pourrait être utilisé comme indicateur pour l'évaluation du niveau de résistance des souches d'E. coli présentes dans ces effluents.

Dans la deuxième partie qui était dédiée à la caractérisation de la résistance des souches STEC, nous avons évalué s'il existait un lien génétique entre les gènes de résistance et de virulence, ayant pour support génétique des plasmides ou transposons. La question du lien spécifique entre les gènes de virulence et gènes de résistance chez les souches STEC sera davantage développée dans le chapitre 3.

Les flux de gènes de résistance peuvent survenir à 2 niveaux : intracellulaire et extracellulaire (Figure 7). Différents éléments génétiques sont impliqués à chaque étape.

-Au niveau intracellulaire

Les gènes de résistance peuvent se déplacer à l'intérieur du génome d'une bactérie, y compris entre le chromosome et les plasmides ou les phages. Les EGM majeurs impliqués dans les flux intracellulaires de gènes de résistance sont les transposons et les intégrons. Ces flux reposent sur des recombinaisons homologues et non-homologues (Boerlin and Reid-Smith, 2008).

-Au niveau intercellulaire

Les flux intercellulaires (entre au moins deux bactéries) de gènes de résistance sont appelés transfert horizontal de gènes (THG). Les trois principaux mécanismes impliqués dans le THG sont les suivants : la transformation (acquisition d'ADN nu d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse), la transduction (transfert de gènes de résistance par des bactériophages), et la conjugaison (transfert par les plasmides ou autres EGM conjuguatifs) (Aarestrup, 2006; Schwarz et al., 2006).

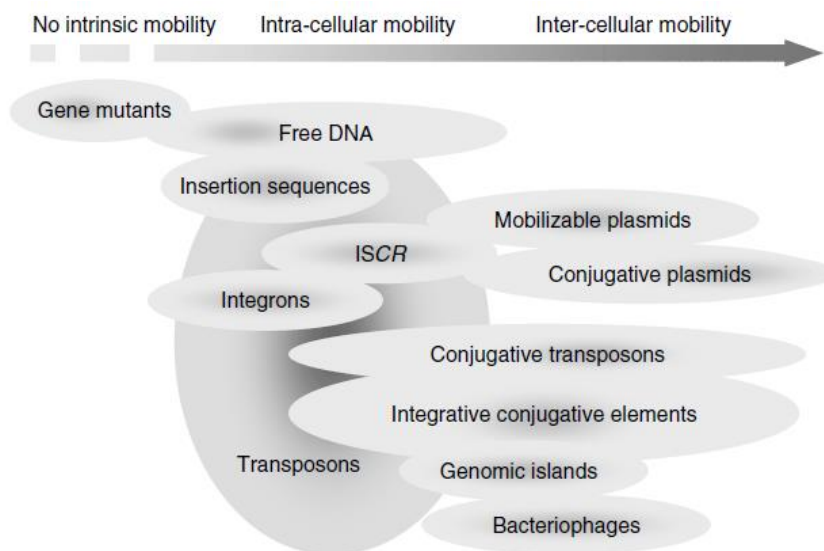


Figure 7. Mécanismes moléculaires et EGM impliqués dans la dissémination de gènes d'antibiorésistance.

Les ISCR correspondent aux séquences d'insertion de classe atypiques avec des régions communes (« atypical class of insertion sequences with common regions »). Inspiré de (Boerlin and Reid-Smith, 2008).

2.3.1 Les intégrons mobiles ou de résistance

Les intégrons sont des acteurs majeurs de la dissémination mondiale de l'antibiorésistance, car ils sont capables de capturer et exprimer divers gènes de résistance. Ils sont souvent encastés sur des transposons ou plasmides ; ce qui, couplé à leur avantage sélectif grâce aux gènes de résistance qui leur sont associés, facilite leur transfert horizontal chez un nombre important d'agents pathogènes (Rowe-Magnus et al., 2002; Davies, 2007; Gillings et al., 2008a). Ils ont été caractérisés et nommés par Stokes et Hall en 1989 (Stokes and Hall, 1989).

Contrairement aux transposons, ils utilisent un système de recombinaison spécialisé.

-Structure générale des intégrons

Ils sont constitués d'un système de recombinaison spécialisé et de courtes séquences d'ADN, sous forme de cassettes mobiles de gènes de résistance appelées « *Gene Cassettes* » (GCs) (Figure 8).

Le système de recombinaison spécialisé est constitué :

- Du gène *int* (*intI*) qui code pour une enzyme de recombinaison site-spécifique appelée intégrase (Hall and Collis, 1995). L'intégrase intervient dans la capture ou l'excision des cassettes de gènes, en catalysant la recombinaison entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* correspondant présent au niveau de la cassette.
- Du site de recombinaison ou d'insertion de cassettes de gènes (*attI*).
- Du promoteur Pc, à partir duquel les cassettes insérées sont exprimées.

Les GCs sont des molécules d'ADN double-brin, non-autorépliquatives qui peuvent être sous forme linéaire, intégrée à un intégron ou sous forme circulaire fermée libre (Collis and Hall, 1992).

Elles sont composées d'1 ORF (Open Reading Frame) et d'un site de recombinaison appelé «59 base element site » (*attC* ou 59-be). Deux types de recombinaison peuvent se produire : entre les sites *attI* et *attC*, catalysée par *intI* et résultant en l'insertion des GCs, et entre 2 sites *attC* résultant en l'excision des GCs (Mazel, 2006). Les GCs ne possèdent pas de promoteurs pour l'expression des gènes de résistance qu'elles portent. Par conséquent, les gènes sont exprimés grâce au Pc de l'intégron. C'est donc la cassette intégrée en dernier, la plus proche du Pc, qui aura le plus haut niveau d'expression (Collis et al., 1993; Collis and Hall, 2004).

Parmi les GCs décrites, plus de 130 confèrent la résistance aux antibiotiques et plus de 60 GCs codent pour des fonctions encore inconnues (Partridge et al., 2009). La plupart des gènes

impliqués dans la résistance à pratiquement toutes les familles d'antibiotiques peuvent être encastrés dans des GCs (les principaux gènes de résistance sont présentés dans le tableau 3).

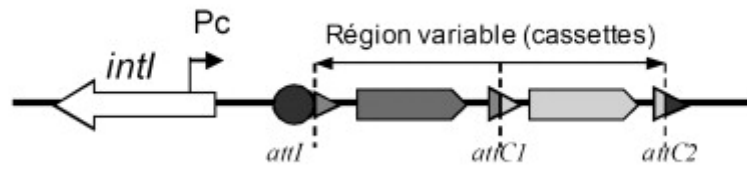


Figure 8. Organisation générale d'un intégron.

Un intégron est composé d'une plateforme fonctionnelle avec trois éléments clés : un gène *intI*, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur *Pc*. Une région dite variable, localisée en aval de la plateforme fonctionnelle, renferme un réseau de cassettes. *Pc* : promoteur des cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI* : gène de l'intégrase (Jove et al., 2010; Barraud and Ploy, 2011).

-Groupes d'intégrons

Deux groupes d'intégrons ont été décrits :

-Les intégrons chromosomiques (IC) qui sont localisés sur le chromosome et généralement décrits chez les bactéries marines telles que *Xanthomonas* spp. (Gillings et al., 2005) et des bactéries du sol, telles que *Pseudomonas stutzeri* (Holmes et al., 2003). Sur les 90 classes distinctes d'intégrons qui ont été décrites, la majorité sont des IC (Mazel, 2006; Boucher et al., 2007). Ils sont aussi appelés « super intégrons » car ils peuvent intégrer plus de 100 GCs, qui codent principalement pour des fonctions inconnues (Rowe-Magnus et al., 2002).

-Les intégrons mobiles (IMs) sont « rendus mobiles » par des transposons et/ou plasmides qui promeuvent leur dissémination. Ils ne peuvent contenir qu'un maximum de 10GCs qui codent en majorité pour la résistance aux antibiotiques, d'où leur appellation « intégrons de résistance » (Recchia and Hall, 1995; Stokes et al., 1997). Ils sont plus prévalents dans les communautés bactériennes qui sont exposées de façon directe ou indirecte à la pression antibiotique dans les milieux hospitaliers, agricoles et environnementaux (Skurnik et al., 2005; Daikos et al., 2007; Luo et al., 2010; Kristiansson et al., 2011; Amos et al., 2015). Chez les bovins, des *E. coli* porteuses d'IMs ou de résistance ont été retrouvées dans des échantillons de fèces (Barlow et al., 2009).

En ce qui concerne les *E. coli*, ce sont donc les IMs qui présentent plus d'intérêt.

-Classes d'intégrons

En fonction de la composition en acides aminés de l'intégrase, cinq classes d'intégrons mobiles ont été décrites : les classes 1, 2, 3, 4 et 5 (Cambray et al., 2010). Les intégrons de classes 1, 2 et 3 sont les plus détectés, tandis que les classes 4 et 5 ont rarement été détectées (Hochhut et al., 2001) (Tableau 4)

-Les intégrons de classe 1 (IM1)

L'apparition des IM1 sur plusieurs plasmides et transposons chez des souches bactériennes a coïncidé avec l'usage massif des antibiotiques (Stokes et al., 1997; Davies, 2007). Ce sont les plus détectés actuellement (40 à 70%) au sein des bactéries pathogènes à coloration de Gram négative isolées chez les patients (Martinez-Freijo et al., 1998; Fluit and Schmitz, 2004). C'est le cas des souches d'*E. coli* résistantes qui ont été isolées chez des patients aux Pays-Bas (van Essen-Zandbergen et al., 2007). Les mêmes fréquences sont observées chez des bactéries commensales et pathogènes telles que *Salmonella enterica* et *E. coli* isolées chez les animaux d'élevage (Goldstein et al., 2001; Ebner et al., 2004).

De plus, ils sont en majorité responsables de l'émergence de souches multirésistantes dans le milieu hospitalier, qui ont entraîné des infections nosocomiales (Gillings et al., 2009).

La séquence *intI1* est très conservée chez les IM1s détectés dans les isolats cliniques (Gillings et al., 2008b). Ils sont constitués d'une plateforme fonctionnelle comprenant 2 régions terminales invariables appelées séquences constantes ou CS (3'-CS et 5'-CS), ainsi qu'une région hautement variable centrale qui comprend les GCs (Bennett, 2008) (Figure 9).

L'extrémité 5'-CS comprend les gènes *intI1*, *attI* et le promoteur Pc, tandis que la région 3'-CS est parfois absente chez certains IM1s (Betteridge et al., 2011). Par conséquent, la recherche de sa présence lors de la caractérisation des IM1s peut entraîner un biais de détection.

La région 3'-CS est composée des gènes *qacEΔ1* conférant la résistance aux ammoniums quaternaires (Paulsen et al., 1993), suivie du gène *sulI* conférant la résistance aux sulfamides et de 2 autres gènes appelés *orf5* et *orf6* codant pour des fonctions inconnues.

Entre les régions terminales 3'CS-5'CS des IM1s, les gènes de résistance les plus fréquents dans les GCs sont ceux décrits dans le tableau 3.

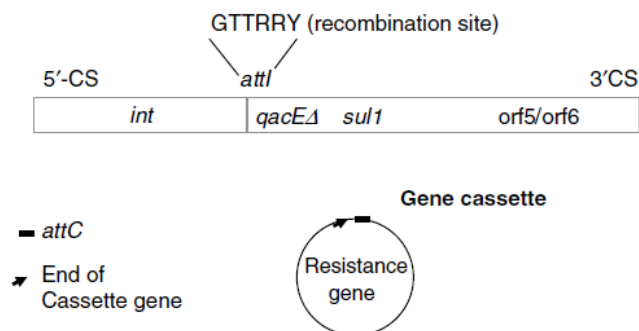


Figure 9. Représentation graphique d'un intégron de classe 1.

Pour leur mobilisation, les IM1 sont fréquemment associés aux transposons non-fonctionnels dérivés de Tn402, communément détectés dans des souches cliniques. D'où l'appellation d'« intégrons cliniques » pour les IM1s (Gillings et al., 2009).

Des plasmides et d'autres larges transposons de la famille des Tn3 (Tn21 et Tn1696) (Liebert et al., 1999; Labbate et al., 2009; Djordjevic et al., 2013) et Tn7 (Hansson et al., 2002) arborent et mobilisent les IM1s. Ils jouent ainsi un rôle majeur dans la dissémination de l'antibiorésistance par les IM1s (Figure 10).

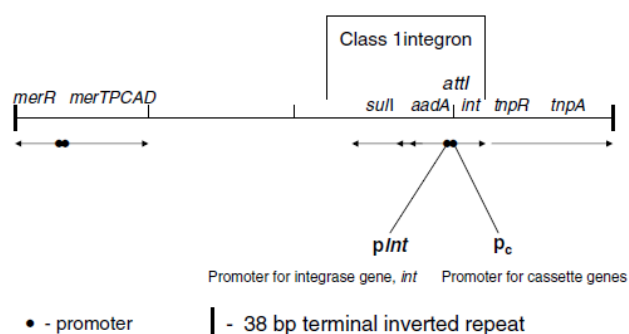


Figure 10. Schéma d'un Tn21 impliqué dans la mobilisation des IM1s.

De (Boerlin and Reid-Smith, 2008).

-Les IM2s sont le second groupe d'IMs les plus décrits. Ils sont transportés par le Tn7. Leur gène d'intégrase *int2* est interrompu par un codon stop rendant l'intégrase 2 tronquée, donc non fonctionnelle. Les GCs intégrées dans les IM2s sont donc généralement stables et principalement composées d'un arrangement de GCs constant, qui sont *drfA1*, *sat2*, *aadA1* qui confèrent la résistance au triméthoprim, à la streptothricine, la streptomycine, et la spectinomycine, et *orfX* qui code pour des fonctions inconnues (Hansson et al., 2002). Néanmoins, des IM2s contenant des GCs différentes ont été décrits (Biskri and Mazel, 2003; Ahmed et al., 2005; Ramirez et al., 2005; Gassama Sow et al., 2010), et des IM2s contenant des

intégrases fonctionnelles ont déjà été rapportées (Barlow and Gobijs, 2006; Marquez et al., 2008).

-Les IM3s sont rarement détectés et peu d'études existent au niveau de souches cliniques antibiorésistantes (Barraud and Ploy, 2011). Cependant, ils sont énormément présents dans l'environnement et représentent une source important de dissémination de GCs (Stalder et al., 2012). Ils ont été détectés pour la première fois au Japon en 1995 dans une entérobactérie. Il s'agissait de la souche *Serratia marcescens* résistante aux carbapénèmes (GC=*bla*_{IMP-1}) (Arakawa et al., 1995). Au Portugal, un IM3 contenant le réseau GC *bla*_{GES} a été décrit au niveau d'une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* présentant un phénotype de résistance aux C3G-C4G (Correia et al., 2003).

Tableau 4. Principales classes d'intégrons de résistance (IM) et intérêt épidémiologique.

Classes d'IMs	Particularités	Intérêt épidémiologique
IM1	-Plus prévalents -GCs variables	-Associés aux bactéries à coloration de Gram négative d'intérêt clinique -Associés aux infections nosocomiales -Les plus détectés dans l'environnement et chez les animaux d'élevage -Enjeu majeur pour la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement
IM2	-La plupart des GCs stables -La plupart des intégrases 2 sont non fonctionnelles	-Rôle moins important dans l'antibiorésistance clinique -Cependant, leur présence dans les écosystèmes environnementaux → risque de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement
IM3	-Recherche rare -GC contenant les gènes de résistance β-lactamines et certains aminosides (tobramycine, netilmicine, amikacine)	-Rarement détectés -Cependant, leur présence dans les écosystèmes environnementaux → risque de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement
IM4 & IM5	-Peu de recherche. -Détection chez <i>Vibrio cholerae</i>	-Rarement détectés -Cependant, leur présence dans les écosystèmes environnementaux → risque de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement

Conclusion 2.3.1 : Les intégrons de résistance chez *E. coli* et intérêt pour l'étude expérimentale

Les intégrons de résistance, plus particulièrement ceux de classe 1, jouent un rôle majeur dans la dissémination d'E. coli antibiorésistantes. Ils représentent des marqueurs d'intérêt pour l'investigation de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques car : ce sont des éléments génétiques qui partagent la même structure simple, ils sont impliqués dans la mobilisation des cassettes de gènes de résistance, ils peuvent être associés à d'autres éléments génétiques mobiles et sont efficaces pour la capture des gènes de résistance aux antibiotiques.

Ils sont plus prévalents dans les communautés bactériennes qui sont exposées de façon directe ou indirecte à la pression antibiotique dans les milieux hospitaliers, agricoles et environnementaux. Les E. coli en font partie, par conséquent, le risque pour la santé publique lié à leur présence dans l'environnement doit être évalué. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la recherche des principales classes d'intégrons de résistance: IM1, IM2 et IM3.

2.3.2 Les transposons de résistance

Les transposons de résistance sont des systèmes de « gènes sautants » capables d'incorporer une diversité de gènes de résistance. Les transposons de résistance sont distingués par leur structure, leur proximité génétique, leur mécanisme de transposition et les gènes de résistance qu'ils transportent (Bennett, 2005; Bennett, 2008).

Leur mouvements sont intra et intermoléculaires. Ils peuvent sauter d'un site à l'autre à l'intérieur d'une même molécule d'ADN, ou d'une molécule d'ADN à l'autre (par exemple d'un plasmide à l'autre ou d'un plasmide au chromosome et *vice versa*). La grande majorité de ces mouvements ne nécessitent pas d'homologie d'ADN entre les transposons et les sites d'insertion. Ils s'insèrent sur de nouveaux sites plus ou moins aléatoirement mais quelques exceptions ont été rapportées (Craig, 1997). Les transposons sont classés en transposons composites et transposons complexes.

Les transposons composites sont des systèmes modulaires flanqués d'une paire de séquences d'insertions (IS) aux deux extrémités et d'un ADN central contenant les gènes de résistance. C'est le cas des transposons Tn5 codant pour la combinaison de résistance kanamycine-bléomycine-streptomycine, et du Tn10 codant pour la résistance aux tétracyclines.

La présence d'IS à différents sites des plasmides, confère aux transposons composites la possibilité de migrer et de déplacer des gènes de résistance vers de nouveaux sites à l'intérieur d'un même plasmide.

Les transposons complexes ne sont pas construits de façon modulaire. Mais, leur construction précise n'est pas entièrement élucidée (Figure 11). Ils sont probablement plus anciens que les transposons composites et sont le résultat de multiples évènements de recombinaisons qui ont conduit à l'élimination de fonctions non-essentiels. Ils sont donc plus compacts et par conséquent, plus facilement transposables que les transposons composites.

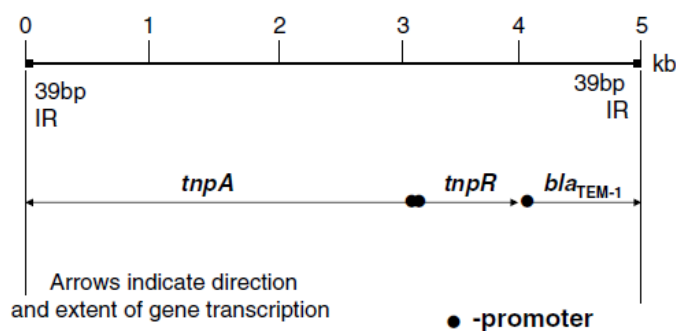


Figure 11. Représentation d'un transposon complexe de résistance Tn3.

Il confère la résistance à l'ampicilline et à d'autres β -lactamines. A l'extrémité des transposons, se trouvent les séquences inversées répétées IR, essentielles pour la transposition de Tn3. Le gène *tnpA* code pour la transposase et *tnpR* code pour une recombinase site-spécifique. Le gène *bla_{TEM-1}* code pour la β -lactamase de type TEM-1.

Les transposons Tn3 et Tn21 sont des exemples de transposons complexes. Ils sont communément détectés sur les plasmides des entérobactéries. Le premier d'environ 5 kb code pour la résistance à plusieurs β -lactamines, dont l'ampicilline. Le second, Tn21, d'environ 20 kb code pour l'association des phénotypes de résistance suivants : streptomycine-spectinomycine-sulfamide-ion mercurique.

Récemment, un Tn21 de 22,6 kb, a été détecté au niveau d'un plasmide de résistance pO26-CRL₁₂₅ isolé d'une souche clinique EHEC O26:H- résistante à l'ampicilline, la kanamycine, la néomycine, la streptomycine, au sulfathiazole, au triméthoprim, à la tétracycline et au chlorure de mercure (Venturini et al., 2013) (Figure 12). Le Tn21 codait pour la résistance au triméthoprim (*dfrA5*) et au chlorure de mercure (opéron *mer*). Il contenait également un intégron de classe 1 dont l'extrémité 3'CS était tronquée à cause de l'intégration d'un autre transposon Tn6026 portant la copie d'un autre transposon (Tn6029). Sur le Tn6029, étaient présents les gènes *strA-strB* et *sulI* codant pour la résistance à la streptomycine et au sulfathiazole, un Tn2 tronqué portant le gène *bla_{TEM-1}* codant pour la résistance à l'ampicilline et une copie du Tn4352 portant le gène *aphA1* codant pour la résistance à la kanamycine.

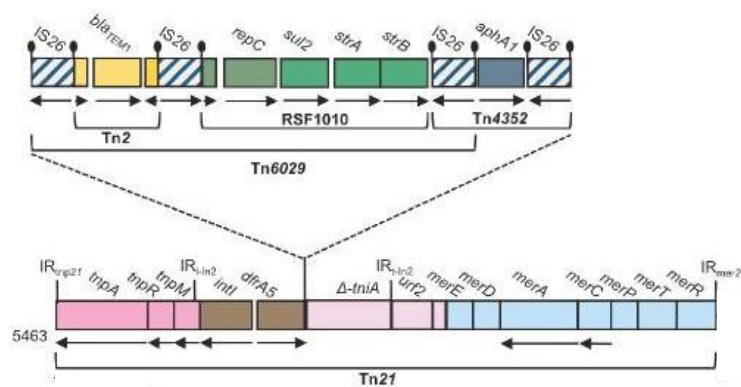


Figure 12. Carte du transposon Tn21 porté en copies identiques par le plasmide de virulence des EHEC pO26-CRL₁₁₁ et les plasmides de résistance pO26-CRL₁₂₅ et pO111-CRL₁₁₅. Les plasmides pO26-CRL₁₁₁ et pO26-CRL₁₂₅ étaient présents dans la même souche clinique EHEC O26:H- multirésistante. De (Venturini et al., 2013).

Conclusion 2.3.2 : Les transposons de résistance et intérêt pour la partie expérimentale

Les transposons de résistance sont des éléments génétiques facilement mobilisables qui disséminent les gènes de résistance aux antibiotiques de façon intra et interbactérienne. Ils peuvent se retrouver sur des plasmides de virulence chez des souches hautement pathogènes. Leur présence chez des STEC isolées de fèces de bovins peut être source de cosélection lors du traitement antibiotique des animaux porteurs. Le séquençage des plasmides de virulence des EHEC multirésistantes est utile pour comprendre l'origine et l'évolution de la résistance chez les souches EHEC.

2.3.3 Les plasmides de résistance

Les plasmides sont des fragments d'ADN double brin circulaires, auto-répliquatifs de façon autonome ; ce sont les vecteurs les plus communs de la transmission de gènes de résistance (Bennett, 2008). Des méthodes d'épidémiologie moléculaire permettent de mettre en évidence le rôle des plasmides dans l'antibiorésistance (Carattoli, 2009). Plusieurs plasmides de résistance d'origine humaine et animale ont été détectés et étudiés chez les *E.coli* multirésistantes (résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques). Certains sont présents chez des souches hautement pathogènes.

En effet, des plasmides de résistance ont été détectés chez la souche clinique uropathogène multirésistante *E. coli* O25:H14-ST131 qui est disséminée de façon pandémique. Ces plasmides de résistance ont été décrits comme codant pour des gènes de résistance aux C3G et C4G

(*bla*_{CTX-M-15}), à d'autres β-lactamines (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}), et aux quinolones (*aac*(6')-*Ib-cr*). Cette souche est retrouvée en France (Marcade et al., 2009), au Royaume-Uni (Hopkins et al., 2006), en Australie (Zong et al., 2008) et dans plusieurs autres pays.

Des plasmides de résistance ont également été décrits chez des souches d'*E. coli* d'origine bovine et humaine, ils étaient porteurs des gènes *bla*_{CMY-2} (Carattoli et al., 2006; Mulvey et al., 2009), et *bla*_{CTX-M-14} (Liebana et al., 2006; Navarro et al., 2007). Un total d'environ 200 plasmides codant des gènes de résistance aux antibiotiques critiques en médecine humaine ont été décrits.

Conclusion 2.3.3: Les plasmides de résistance et intérêt pour la partie expérimentale

La majorité des plasmides étudiés chez E. coli sont des plasmides de résistance aux antibiotiques. Certains plasmides de résistance ont été décrits chez des souches STEC cliniques. Il a été montré qu'un plasmide de virulence pouvait contenir de multiples gènes de résistance chez une souche EHEC clinique. Nous nous sommes donc intéressés au cours de ce travail de thèse à la localisation de marqueurs de virulence et de résistance pour les souches STEC du top 5 multirésistantes.

2.4 Lien entre les intégrons et la résistance phénotypique chez *E. coli*

En médecine humaine, vétérinaire ou dans des études environnementales, il a été démontré que les bactéries « hébergeant » des intégrons présentaient souvent des phénotypes de multirésistance aux antibiotiques (Stalder et al., 2012). Cependant, lors de l'étude de la relation entre la présence d'intégrons et des phénotypes d'antibiorésistance chez les *Enterobacteriaceae*, certaines techniques de détection et de quantification peuvent limiter l'interprétation des résultats.

En effet, quand les méthodes de quantification d'intégrons sont associées à des étapes préalables de culture bactérienne, seules 1% des espèces bactériennes présentes dans les prélèvements sont en général isolées et peuvent donc être étudiées (Amann et al., 1995). En revanche, la combinaison d'analyses métagénomiques (détermination directe de l'abondance relative des gènes *intI* au niveau de l'ADN total extrait de plusieurs écosystèmes environnementaux), et de cultures bactériennes pourrait permettre de s'affranchir des limites des méthodes dites « culture dépendantes ». Cependant, les analyses métagénomiques détectent tous les ADNs bactériens présents dans les prélèvements ; elles ne sont donc pas représentatives de l'incidence d'une population bactérienne particulière.

Par ailleurs, certains auteurs détectent les IMs1 par amplification de la région conservée « 3'CS ». Or, si cette région est bien présente dans la majorité des intégrons de classe 1, elle peut être absente dans certains intégrons et cette approche peut alors créer des biais lors de la recherche des intégrons (Stalder et al., 2012). D'où l'intérêt de l'usage d'une technique de PCR en temps réel permettant de détecter spécifiquement les principaux gènes d'intégrase : *int1*, *int2* et *int3* (Barraud et al., 2010).

Le lien intégrons-phénotype de résistance est aussi dépendant des origines génétiques de la résistance. En effet, les gènes codant pour la résistance peuvent être portés soit par les GCs présentes sur l'intégron, soit par d'autres régions des plasmides ou transposons transportant les intégrons. De plus, dans les communautés bactériennes des eaux usées, les GCs associées aux intégrons peuvent posséder de nombreux gènes codant pour des déterminants de fonctions métaboliques, mais aussi de fonctions inconnues (*orfX*) (Partridge et al., 2009).

Dans les prélèvements d'origine animale, le lien entre la présence d'intégrons et les phénotypes de résistance reste encore à élucider. En effet, dans une ferme bovine, 4,9% des *E. coli* isolées dans les fèces de bovins étaient porteuses d'IMs1, tandis que 27,3% étaient résistantes à l'ampicilline (Hoyle et al., 2006). A l'opposé, dans une étude sur des entérobactéries isolées de prélèvements de sols dans des fermes bovines, 45,8% étaient porteuses d'intégrons alors que 4,2% et 37,5% étaient respectivement résistantes à la streptomycine et à l'oxytétracycline (Srinivasan et al., 2008). En outre, Moura et ses collaborateurs ont montré au niveau d'effluents d'abattoirs que les GCs détectées n'expliquaient pas la totalité des phénotypes de résistance observés (Moura et al., 2007).

Conclusion II.4 : Lien entre intégrons et résistance phénotypique chez E. coli et intérêt pour l'étude expérimentale

*Les prévalences d'E. coli résistantes à des antibiotiques sont parfois élevées tandis que la présence d'intégrons est faible ou l'inverse. Les méthodes de détection des intégrons sont variées et certaines peuvent biaiser l'interprétation des résultats. Toutes les GCs ne confèrent pas la résistance aux antibiotiques. La corrélation entre la présence d'intégron et le niveau de résistance fait encore polémique et de nouvelles études sont nécessaires pour préciser les données actuelles. Par conséquent, dans ces travaux de thèse, en plus de la recherche des principales classes d'intégrons mobiles par PCR multiplexe ciblant les gènes d'intégrase *int1*, *int2* et *int3*, nous avons également séquencé les régions variables des intégrons portés par les souches d'E. coli qui présentaient des phénotypes de résistance à plus de 6 classes d'antibiotiques.*

Chapitre 3. LIEN VIRULENCE-RESISTANCE PHENOTYPIQUE

3.1 Problématique du lien virulence-résistance chez les souches d'*E. coli* pathogènes

La question du lien entre la virulence et la résistance est complexe. Ce sujet est souvent étudié à travers la question de l'impact, bénéfique ou délétère, de l'acquisition de l'antibiorésistance par les bactéries hautement pathogènes.

Dans la revue de Beceiro et ses collaborateurs, la question du lien entre la virulence et la résistance dans une bactérie pathogène spécifique dépend des interactions entre plusieurs facteurs associés aux bactéries et à leurs environnements (Beceiro et al., 2013).

(i) Le premier facteur est l'espèce bactérienne et sa rapidité d'acquisition de la résistance. En effet, les germes acquérant rapidement la résistance, notamment les germes opportunistes vont être sélectionnés en présence d'antibiotiques et se développer plus vite. Par conséquent, dans ce cas, la virulence sera influencée par l'acquisition de la résistance.

(ii) La nature des déterminants de virulence et les mécanismes de résistance sont un autre facteur, car certains déterminants peuvent être impliqués en même temps dans la virulence et dans la résistance. C'est le cas de la pompe à efflux AcrAB-TolC chez *E. coli*, qui élimine les acides gras, les sels biliaires et aussi les antibiotiques (Ma et al., 1995; Zgurskaya and Nikaido, 1999).

(iii) Le 3^{ème} facteur est l'environnement ou la niche écologique. Ce facteur détermine l'apparition de l'infection à travers : la présence de systèmes combinés de régulation de la virulence et de la résistance, ou alors la concentration de l'antibiotique au niveau du site de l'infection.

(iv) Le 4^{ème} facteur est l'hôte. C'est l'interaction entre le système immunitaire de l'hôte et une bactérie pathogène résistante qui va influencer le développement de l'infection.

Pour Martinez et Baquero, le risque d'apparition de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes est faible, contrairement à ce qui pourrait être théoriquement attendu. En effet, théoriquement, du fait de leur pathogénicité, les bactéries virulentes seraient exposées aux antibiotiques et devraient présenter un risque élevé d'acquisition de la résistance, mais c'est souvent le contraire qui est observé (Martinez and Baquero, 2002). Cette revue évoque plusieurs raisons pour expliquer ce phénomène.

(i) La première raison est que le possible coût biologique (« *fitness cost* ») de l'antibiorésistance compensé grâce à des mutations compensatoires chez les bactéries opportunistes (Lenski, 1997;

Bottger et al., 1998; Levin et al., 2000), n'est pas toujours toléré chez les bactéries pathogènes spécialisées car certaines mutations compensatoires peuvent être délétères (Andersson and Hughes, 1996).

(ii) Les bactéries hautement pathogènes évoluent dans des environnements protégés non ouverts à la compétition ou à l'exposition à des antibiotiques naturels.

(iii) Après le traitement antibiotique, le nombre absolu de bactéries pathogènes diminue comparativement aux bactéries commensales homologues, par conséquent leur chance d'être exposées aux antibiotiques et d'acquérir l'antibiorésistance devrait être faible.

(iv) La 4^{ème} raison serait que la bactérie pathogène spécialisée est confinée à une niche écologique particulière et donc elle est moins sujette à la pression de sélection antibiotique.

L'émergence de la résistance dans une population bactérienne pathogène est donc liée à différents facteurs, dont les plus critiques sont : la fréquence des mutations suite à la résistance, l'acquisition des gènes de résistance et le coût pour le « fitness » de la bactérie.

Le lien génétique entre la virulence et la résistance a été montré comme présentant un important bénéfice pour certaines souches d'*E. coli* chez l'homme et chez le porc, notamment pour les *E. coli* pathogènes extraintestinales (ExPEC) multirésistantes épidémiques (Da Silva and Mendonca, 2012; Wyrsh et al., 2016). En effet, en présence de pression de sélection antibiotique, les germes pathogènes résistants vont être rapidement sélectionnés et l'effet du coût biologique de la résistance sera secondaire à la forte pression antibiotique (Beceiro et al., 2013), ainsi le clone épidémique peut devenir prédominant. L'exemple le plus connu, où le lien entre la virulence et la résistance a bien été illustré, est le clone épidémique international ExPEC O25:H4-ST131. Cette souche portait le plasmide pEK499 contenant simultanément des gènes de résistance aux C3G-C4G (*bla*_{CTX-M}) et des gènes de virulence (Woodford et al., 2009).

3.2 Incidence des souches STEC antibiorésistantes

Très peu d'études ont étudié le lien entre la virulence et la résistance chez les EHEC. Une étude épidémiologique sur les souches d'*E. coli* à l'origine de diarrhée, conduite dans une population rurale équatorienne, a montré que la prévalence de souches antibiorésistantes était significativement plus élevée chez les *E. coli* responsables de diarrhée que chez les *E. coli* commensales (Zhang et al., 2015). Cette étude indiquait que la pression de sélection des antibiotiques et l'association génétique entre la virulence et la résistance contribuaient à la corrélation positive entre la virulence et la résistance aux antibiotiques. Dans une autre étude conduite chez des porcs sains, une association positive entre la résistance et plusieurs facteurs

de virulence *stx1*, *stx2*, *eae*, *estA*, *estB*, *elt*, *aidA-1* et *fedA1* a été démontrée chez des *E. coli* isolées de fèces (Rosengren et al., 2009).

De nombreuses études ont rapporté que des souches STEC résistantes à plus de 3 classes d'antibiotiques étaient isolées chez les bovins, chez d'autres animaux d'élevage et également chez l'homme (Schroeder et al., 2002; Bettelheim et al., 2003; Vidovic et al., 2013). Cependant, les données d'association statistique entre la virulence et la résistance semblent contradictoires.

L'étude de Vidovic et ses collaborateurs conduite sur des STEC O157 d'origine bovine et humaine a montré une association significative entre la résistance et les STEC O157 d'origine bovine. Plus précisément, la résistance à la tétracycline et au sulfixazole étaient les caractéristiques majeures de distinction associée aux STEC O157 d'origine bovine. Il était indiqué dans cette étude que l'importante résistance observée chez les STEC O157 d'origine bovine était due à la forte pression de sélection antibiotique exercée par l'utilisation des promoteurs de croissance antimicrobiens (Vidovic et al., 2013). Cette même observation a été démontrée chez des STEC O157:H7 d'origine bovine (53%) qui présentaient un pourcentage élevé de souches résistantes par rapport aux STEC O157:H7 d'origine humaine (23%) (Mora et al., 2005). Par ailleurs, l'étude d'*E. coli* O157 isolées du lait cru de bovins et petits ruminants a montré que le nombre de souches résistantes et la diversité des phénotypes de résistance aux antibiotiques étaient plus élevés chez les souches hautement pathogènes *E. coli* O157 *stx+* par rapport à celles *stx-* (Solomakos et al., 2009).

D'autres études ont montré l'absence d'association. L'étude de souches d'*E. coli* isolées dans des fèces de veaux a montré que ni les pourcentages de souches présentant des phénotypes de résistance, ni le nombre de gènes d'antibiorésistance détectés n'étaient associés avec la présence des gènes de virulence *stx2* et *eae* (Gow and Waldner, 2009). Par ailleurs, l'étude d'Ennis et ses collaborateurs a montré qu'il n'y avait pas de lien entre plusieurs sérotypes de STEC dont O157:H7 et O26:H11, et la résistance aux antibiotiques testés (Ennis et al., 2012). Enfin, l'étude de Schroeder *et al.* a montré que le pourcentage de souches STEC O157 résistantes était nettement inférieur à celui des autres *E. coli* non-STECS isolées de patients, tandis que ces pourcentages étaient similaires chez les mêmes souches isolées de bovins (Schroeder et al., 2002).

Pour les études montrant une association statistique entre la virulence et la résistance, aucune n'a étudié les mécanismes impliqués dans cette association.

3.3 Mécanismes de l'association virulence-résistance chez les EHEC

En dépit des résultats contradictoires sur le lien statistique entre la virulence et la résistance chez les STEC d'origine bovine, très peu d'études se sont focalisées sur les mécanismes du lien génétique entre les marqueurs de virulence des STEC et des gènes de résistance.

Il existe quelques études sur la caractérisation des plasmides portant les gènes qui codent pour la résistance de STEC d'origine humaine et animale (Makino et al., 1999; Arvand et al., 2015; Losada et al., 2016). Récemment, Losada *et al.* ont identifié chez des souches STEC isolées de patients et d'animaux, des plasmides porteurs de gènes de résistance aux aminoglycosides, carbapénèmes, pénicillines, céphalosporines, chloramphénicol, sulfamides, tétracyclines, et aux métaux lourds (Losada et al., 2016). Ces auteurs ont montré par le séquençage que les différents plasmides isolés de ces souches arboraient soit des gènes de virulence, soit des gènes de résistance.

A ce jour, la seule étude ayant investigué sur la localisation des gènes de résistance dans une souche EHEC O26:H- clinique multirésistante responsable de colite hémorragique, a mis en évidence que des gènes de résistance et virulence étaient colocalisés sur le plasmide de virulence des EHEC (Venturini et al., 2010). Ce plasmide de virulence multirésistant appelé pO26-CRL₁₁₁ portait le transposon de résistance Tn21 codant pour des gènes de résistance à 6 classes d'antibiotiques (*aphA1*, *strA-strB*, *sul2*, *bla*_{TEM-1}, *dfrA5* et opéron *mer*).

Une copie identique de ce Tn21 a été retrouvée, dans une étude ultérieure, au niveau du plasmide de résistance pO26-CRL₁₂₅ présent dans la même souche clinique EHEC O26:H- multirésistante. Les données de séquençage de ces 2 plasmides ont montré qu'il y a avait eu un évènement de transposition du Tn21 originaire du plasmide de résistance pO26-CRL₁₂₅ vers le plasmide de virulence pO26-CRL₁₁₁. C'est donc par cet évènement de transposition que le plasmide de virulence de la souche EHEC O26:H- était devenu multirésistant (Venturini et al., 2013).

Points clés Chapitre 3 : LIEN VIRULENCE RESISTANCE

L'acquisition de l'antibiorésistance par des souches pathogènes est un enjeu majeur de santé car elle va avoir deux effets sur les bactéries : d'une part, en cas de traitement antibiotique, la souche pathogène résistante va échapper aux défenses de l'hôte, et d'autre part la colonisation par les souches pathogènes résistantes va augmenter. Ce phénomène a bien été étudié et démontré avec les ExPEC cliniques multirésistantes, notamment le clone épidémique international multirésistant ST131. Plusieurs études ont détecté des STEC résistantes dans des fèces humains et bovins, cependant, très peu ont investigué l'association entre la virulence et la résistance chez ces souches et les mécanismes impliqués. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'impact de l'antibiorésistance sur les souches hautement pathogènes en comparant les virulences phénotypiques de souches STEC du top 5 résistantes (production de Stxs et adhésion aux cellules épithéliales) versus celles de leurs homologues sensibles aux antibiotiques testés.

Pour ce qui est du mécanisme génétique de la résistance des souches EHEC, une seule étude a mis en évidence une colocalisation de facteurs de résistance et de virulence sur le plasmide de virulence d'une souche EHEC O26:H- multirésistante isolée d'un patient. Nous nous sommes donc intéressés, dans ce travail de thèse, à la localisation des gènes de virulence et résistance de souches STEC du top 5 résistantes, afin d'explorer s'il existe ou non une association génétique entre la virulence et la résistance chez les STEC isolées de fèces de bovins.

PARTIE II. VOIES DE CONTAMINATION DE L'HOMME ET ROLE DES EFFLUENTS D'ORIGINE BOVINE

Chapitre 4. VOIES DE CONTAMINATION DE L'HOMME PAR DES EHEC ET/OU *E. COLI* ANTIBIORESISTANTES : ROLE DE L'ENVIRONNEMENT

Les hommes et les animaux partagent le même environnement et ce sont les mêmes bactéries qui sont présentes chez l'homme et l'animal, les mêmes familles d'antibiotiques qui sont utilisés et par conséquent les mêmes mécanismes d'antibiorésistance qui sont observés. L'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire est donc liée à l'augmentation de l'antibiorésistance chez les bactéries d'origine animale, mais aussi chez les bactéries d'origine humaine. En effet, plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques (par exemple aux aminoglycosides), et même à ceux d'importance critique en médecine humaine (C3G-C4G et fluoroquinolones), ont été détectés chez des souches d'*E. coli* isolées en clinique humaine ou en élevage. Des exemples de gènes de résistance transférables détectés chez les *E. coli* isolées chez l'homme et chez l'animal sont présentés dans le Tableau 5. Des supports mobiles pouvant être impliqués dans la diffusion de ces gènes de résistance entre l'animal et l'homme ont également été clairement identifiés (Bouchardon et al., 2006; Madec et al., 2012).

Tableau 5. Gènes de résistance transférables présents chez des E. coli isolées chez l'homme et chez l'animal.

Modifié à partir de (Bouchardon et al., 2006).

Antibiotique	Résistance chez les souches humaines		Résistance chez les souches animales	
	Gènes de résistance	Références	Gènes de résistance	Références
C3G	<i>bla_{CMY-1,-2,-4,-11}</i>	(Philippon et al., 2002)	<i>bla_{CMY-2}</i>	Dindes (Brinas et al., 2003; Liebana et al., 2004)
	<i>bla_{CTX-M-2,-3,-12,-15}</i>	(Eckert et al., 2004)	<i>bla_{CTX-M-2}</i>	Bovins (Shiraki et al., 2004)
	<i>bla_{CTX-M-14}</i>		<i>bla_{CTX-M-14}</i>	Volaille (Brinas et al., 2003)
Apramycine	AAC(3)IV	(Chaslus-Dancla et al., 1991; Johnson et al., 1995; Miller et al., 1997)	AAC(3) IV	Bovins (Chaslus-Dancla et al., 1986)

Le risque de transmission à l'homme de bactéries de la flore digestive animale (commensales, pathogènes et/ou résistantes), en particulier des bovins, peut apparaître à plusieurs occasions : *via* l'ingestion d'aliments d'origine animale, *via* le contact direct avec les animaux, mais aussi *via* l'environnement (Brugère et al., 2012) (Figure 13). L'environnement peut être contaminé par l'épandage d'effluents d'élevage tels que le fumier, le lisier, mais aussi par l'élimination des eaux usées contaminées dans les rivières.

Les eaux usées qui proviennent des stations d'épuration urbaines, hospitalières et des abattoirs sont rejetées dans le milieu environnant. Pour les boues qui résultent des traitements épuratoires, elles sont très souvent valorisées en engrais agricoles (Figure 13).

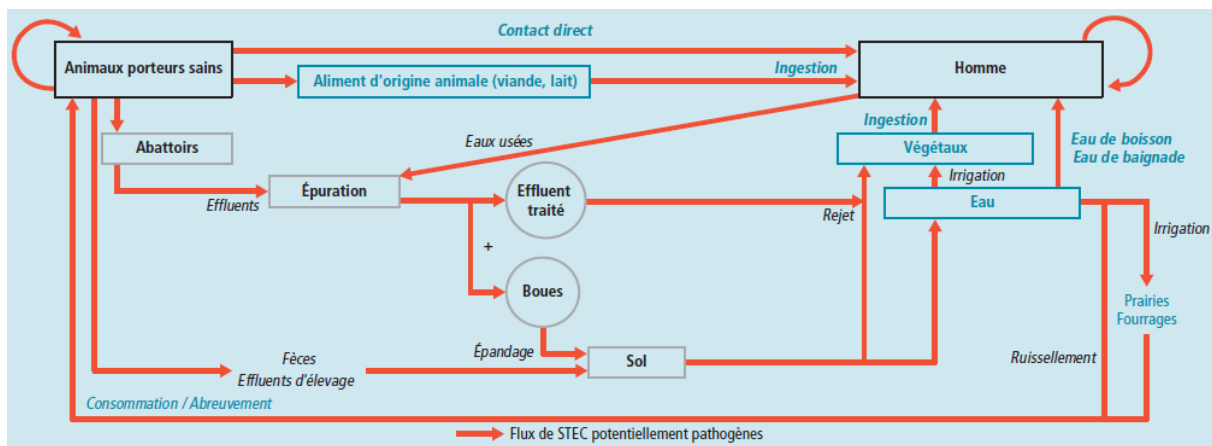


Figure 13. Relations épidémiologiques et voies de transmission des *E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistants des bovins à l'homme.

Modifié à partir de (Brugère et al., 2012).

4.1 L'environnement, lieu de Transfert Horizontal de Gènes de résistance (THG) : problème de santé publique

L'environnement est le lieu de la majorité des événements de THG (Aminov, 2011), ce qui veut dire que l'homme peut être directement exposé aux bactéries venant d'acquérir de nouveaux supports génétiques de résistance aux antibiotiques. Les lieux de THG sont donc tous les compartiments environnementaux recevant les effluents résultant d'activités humaines. Il s'agit en particulier des eaux et sols recevant les effluents des stations d'épuration (bassins de stockage des effluents de sources diverses). Les stations d'épuration sont considérées comme des « *hot spots* » pour le THG (Tennstedt et al., 2003), car elles reçoivent de nombreuses bactéries commensales du tube digestif humain et animal (écosystème varié) à travers les effluents de sources diverses : effluents hospitaliers, eaux usées domestiques, et également d'effluents d'abattoirs (Figure 14).

4.2 Dissémination d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons dans l'environnement : problème de santé publique

L'environnement est un réservoir important de gènes d'antibiorésistance et de bactéries antibiorésistantes qui sont disséminées par les activités humaines (Gaze et al., 2013; Marti et al., 2014). L'utilisation des antibiotiques pour des fins thérapeutiques humaines, vétérinaires ou agricoles (exemple la streptomycine) conduit à leur relargage dans l'environnement. De plus, l'utilisation des antibiotiques chez les humains et les animaux conduit à la sélection des bactéries antibiorésistantes dans leur tube digestif. Elles vont être rejetées dans l'environnement avec les eaux usées des animaux, des hôpitaux, des industries et avec les effluents d'élevage épandus (Pruden et al., 2013).

Les gènes de résistance sont considérés comme des « contaminants émergents », véritables « polluants environnementaux » (Rysz and Alvarez, 2004; Pruden et al., 2006). Leur dissémination avec les bactéries antibiorésistantes dans l'environnement représente un problème de santé publique. En effet, le transfert des gènes de résistance aux bactéries pathogènes pour l'homme pourrait se produire (Ashbolt et al., 2013).

Il a été démontré que dans des environnements tels que les eaux usées, les stations d'épuration, les eaux d'aquaculture, les eaux souterraines, les sédiments et le sol, les gènes de résistance étaient largement distribués (Zhang et al., 2009). Par ailleurs, l'implication des IM1s dans la dissémination environnementale de l'antibiorésistance dépasse largement le contexte clinique et est devenu un point d'intérêt crucial. En effet, la dissémination environnementale des IM1s a été mise en évidence à travers de nombreuses études, principalement dans les compartiments environnementaux recevant les effluents liés à l'activité humaine (Hardwick et al., 2008; Wright et al., 2008; Barraud and Ploy, 2011; Stalder et al., 2012) (Figure 14). Parmi ces compartiments environnementaux, les stations d'épuration des eaux usées urbaines, sont définies comme d'importants « *hot spots* » de dissémination de gènes d'antibiorésistance, de bactéries antibiorésistantes et de bactéries porteuses d'intégrons. Plus précisément, elles semblent être un réservoir majeur d'*E. coli* antibiorésistantes (Stalder et al., 2012; Bouki et al., 2013; Rizzo et al., 2013) (Figure 14).

Très peu de données sont disponibles sur les stations d'épuration d'eaux usées d'abattoirs de bovins. Celles disponibles sur les STEPs d'abattoirs se sont intéressées aux abattoirs multi-espèces et à des abattoirs de poulets (Martins da Costa et al., 2006; Moura et al., 2007; da Costa et al., 2008; Sabate et al., 2008; Moura et al., 2010).

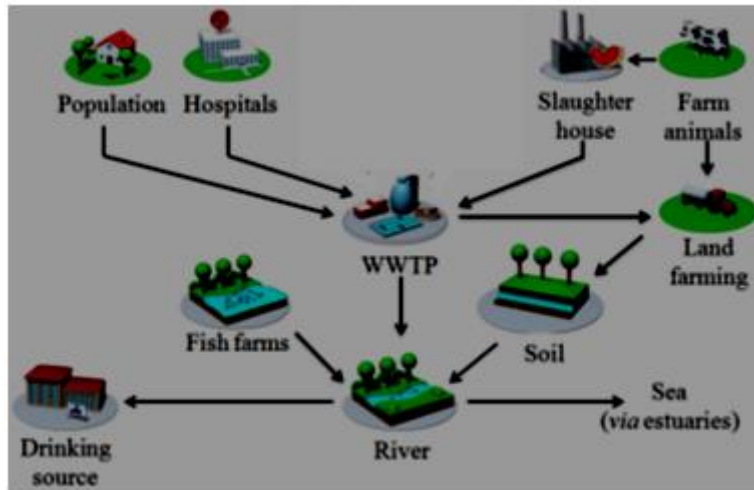


Figure 14. Circuits de dissémination des *E. coli* antibiorésistantes et intégrons dans l'environnement à partir de diverses sources.

(source : projet Pills, <http://www.pills-project.eu>).

4.3 Dissémination des EHEC dans l'environnement : problème de santé publique

L'environnement représente un réservoir et un véhicule d'infections humaines par des EHEC (Coia et al., 1998). En effet, des cas d'épidémies à EHEC associées à la consommation d'eau contaminée, ou à l'exposition à des sources environnementales contaminées sont de plus en plus rapportés (McDowell and Sheridan, 2001; Tozzi et al., 2001).

Aux USA, 10% des épidémies aux EHEC O157:H7 ont pour origine une source environnementale contaminée. Par ailleurs, la consommation de végétaux contaminés est de plus en plus associée aux infections à EHEC O157:H7 (Snedeker et al., 2009; Xicohtencatl-Cortes et al., 2009). De plus, des cas de SHU suite à la baignade dans un lac ont été associés à une souche EHEC O121 (McCarthy et al., 2001).

Il a été montré que la contamination de l'eau responsable des épidémies de SHU était très souvent d'origine animale. C'était le cas de l'épidémie de SHU à EHEC O157:H7 dans une zone rurale des USA (Wyoming), où la nappe phréatique avait été contaminée suite à l'infiltration des eaux de surface souillées par des fèces de cerfs (Olsen et al., 2002).

La contamination de l'environnement d'origine bovine a été observée au niveau d'un puits de surface, qui avait été contaminé par du fumier de bovins à la suite de pluies torrentielles (CDC, 1999). Ce rapport indiquait que le véritable nombre d'épidémies à EHEC O157:H7 dues à des sources environnementales, notamment l'eau contaminée, était très sous-estimé à cause du déficit de déclaration et de diagnostic dans la région.

Etant donné que la survie des STEC O157:H7 dans les environnements aquatiques peut varier de quelques semaines jusqu'à 10 mois, les STEC O157:H7 peuvent être transmises à l'homme *via* l'exposition à un milieu environnemental contaminé. La contamination peut aussi survenir de façon indirecte, *via* la consommation d'eau ou de produits frais provenant de sols irrigués avec de l'eau contaminée non traitée (Chekabab et al., 2013). Quelques données sur la dissémination d'EHEC *via* les stations d'épuration d'eaux usées d'abattoirs de bovins et urbaines ont déjà été rapportées (Garcia-Aljaro et al., 2004; Loukiadis et al., 2006; Ayaz et al., 2014), mais elles demeurent insuffisantes.

Points clés Chapitre 4 : VOIES DE CONTAMINATION DE L'HOMME PAR DES EHEC ET/OU E. COLI ANTIBIORESISTANTES: ROLE DE L'ENVIRONNEMENT

La transmission environnementale à l'homme de bactéries de la flore digestive des bovins, notamment les STEC et les E. coli résistantes aux antibiotiques, s'effectue par les mêmes voies. Dans l'environnement, de nombreux « hot spots » de dissémination d'E. coli antibiorésistantes et porteuses d'intégrons ont été décrits, il s'agit entre autres des stations d'épuration et des effluents d'origine animale. Par ailleurs le nombre d'infections à EHEC associées à une source de contamination environnementale est de plus en plus élevé. Les bactéries présentes dans les effluents d'origine animale contaminent l'environnement, via l'épandage des fumiers, des lisiers, ou encore des boues d'épuration de station de traitement des eaux usées, mais aussi via les effluents liquides, qui sont rejetés dans les cours d'eau à la fin des traitements épuratoires. Le risque pour la santé publique lié aux effluents d'abattoirs et d'élevage doit donc être évalué compte tenu de relations épidémiologiques existantes entre l'homme, l'animal et l'environnement. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes intéressés dans ce travail de thèse aux effluents de stations d'épuration d'abattoirs de bovins et aux fèces de bovins prélevés à l'abattoir.

Chapitre 5. LES EFFLUENTS D'ORIGINE BOVINE : SOURCES D'EHEC ET/OU *E. COLI* RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES

5.1 Nature des effluents d'origine bovine et charge bactérienne

5.1.1 Nature des effluents d'origine bovine

Dans les élevages, les effluents solides sont représentés par le fumier (mélange de matières fécales, d'urine et de paille), et les effluents liquides comprennent le lisier (mélange d'urine et d'excréments) et le purin (jus s'écoulant du fumier). Les effluents liquides d'élevage sont récoltés dans des fosses puis stockés en vue de leur épandage sur les parcours agricoles avec ou sans traitement épuratoire. Les effluents solides sont récoltés, stockés dans des fosses ou entassés à même le sol près des étables ou en bordure des parcelles à épandre.

Le lisier et le purin de stockage peuvent subir un brassage, une oxygénation/aération ou se voir ajouter des additifs (phosphates, algues) ou de l'eau. Pour le fumier, le stockage en tas correspond à un compostage incomplet (diminution de la masse organique et températures à cœur atteignant 60-70°C) (Toussaint and Dehareng, 1996).

Les effluents d'élevage peuvent subir des traitements en vue de la valorisation en amendement des sols ou engrais organique. Il existe des traitements aérobies comme le compostage, ou anaérobies comme la méthanisation qui présente un avantage supplémentaire car la matière organique peut être valorisée en énergie et chaleur utilisable ensuite au niveau de l'élevage (ADEME, 2012). Les cuves de digestion anaérobie sont des méthaniseurs ou « digesteurs ».

Quant aux abattoirs, les effluents peuvent provenir du lisier produit par les animaux pendant l'attente de l'abattage, des eaux issues du douchage de l'arrière train ou des pattes des animaux souillés par les excréments et enfin des produits de vidange et lavage des réservoirs gastriques et des intestins. Les eaux usées des sanitaires du personnel de l'abattoir, les rejets des eaux de lavage et désinfection des mains, du matériel et des locaux se retrouvent aussi dans les effluents bruts de l'abattoir.

Les abattoirs sont considérés comme « installations classées pour la protection de l'environnement » qui doivent traiter leurs effluents avant rejet dans l'environnement. La plupart des abattoirs rejettent leurs effluents vers les stations municipales de traitement des eaux usées, après un premier traitement qui consiste en un dégrillage-tamassage-dégraissage et un séjour dans un bassin tampon. Ce premier traitement n'est pas suffisant pour que l'effluent traité

puisse être rejeté dans le milieu naturel. En France, seuls quelques grands abattoirs du Grand-ouest possèdent des stations d'épuration des eaux usées complètes. On obtient alors, après un traitement par digestion aérobie, des effluents suffisamment épurés pour être rejetés directement dans les rivières. Les boues, résidus solides du traitement d'épuration, pourront subir un second traitement comme le séchage ou le chaulage avant leur épandage pour fertiliser les sols agricoles (Figure 15).

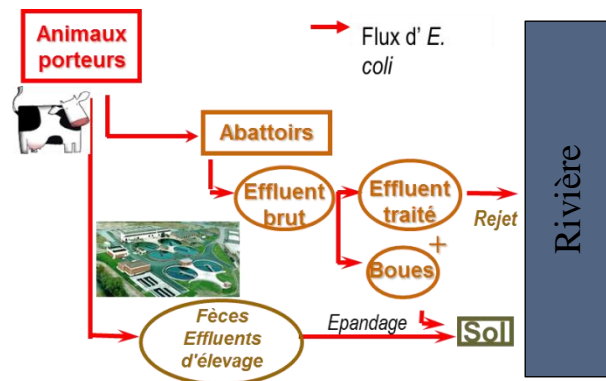


Figure 15. Origine des effluents d'abattoir et d'élevage, et flux d'E. coli dans ces effluents.

Modifié à partir de (Brugère et al., 2012).

5.1.2 Charge bactérienne des effluents d'origine bovine

Les effluents d'élevage de bovins sont composés de fèces. Ils contiennent des bactéries de la flore digestive commensale et pathogène des bovins.

Le but initial du traitement épuratoire des effluents est la diminution de la matière organique qui s'y trouve, soit sous la forme de matières en suspension (MES), soit sous forme dissoute. Il permet secondairement de diminuer la charge microbienne ; une diminution de l'ordre de 2 valeurs de log 10 est classiquement observée dans les stations d'épuration. Mais cette réduction est variable, et des bactéries, plus particulièrement des bactéries antibiorésistantes, peuvent être retrouvées dans les eaux épurées (Bell, 1978; Mezrioui and Baleux, 1994).

Après dénombrement des bactéries, la comparaison du nombre de bactéries à l'entrée et à la sortie d'une station de traitement permet d'évaluer la réduction de la charge bactérienne au cours du traitement. Un bon abattement du nombre de bactéries dans les effluents épurés traduit un bon fonctionnement de la station d'épuration (Luczkiewicz et al., 2010).

Pour mesurer l'impact du traitement épuratoire sur les bactéries résistantes, il faut non seulement évaluer la diminution du nombre de bactéries, mais aussi évaluer la prévalence (proportions ou pourcentages) de bactéries résistantes dans la population bactérienne totale avant et après traitement.

Pour une population bactérienne donnée, la détermination du pourcentage de souches résistantes à un ou plusieurs antibiotiques par rapport au nombre total de bactéries permet d'évaluer la prévalence de bactéries antibiorésistantes dans les différents effluents.

Pour *E. coli* par exemple, une augmentation de la prévalence des souches résistantes à un nombre défini d'antibiotiques (un ou trois selon les études) dans les effluents traités traduit l'effet sélectif du traitement sur les bactéries résistantes.

Des études sur les effluents urbains et hospitaliers seront parfois présentées par la suite, car il s'agit des mêmes traitements épuratoires que pour les effluents d'origine animale, notamment bovine (l'impact sur les populations bactériennes résistantes est potentiellement le même).

Dans ce travail de thèse, notre intérêt a été porté sur les effluents d'origine bovine suivants :

-Les effluents liquides et boues de stations d'épuration d'abattoirs de bovins, avec une attention particulière quant à la détection de souches EHEC et/ou résistantes aux antibiotiques et des E. coli porteuses d'intégrons. Nous avons également évalué l'impact du traitement épuratoire sur ces souches.

- Les fèces de bovins prélevés à l'abattoir, avec une attention particulière quant à la résistance des souches STEC en comparaison avec des souches E. coli non-STEC (voir chapitre 8).

5.2 Les fèces de bovins prélevés à l'abattoir : source d'*E. coli* résistantes et porteuses d'intégrons

5.2.1 Les *E. coli* résistantes dans les fèces de bovins

Plusieurs études ont été menées pour évaluer les fréquences d'*E. coli* chez les animaux d'élevage. La majorité des études conduites chez les bovins ont été conduites sur des fèces de veaux et tendent à montrer des pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes supérieurs à 50%.

En Suisse, Di Labio et ses collaborateurs ont rapporté que 68,7% d'*E. coli* isolées dans des fèces de veaux à l'abattoir étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés. Parmi ces *E. coli* antibiorésistantes, 56,5%, 47,5%, 64,0% et 53,1% étaient respectivement résistantes à la tétracycline, l'ampicilline, la streptomycine et aux sulfamides (Di Labio et al., 2007). D'autres études ont rapporté des pourcentages élevés d'*E. coli* résistantes isolées de fèces de veaux (Larsen and Larsen, 1975; Brophy et al., 1977; Raska et al., 1979; DeFrancesco et al., 2004). L'étude de Haenni et ses collaborateurs conduite sur des fèces de veaux dans 12 abattoirs a révélé une prévalence de 29,4% d'*E. coli* productrices de BLSE (Haenni et al., 2014). Cependant, une étude menée chez des bovins adultes a montré des résultats différents. En effet, dans des abattoirs espagnols, 55% des souches d'*E. coli* isolées de fèces de bovins à viande

étaient résistantes à au moins un des 16 antibiotiques testés (Ramos et al., 2013). Cette étude indiquait que le haut niveau de résistance observé était associé aux pratiques d'élevage.

5.2.2 Les STEC résistantes dans les fèces de bovins

Les études sur les profils de résistance des STEC du top 5 sont variées et présentent des résultats contradictoires.

Quelques études, essentiellement sur les STEC O157:H7 isolées de fèces de bovins ont rapporté des pourcentages de résistance inférieurs à 15%. Aux Etats-Unis, Beier et ses collaborateurs ont observé que parmi les 344 STEC O157:H7 isolées de fèces, carcasses, et membres arrières de bovins aux abattoirs, seulement 14% étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés. La plus grande résistance était observée contre le sulfisoxazole (10,5%) (Beier et al., 2013). De même, au Japon, 13,3 % des STEC O157 isolées dans des fèces de bovins adultes étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés (Sasaki et al., 2012).

En revanche, une majorité d'études a montré des pourcentages de résistance aux antibiotiques pouvant aller jusqu'à 70% chez les STEC O157, mais aussi les STEC du top 5 des sérotypes suivants: O26:H11; O111:H8 et O103:H2 (Srinivasan et al., 2007; Cergole-Novella et al., 2011). En effet, en Espagne, Cabal et ses collaborateurs ont montré dans des fèces de bovins prélevés à l'abattoir que sur 50 STEC O157:H7, 64% était résistantes à la tétracycline, la streptomycine, et au sulphonamide, et 34% étaient résistantes à l'ampicilline (Cabal et al., 2013). Par ailleurs, des pourcentages de STEC O157:H7 résistantes significativement supérieurs chez les bovins, par rapport aux humains, ont été observés en Espagne (55% vs 23%) (Mora et al., 2005), ainsi qu'au Canada (60% vs 38%) (Vidovic et al., 2013).

Des pourcentages élevés de résistance ont également été rapportés chez les STEC O26:H11; O111:H8 et O103:H2 isolées de fèces de bovins (Karama et al., 2008; Scott et al., 2009). En Corée, parmi 35 STEC O26 et 25 STEC O111 isolées de fèces de bovins, 70% et 60% de ces souches respectivement, étaient résistantes à au moins un antibiotique (Lee, 2009).

5.2.3 Les *E. coli* porteuses d'intégrons dans les fèces de bovins et effluents d'élevage

La présence d'intégrons peut être mise en évidence par la présence du gène *intI* (gène codant pour l'intégrase), détecté par PCR comme signalé ci avant. On parle de « bactérie positive pour le gène *intI* » quand il s'agit d'une bactérie porteuse d'intégron de classe 1 (IMs1) et de « bactérie positive pour le gène *int2* » quand il s'agit de bactérie porteuse d'intégron de classe 2 (IMs2).

Les intégrons de résistance ont été recherchés chez des bactéries commensales et pathogènes de divers animaux domestiques et sauvages, ainsi que dans les piscicultures et aquacultures. Selon Barraud et Ploy, le plus grand réservoir d'IMs demeure les animaux d'élevage (Barraud and Ploy, 2011). En effet, les prévalences d'IMs chez les bovins, les porcins et la volaille ont été montrées comme supérieures à celles dans l'environnement (Guerra et al., 2003).

Il a été rapporté dans une étude sur des fèces de bovins, prélevés dans 3 différents systèmes d'élevage (intensif, extensif et biologique), que les *E. coli* porteuses d'IMs1 et IMs2 étaient présentes quel que soit le type d'élevage. Cependant, c'est le mode « engraissement » qui présentait les prévalences d'intégrons IMs1 et IMs2 les plus élevées (71% pour les IMs1 et 62% pour les IMs2), suivi de l'élevage extensif (52% pour les IMs1 et 30% pour les IMs2) et de l'élevage biologique (25% pour les IMs1 et 11% pour les IMs2) (Barlow et al., 2009).

Par ailleurs, dans un élevage de bovins, une étude comparative a été menée sur des terrains agricoles avec épandage et d'autres sans historique d'épandage de fumier. L'étude révèle que sur les sols amendés, 89,3% des entérobactéries isolées étaient positives pour le gène *intI1*, contre 45,8% dans les sols non amendés (Srinivasan et al., 2008). De la même façon, l'étude de Byrne-Bailey et ses collaborateurs conduite dans un élevage porcin, a montré que 289 jours après épandage du lisier, la prévalence d'entérobactéries positives pour le gène *intI1* avait augmenté significativement par rapport aux sols qui n'avaient subi aucun amendement (Byrne-Bailey et al., 2011). Cette différence a également été observée, deux ans après l'épandage de lisiers de porcs dans les sols amendés comparativement aux sols contrôles (1,01% vs 0,0036%) (Gaze et al., 2011).

5.3 Les effluents d'abattoirs de bovins : source d'*E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes, et d'*E. coli* porteuses d'intégrons.

5.3.1 Les *E. coli* entérohémorragiques et/ou résistantes dans les effluents d'abattoirs et impact des traitements épuratoires

Les effluents d'abattoir de bovins peuvent être constitués, comme signalé ci-avant : du lisier produit par les animaux pendant l'attente de l'abattage, des eaux issues du rinçage des animaux souillés par les excréments, et enfin des produits des réservoirs gastriques et des intestins. Les études concernant les effluents d'abattoirs de bovins sont peu nombreuses et les résultats difficiles à comparer.

Néanmoins, en France, la recherche de STEC O157 dans les effluents et boues d'épuration de 12 stations d'épuration d'abattoirs multi-espèces a mis en évidence la présence de 2 souches STEC O157:H7 au niveau des effluents bruts (Loukiadis et al., 2006). Plus récemment, Ayaz et ses collaborateurs ont rapporté la présence de STEC O157:H7 dans les eaux usées de 3 des 24 abattoirs de bovins étudiés (Ayaz et al., 2014).

En ce qui concerne l'antibiorésistance des STEC isolées dans les effluents d'abattoirs de bovins, l'étude de la résistance d'*E. coli* O157:H7+/H- isolées dans des effluents de STEPs d'abattoirs de bovins en Turquie, a montré que la majorité des STEC O157:H7 étaient sensibles aux antibiotiques testés à l'exception d'une STEC O157:H7 multirésistante (Ayaz et al., 2015). Il est important de rappeler que la survie d'*E. coli* O157:H7 dans les milieux aquatiques a été démontrée comme pouvant varier de 2 semaines à 10 mois (Chekabab et al., 2013) ; ce qui pourrait également être observé avec les effluents d'abattoirs de bovins déversés dans les rivières après traitement et par conséquent, pourrait représenter un sérieux enjeu de santé publique.

5.3.2 Les *E. coli* antibiorésistantes dans les effluents d'abattoirs et impact des traitements épuratoires

Les *E. coli* antibiorésistantes contenues dans le tube digestif des bovins peuvent se retrouver dans les effluents de station d'épuration à la suite des différentes opérations d'éviscération et rinçage réalisées dans les abattoirs, de la même façon que les *E. coli* entérohémorragiques. Il existe peu d'études sur les effluents de stations d'épuration d'abattoirs ; les mieux étudiées sont celles conduites dans les effluents d'abattoirs de poulets (Martins da Costa et al., 2006; da Costa et al., 2008; Sabate et al., 2008).

L'impact du traitement épuratoire sur les *E. coli* isolées de station d'épuration d'eaux usées d'abattoirs a été peu étudié jusqu'à présent. La plupart des stations d'épuration municipales utilisent des systèmes de boues activées. C'est le même type de traitement qui est majoritairement appliqué dans les stations d'épuration d'abattoirs. Les études montrent des effets de traitement variables sur les *E. coli* antibiorésistantes dans les effluents de station d'épuration municipale.

En effet, une majorité d'études montrent une augmentation des pourcentages d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique et résistantes à plus de 3 classes d'antibiotiques dans les eaux traitées ; ce qui indique une sélection positive des *E. coli* résistantes entre le début et la fin du traitement épuratoire (Luczkiewicz et al., 2010). Ferreira et ses collaborateurs ont également observé une augmentation des pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes (Ferreira da Silva et al.,

2007). Kim et ses collaborateurs ont rapporté qu'en fonction des conditions des traitements épuratoires par boues activées, des différences dans le devenir des proportions de bactéries résistantes à la tétracycline étaient observées (Kim et al., 2007).

Cependant, quelques études montrent des résultats différents. En effet, dans des stations d'épuration municipales, les pourcentages d'*E. coli* et coliformes résistantes aux antibiotiques n'étaient pas impactés par le traitement épuratoire (Reinthaler et al., 2003; Biswal et al., 2014). Enfin, peu d'études ont montré une diminution de la prévalence de souches antibiorésistantes (Garcia et al., 2007; Rijal et al., 2009).

5.3.3 Les *E. coli* porteuses d'intégrons dans les effluents d'abattoirs et impact des traitements épuratoires

Un certain nombre d'études ont recherché la présence des intégrons dans les compartiments environnementaux tels que les effluents urbains et hospitaliers. Les résultats de ces études ont été synthétisés dans une revue récente (Stalder et al., 2012). L'étude de la présence d'intégrons dans des effluents de station d'épuration d'abattoirs au Portugal a montré que les gènes *int1* étaient détectés à tous les stades du traitement épuratoire. Au total, 30,7% et 4,5% des entérobactéries étaient respectivement porteuses d'IMs1 et d'IMs2 (Moura et al., 2007). L'étude de l'impact du traitement avait montré une augmentation du pourcentage des entérobactéries porteuses d'IMs1 (10% vs 41%) au niveau des eaux traitées.

Bien qu'une étude sur des effluents hospitaliers montre une diminution de la prévalence d'*E. coli* porteuses d'IMs1 au cours du traitement épuratoire (16,4% vs 8,5%) (Oberle et al., 2012), il semble que, le plus souvent, les traitements épuratoires soit ne permettent pas de diminuer les prévalences d'*E. coli* porteuses d'IMs1 (Stalder et al., 2012; Rizzo et al., 2013), soit n'ont aucun effet, comme montré dans l'étude de Ferreira da Silva et ses collaborateurs. Dans cette étude les pourcentages d'*E. coli* porteuses d'IMs1 avaient des fréquences similaires dans les effluents bruts et traités (Ferreira da Silva et al., 2007). Les procédés d'épuration actuels des eaux usées ne permettraient donc pas de réduire la dissémination des intégrons dans l'environnement.

Points clés Chapitre 5 : LES EFFLUENTS D'ORIGINE BOVINE : SOURCES D'EHEC ET/OU E. COLI RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES

Les effluents d'origine bovine peuvent contaminer l'environnement en E. coli entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes via l'épandage des fumiers et des lisiers, mais aussi via les boues d'épuration épandues et les effluents liquides qui sont rejetés dans les cours d'eau à la sortie des stations d'épuration d'abattoirs. Cependant, les données sur les E. coli et les STEC antibiorésistantes isolées de fèces de bovins sont contradictoires. Les pourcentages d'E. coli antibiorésistantes dans les fèces semblent varier selon les catégories de bovins. Par ailleurs, une majorité de données tend à montrer des pourcentages élevés de résistance chez les STEC du top 5 isolées chez les bovins à l'abattoir (allant jusqu'à 70%).

Les stations d'épuration des effluents urbains sont reconnues comme des « hot spots » de bactéries antibiorésistantes et porteuses d'intégrons. Ce sont des lieux de dissémination de bactéries résistantes, de bactéries porteuses d'intégrons et des gènes de résistance grâce aux transferts de gènes. Par conséquent, les effluents de stations d'épuration d'abattoirs de bovins, utilisant les mêmes procédés de traitement, peuvent représenter une source de contamination pour l'homme. Une évaluation du risque pour la santé publique lié à cette dissémination environnementale via les effluents d'origine bovine est nécessaire.

Ce travail de thèse a donc consisté à étudier la fréquence des E. coli entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes dans les effluents de stations d'épuration des eaux usées d'abattoirs de bovins de catégories différentes (bovins adultes et veaux), ainsi que la résistance des STEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes dans des abattoirs.

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 6. OBJECTIFS DE LA THESE

Les bovins sont porteurs de souches pathogènes pour l'homme et de souches résistantes aux antibiotiques

Les bovins sont les réservoirs de souches *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Ces souches ont été définies au chapitre 1. Elles sont responsables de colite hémorragique et de syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'homme. L'ANSES a défini un top 5 des EHEC majeures les plus impliquées dans les infections humaines à EHEC en France, ce sont des STEC porteuses des gènes *stx*, *eae*, et appartenant aux sérotypes suivants : O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 et O111:H8. Lorsque les EHEC du top 5 sont isolées dans les fèces de bovins, dans la chaîne alimentaire ou dans l'environnement, elles sont appelées STEC du top 5 et sont considérées comme hautement pathogènes pour l'homme.

Les bovins peuvent également héberger des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques. Les données relatives à ces souches ont été présentées dans le chapitre 2. Les gènes de résistance sont portés par des éléments génétiques mobiles. Parmi eux, les intégrons ont la capacité d'intégrer des gènes de résistance sous forme de cassettes de gènes et promouvoir l'expression de ces gènes qui codent pour des déterminants de résistance. Ceux de classe 1 sont d'un intérêt clinique majeur. Les intégrons sont rendus mobiles par d'autres éléments génétiques mobiles tels que des plasmides et/ ou des transposons. La présence d'éléments génétiques mobiles d'antibiorésistance tels que les intégrons chez *E. coli* est préoccupante car *via* les intégrons, les gènes de résistance peuvent être transférés entre des bactéries génétiquement éloignées, telles que les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative, mais aussi entre des bactéries non pathogènes et des bactéries pathogènes, par transfert de gènes de résistance.

Les effluents d'origine bovine peuvent être à l'origine de la dissémination environnementale de souches pathogènes et/ou antibiorésistantes, conduisant à la contamination humaine

Le chapitre 4 a mis en évidence le rôle de l'environnement dans la contamination de l'homme par ces souches *via* l'environnement dans une approche « One Health ». La dissémination environnementale des *E. coli* commensales et pathogènes, mais aussi porteuses de résistance peut survenir par 2 voies : soit à travers les effluents d'élevage (fèces, lisier, fumier) qui sont

épanchés sur les parcours agricoles, soit par les effluents d'abattoirs au niveau des stations d'épuration.

La présence d'*E. coli* résistantes dans l'environnement est un enjeu majeur de santé publique, car les gènes de résistance peuvent être transférés aux bactéries pathogènes pour l'homme.

Les Stations d'Épuration des eaux usées (STEPs) d'abattoirs de bovins : « hot spots » de souches pathogènes et/ou résistantes ? Enrichissement de l'environnement ?

Les stations d'épuration d'abattoirs de bovins reçoivent les effluents de bovins qui contiennent le contenu du tube digestif, mais aussi les eaux de lavage et de rinçage résultant des procédures d'abattage. Ces bactéries se retrouvent dans l'environnement *via* les effluents liquides rejetés dans les rivières, et *via* l'épandage des boues résultant du traitement épuratoire.

Il a été montré que les stations d'épuration d'abattoirs étaient impliquées dans la dissémination environnementale de bactéries zoonotiques pathogènes, notamment les EHEC. Et de plus en plus d'épidémies à EHEC O157:H7 sont associées à des sources environnementales telles que les aliments ou les eaux contaminées.

Nous avons vu, par ailleurs, dans le Chapitre 5, que les STEPs urbaines sont reconnues comme des « hot spots » pour l'enrichissement de l'environnement en *E. coli* antibiorésistantes, en gènes de résistance et intégrons. Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux stations d'épuration d'abattoirs, plus précisément les abattoirs de bovins.

Objectif 1 de la thèse :

La 1^{ère} étude que j'ai menée consistait à évaluer la fréquence des souches d'*E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes dans les effluents de station d'épuration des eaux usées (STEPs) de deux abattoirs, l'un où étaient abattus uniquement des bovins adultes et l'autre uniquement des veaux de boucherie (Figure 16). Ces deux stations d'épuration utilisaient un traitement épuratoire à base de boues activées.

Les objectifs de cette étude étaient :

- d'évaluer le risque de dissémination dans l'environnement des *E. coli* antibiorésistantes, porteuses d'intégrons et pathogènes par les effluents liquides et boues d'abattoirs des deux catégories d'abattoirs de bovins,
- et d'évaluer l'impact du traitement épuratoire sur ces souches.

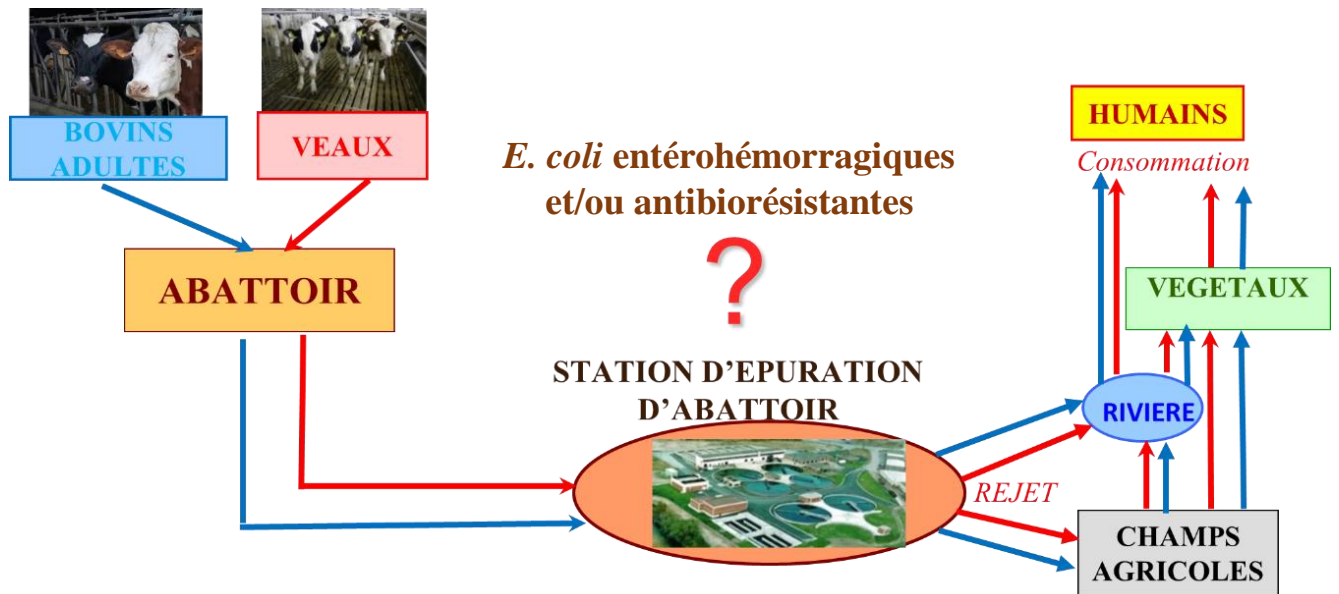


Figure 16. Quelle est la fréquence des *E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes dans les effluents et boues de stations d'épuration d'abattoir de bovins adultes et d'abattoir de veaux?

Les souches EHEC, STEC peuvent être résistantes aux antibiotiques

L'antibiothérapie contre les infections dues aux EHEC demeure controversée, cependant l'usage de l'azithromycine pendant l'épidémie due à l'EHEC entéroaggrégative O104:H4 en Allemagne a permis la réduction du portage de la souche épidémique. Par conséquent, l'antibiorésistance chez les souches STEC est un enjeu majeur de santé publique.

Le chapitre 3 a porté sur le possible lien entre virulence et résistance. Plusieurs études ont déjà rapporté que des souches STEC antibiorésistantes avaient été isolées chez des animaux d'élevage, dont les bovins, et chez les hommes. Cependant, très peu d'études ont exploré le lien entre la résistance et la virulence dans ces souches. Récemment, une étude épidémiologique a souligné que la prévalence de l'antibiorésistance était significativement élevée pour les *E. coli* diarrhéiques par rapport aux souches commensales. Les auteurs indiquaient que la pression antibiotique et l'association génétique pourrait contribuer à une corrélation positive entre la virulence et la résistance. Cependant, des incertitudes sur l'implication d'un lien génétique dans cette association demeurent.

En outre, peu d'études ont caractérisé les plasmides codant pour les gènes de résistance aux antibiotiques chez les souches STEC. Le séquençage de plasmides présents dans des STEC isolées d'animaux et d'humains a mis en évidence soit des plasmides porteurs de gènes de virulence, soit des plasmides porteurs de gènes de résistance.

Jusqu'à présent, une seule étude a montré la colocalisation de gènes de virulence et de résistance sur le plasmide de virulence des EHEC. Ce plasmide appelé pO26-CRL₁₁₁ avait été extrait d'une souche EHEC O26:H⁻ isolée d'un patient présentant une colite hémorragique. Il portait concomitamment des gènes de résistance arborés par un transposon complexe Tn21 codant pour la résistance à 6 antibiotiques et plusieurs gènes additionnels de virulence dont *ehxA*.

Objectif 2 de la thèse

La 2^{ème} étude que j'ai menée consistait à mieux caractériser la résistance des souches STEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes dans des abattoirs français (Figure 17).

Les souches STEC du top 5 avaient été isolées lors d'une précédente étude visant à évaluer la prévalence de bovins porteurs de STEC appartenant aux cinq sérotypes majeurs O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 dans quatre catégories de bovins adultes abattus en France et dont les viandes peuvent être utilisées pour la fabrication de steaks hachés.

Cette étude de prévalence avait également permis d'isoler des aEPEC; elles étaient positives pour le gène *eae*, appartenaient aux 5 sérotypes majeurs, mais étaient négatives pour le gène *stx* (Bibbal et al., 2014b; Bibbal et al., 2015). Par conséquent, la caractérisation de la résistance de ces souches aEPEC a également été incluse dans cette 2^{ème} étude.

Les objectifs de cette étude étaient :

- de réaliser une étude comparative entre les profils de résistance des souches STEC et aEPEC du top 5 (O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7) *versus* des *E. coli* ne présentant pas les caractéristiques des STEC et aEPEC du top 5 (non-STECS et aEPEC du top 5), isolées de la flore fécale de bovins,
- et de vérifier chez les STEC résistantes, l'hypothèse de la localisation des gènes de résistance aux antibiotiques sur le plasmide de virulence des EHEC.

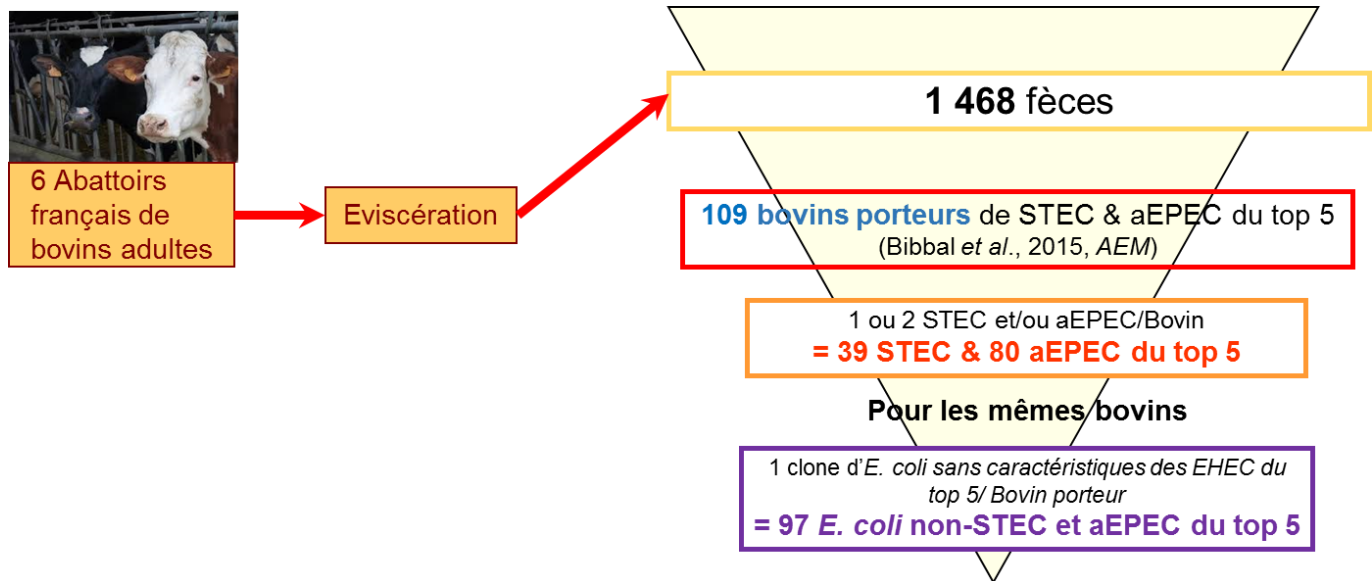


Figure 17. Quelle est la résistance des souches STEC, des aEPEC et des *E. coli* ne possédant pas les caractéristiques de STEC et aEPEC du top 5 (non-STEC et aEPEC du top 5), isolées de fèces de bovins adultes à l'abattoir?

Chapitre 7. ETUDE 1. La comparaison de l'incidence des souches d'*E. coli* pathogènes et/ou résistantes isolées dans des effluents d'abattoirs de bovins montrent des risques différents pour la santé publique.

Les travaux présentés dans ce chapitre correspondent à la 1^{ère} étude de ce travail de thèse qui était l'évaluation de la fréquence des souches d'*E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes dans les effluents de station d'épuration des eaux usées (STEPs) de deux abattoirs, l'un où étaient abattus uniquement des bovins adultes et l'autre uniquement des veaux de boucherie. Ils nous ont permis d'évaluer l'incidence des *E. coli* pathogènes et/ou antibiorésistantes dans les effluents d'abattoirs des deux catégories de bovins, d'évaluer ensuite l'impact du traitement épuratoire sur les pourcentages d'*E. coli* pathogènes et/ou antibiorésistantes, et enfin de préciser si les intégrons peuvent être des indicateurs de la dissémination de l'antibiorésistance.

7.1 MATERIELS ET METHODES

7.1.1 Les stations d'épuration des eaux usées d'abattoir et prélèvements

Les prélèvements d'effluents ont été réalisés au niveau de deux abattoirs français de grande capacité d'abattage en Mai 2011. L'un où étaient abattus uniquement des bovins adultes (jusqu'à 35 000 tonnes équivalent carcasse/an) et l'autre uniquement des veaux (jusqu'à 25 000 tonnes équivalent carcasse/an). Ces abattoirs possédaient une STation d'EPuration des eaux usées (STEP) suffisamment efficace pour permettre le rejet des effluents traités dans le milieu naturel (rivière).

Pour les deux abattoirs, le prétraitement consistait en un tamisage mécanique et la séparation de graisses. Le traitement secondaire consistait en un traitement biologique par boues activées. Les boues étaient épaissies par centrifugation et stockées avant leur épandage sur les parcours agricoles. Pour les deux stations d'épuration, le temps de rétention hydraulique était de 10 jours. Et le temps de stockage des boues était respectivement de 5 et 6 mois pour les stations d'épuration d'abattoirs de bovins adultes et de veaux. Au moment de la collecte des prélèvements, la température dans le bassin d'aération était située entre 12 et 15°C dans les deux STEP d'abattoirs.

Chacune des STEP d'abattoirs a été visitée une fois et les points de prélèvements étaient spécifiques (Figure 18) : effluents avant traitement (effluents bruts), effluents après traitement épuratoire avant rejet dans l'environnement (effluents traités), boues circulant dans le système

de traitement (boues activées), boues d'épuration destinées à l'épandage sur les sols agricoles (boues épaissies).

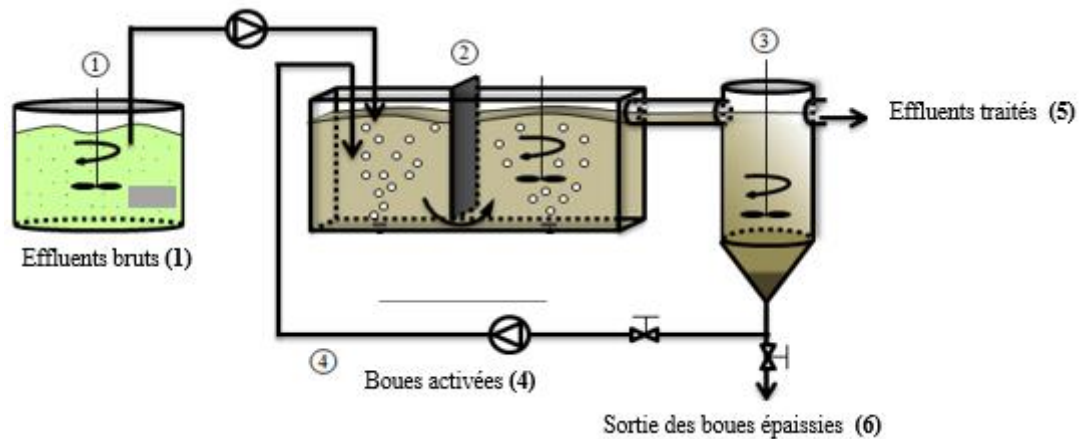


Figure 18. Points de prélèvement au niveau des STEP's d'abattoirs utilisant le procédé conventionnel de boues activées.

Les effluents bruts (1) sont régulièrement brassés dans un bassin tampon puis épurés dans un bassin d'aération (2). Une partie des boues activées (4) part du clarificateur (3) pour retourner dans le bassin d'aération. Les effluents traités (5) et les boues épaissies destinées à l'épandage (6) sont récupérés en sortie du clarificateur.

Les prélèvements ont été effectués sur 24 heures à l'aide d'un préleveur automatique préalablement programmé installé après l'étape de prétraitement (effluents bruts) et avant le rejet dans la rivière (effluents traités). Les boues activées et épaissies ont été obtenues par un échantillonnage ponctuel respectivement durant la recirculation dans le bassin d'aération et dans le bassin de collecte de boues d'épandage.

Les échantillons ont été collectés dans des récipients stériles transportés à 4°C et analysés au laboratoire dans les 24 h. Le pH, la demande chimique en oxygène (DCO, mesurée par la méthode colorimétrique ISO 15705:2002), la demande biochimique en oxygène (DBO₅, mesurée avec le système OxiTop®), les solides en suspension totaux (TSS), les solides en suspension volatils (VSS, mesurés selon la méthode AFNOR NF T 90-105). Les valeurs mesurées sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6. Caractéristiques des effluents d'abattoirs de bovins adultes et de veaux au moment de l'échantillonnage

	TSS		VSS		DCO		DBO₅^a		pH	
	(mg/L)		(mg/L)		(mg/L)		(mg/L)			
Point de prélèvement	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux
Effluents bruts	5800	3600	5350	2270	1860	2275	2570	n.d.	7.6	7.5
Effluents traités	14	11	n.d.	n.d.	72	90	11	9	n.d.	7.1

a DBO₅ totale pour les effluents bruts et DBO₅ soluble pour les effluents traités

n.d., non déterminé

7.1.2 Dénombrement et isolement des *E. coli*

Les effluents bruts et traités (500 mL) ont été concentrés par centrifugation (10 000 G) respectivement dans des volumes finaux de 10 mL et 5 mL, et des dilutions décimales réalisées. Pour les boues épaissies et activées, une dilution décimale des échantillons a été réalisée en mélangeant 25 g dans 225 mL de diluant tryptone sel (Oxoid, Dardilly, France). Les dilutions décimales des prélèvements ont ensuite étéensemencées sur Petrifilm™ Select *E. coli* (Grosseron, Saint Herblain, France) pour l'étape de dénombrement. Les dénombrements des *E. coli* ont été effectués après incubation des Petrifilms™ Select *E. coli* pendant 24 h à 42°C.

Pour chaque point de prélèvement, une collection d'environ 400 *E. coli* a pu être constituée. Pour y arriver, pour chaque point de prélèvement, les dilutions décimales ayant permis le dénombrement d'au moins 30 colonies d'*E. coli* bien isolées (au niveau de l'étape précédente), avaient étéensemencées sur une vingtaine de Petrifilms™ Select *E. coli*, et incubés 24 h à 42°C. Après incubation, environ 400 colonies avaient été prélevées aléatoirement, puis repiquées dans du milieu LB dans des plaques 96 puits à 37°C pendant 24 h, et enfin stockées à -80°C dans du milieu LB additionné de 30% de glycérol, jusqu'à leur analyse. Au total, une collection de 3 182 isolats d'*E. coli* a été obtenue.

7.1.3 Isolement des STEC du top 5 après enrichissement

La détection des souches STEC du top five a été réalisée selon les recommandations de l'ISO 13136:2012. Les prélèvements ont été soumis à un enrichissement. Pour les échantillons concentrés (effluents bruts et effluents traités), 1 mL de la suspension concentrée a été diluée au 1/10^{ème} dans du milieu mTSB (bouillon tryptone soja modifié supplémenté avec 1,5 g/L de sels biliaires) contenant 16 mg/L de novobiocine. Pour les boues, 10 mL de la suspension mère, utilisée pour la réalisation des dénombrements, ont été dilués au 1/10^{ème} dans ce même milieu. Les suspensions ainsi réalisées ont été incubées 16 h (\pm 2 h) à 37°C pour enrichissement.

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de chaque bouillon enrichi à l'aide de tubes de lyse (Pall GeneDisc Technologies, Bruz, France). La recherche des marqueurs génétiques associés aux EHEC été réalisée par PCR séquentielle en temps réel (Bibbal et al., 2014b). Un criblage supplémentaire par PCR en temps réel a permis d'identifier les échantillons positifs pour les variants du gène *eae* associés aux souches STEC du top five.

Les bouillons enrichis positifs pour à la fois les gènes *stx*, *eae* et au moins un marqueur génétique des cinq sérogroupes ont fait l'objet d'une procédure d'isolement par immuno-séparation magnétique (IMS).

Les billes utilisées ont été les billes Dynabeads® (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Pour chacun des immunoconcentrats obtenus, 10 gélules ont été ensemencées (10 µl) et incubées 12 à 18 h à 37°C. Les gélules utilisées pour l'isolement étaient des gélules Cefixime-Tellurite Sorbitol-MacConkey Agar (CT-SMAC) (Oxoid, Dardilly, France) pour les sérogroupes O157, O103 et O111, des gélules CT-MAC base (Difco) additionnées de rhamnose (Difco) à 10 g/L pour le sérotype O26, et des gélules CT-MAC base (Difco) additionnées de raffinose (Difco) à 10g/L pour le sérotype O145. Ces substrats ont été ajoutés pour améliorer la détection des sérogroupes O26 et O145 (Posse et al., 2008a).

Pour chacun des sérogroupes recherchés, des colonies isolées ont été sélectionnées comme phénotypiquement caractéristiques des sérogroupes recherchés. L'appartenance au sérotype recherché de 5 à 10 colonies, par prélèvement, a été déterminée par séro-agglutination (AES) (Statens Serum Institut, Copenhagen, Danemark).

Une fois le sérotype confirmé par PCR, la présence des gènes *stx* et *eae* a été confirmée. La détermination des sous-types du gène *stx* et les variants du gène *eae* β1, γ1, ε, γ2/θ a enfin été réalisée comme mentionné dans la partie 7.1.4.

7.1.4 Détection et caractérisation des isolats d'*E. coli* positives pour les gènes *stx* et *eae*

L'autre moyen de détection et caractérisation des souches porteuses de gènes de virulence associés aux EHEC a été le criblage en «pools» des gènes *stx* et *eae* par PCR en temps réel dans la collection des 3 182 isolats d'*E. coli* obtenus sans enrichissement selon la démarche expérimentale de la figure 19. L'ADN a été extrait à la soude. La recherche du gène *eae* a été réalisée par PCR simplex en temps-réel (Nielsen and Andersen, 2003).

La confirmation d'espèce a été réalisée pour les isolats positifs pour au moins un des gènes de virulence grâce au test biochimique API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Le sous-typage des gènes *stx1* et *stx2* a été réalisé comme décrit précédemment (Scheutz et al., 2012). Cette méthode permet d'identifier les 3 sous-types du gène *stx1* (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*), et les 7 sous-types du gène *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*).

Quatre sous-types du gène *eae* : β, γ, ε, θ ont été recherchés par PCR quadruplex en temps réel (Madic et al., 2010).

De plus, pour les isolats d'*E. coli* positifs pour le gène *eae*, les marqueurs génétiques associés aux *E. coli* entéropathogènes (EPEC) typiques, le gène *bfpA* et le plasmide EAF (EPEC adherence factor) ont été recherchés par PCR conventionnelle (Franke et al., 1994; Gunzburg et al., 1995). Les isolats d'*E. coli* ont été classés en deux groupes : STEC (positifs pour les gènes *stx1* et/ou *stx2*) et aEPEC (positifs pour *eae*, et négatifs pour *stx1*, *stx2*, *bfpA* et le plasmide

EAF (Kaper et al., 2004). Enfin les 4 sérotypes majeurs associés aux EHEC du top 5 (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O111:H8 et O103:H2) ont été recherché chez les isolats de STEC et aEPEC par PCR en temps-réel (Perelle et al., 2004; Madic et al., 2011).

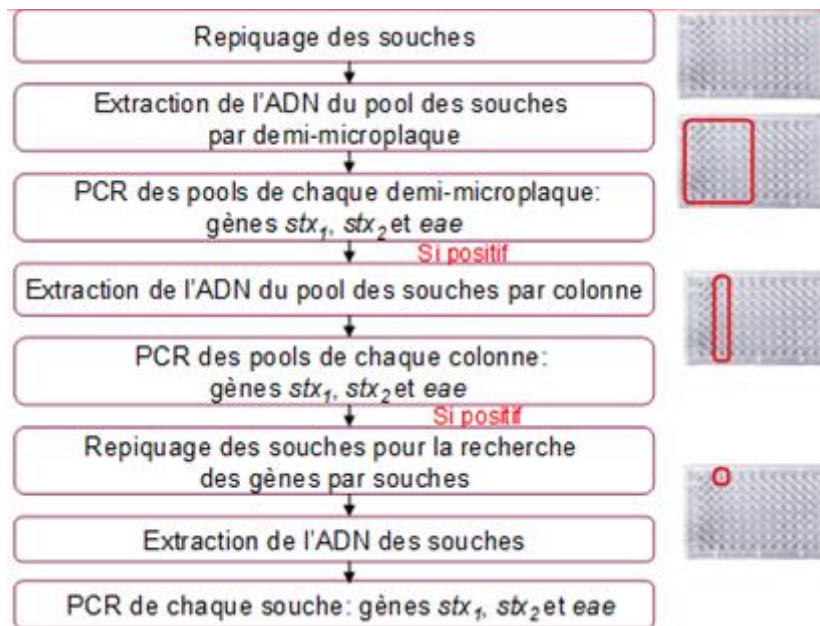


Figure 19. Démarche expérimentale pour le criblage en pool des gènes *stx* et *eae* au niveau de la collection des 3 182 isolats d'*E. coli* obtenus sans enrichissement.

7.1.5 Détection et caractérisation des isolats d'*E. coli* antibiorésistants

La démarche expérimentale pour les sections 7.1.5, 7.1.6 et 7.1.7 est présentée en annexe.

Pour chaque point de prélèvement, une sous-collection de 40 isolats d'*E. coli* confirmés par des tests API 20E a été constituée (après isolement sur géloses LBA) aléatoirement à partir des souches initialement conservées par congélation à -80°C.

Pour les 320 isolats d'*E. coli* (deux abattoirs et quatre points de prélèvement par abattoir), la résistance phénotypique a été recherchée par la méthode de diffusion en milieu gélosé ou antibiogramme selon les recommandations « *Guidelines : Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests* » du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2008; 2009a; b). Les 16 disques antibiotiques (Bio-Rad®, Marnes-La-Coquette, France) utilisés dans cette étude étaient : la tétracycline (TET), l'ampicilline (AMP), la streptomycine (STR), les sulfamides (SSS), le triméthoprime (TMP), la kanamycine (KAN), le chloramphénicol (CHL), la gentamicine (GEN), l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC), l'acide nalidixique (NAL), la ciprofloxacine (CIP), la céphalotine (CEF), le céfuroxime (CXM), la céfotaxime (CTX), la ceftazidime (CAZ), le céfépime (FEP). La souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme contrôle.

Les souches d'*E. coli* ont été considérées comme multirésistantes lorsqu'elles étaient résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques (Schwarz et al., 2010). La distinction de classes d'antibiotiques est faite pour certaines familles lorsque les mécanismes de résistances diffèrent par classes d'antibiotiques au sein d'une même famille) ; c'est le cas de la famille des β -lactamines (3 classes : pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes), les aminoglycosides (3 classes: streptomycine, kanamycine et gentamicine) et les quinolones (2 classes : ciprofloxacine (fluoroquinolone) et acide nalidixique).

Pour les isolats d'*E. coli* résistants à l'ampicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la streptomycine, la tétracycline, les sulfamides et /ou le chloramphénicol, les principaux gènes de résistance *bla*_{TEM}, (*strA-strB*, *aadA1*), (*tet(A)*, *tet(B)*), (*sulI*, *sulII*, *sulIII*), (*cmlA*, *catI*, *catII*, *catIII*) ont été recherchés par PCR conventionnelle avec les amorces et souches contrôles précédemment décrites (Bibbal et al., 2009b).

7.1.6 Détection et caractérisation des isolats d'*E. coli* porteuses d'intégrons et caractérisation des régions variables d'intégron

La recherche des gènes *intI1*, *intI2* et *intI3* marqueurs des trois principales classes d'intégrons a été réalisée pour la collection des 320 isolats d'*E. coli* par PCR triplex en temps réel (Barraud et al., 2010).

Pour déterminer les réseaux de cassettes de gènes, les régions variables des intégrons de classe 1 et classe 2 ont été amplifiées respectivement grâce aux amorces 50CS/30CS et hep51/hep74 (Gassama Sow et al., 2010). Le volume du mélange réactionnel pour la PCR (50µl) a été préparé avec 5µl d'ADN total grâce au kit Takara Ex Taq™ (Takara) selon les recommandations du fabricant. Le programme de PCR consistait en 3min de dénaturation à 95°C, suivie de 35 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 3 min, et l'élongation à 72°C pendant 10 min.

Le séquençage a été réalisé avec les amorces 50CS/30CS et hep51/hep74 et grâce au kit BigDye® terminator (LifeTechnologies) en suivant les recommandations du fabricant. L'analyse et l'alignement des séquences ont été réalisés avec la collection Genbank nucleotide (nr/nt) grâce à l'outil d'alignement de séquences BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

7.1.7 Phylotypage des isolats d'*E. coli*

La recherche des groupes phylogénétiques a été réalisée pour les 320 isolats d'*E. coli* grâce à la nouvelle méthode de phylotypage (Clermont et al., 2012). Cette méthode a permis l'assignation des isolats à un des 8 phylogroupes (A, B1, B2, C, D, E, F, Clade I) et aux clades II à V.

7.1.8 Analyses statistiques

Pour chaque abattoir, le test KHI-DEUX (χ^2) a été utilisé pour tester si les différences entre les pourcentages d'*E. coli* pathogènes, résistantes et porteuses d'intégrons étaient significatives entre les points de prélèvement (hypothèse nulle).

Pour chaque point de point de prélèvement, ce test a aussi été utilisé pour évaluer si les différences entre les pourcentages d'*E. coli* pathogènes résistantes et porteuses d'intégrons étaient significatives entre les abattoirs.

Le test χ^2 a aussi été utilisé pour tester s'il existait un lien statistique entre la distribution des phylogroupes et la résistance des isolats d'*E. coli*.

Le lien entre les fréquences d'*E. coli* MDR et porteuses d'intégrons de classe 1 a été testé en utilisant le test exact de Fisher. La significativité statistique a été fixée à $p < 0,05$. Les tests

statistiques ont été réalisés grâce au logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

7.2 RESULTATS

7.2.1 Impact du traitement épuratoire sur les populations d'*E. coli*

L'impact du traitement épuratoire a été déterminé sur le nombre d'isolats d'*E. coli* et sur les pourcentages d'*E. coli* pathogènes et antibiorésistantes. Les traitements épuratoires pour les deux STEP ont permis de réduire la charge bactérienne des effluents bruts d'environ 99,9% (Tableau 7). Cependant, les effluents traités contenaient 10^2 UFC/mL *E. coli* et jusqu'à 10^5 UFC/mL *E. coli* étaient présentes dans les boues épaissies. Les pourcentages d'isolats d'*E. coli* positives pour *stx* et *eae* étaient faibles et aucune différence significative n'a été observée quel que soit l'abattoir ou le point de prélèvement (Tableau 7). Au total, la recherche des gènes *stx* et *eae* par PCR sur les 3182 isolats d'*E. coli* a montré que 7 *E. coli* étaient positifs pour le gène *stx* et 13 pour le gène *eae*. Aucun des isolats ne portait à la fois les gènes *stx* et *eae*. Par ailleurs, la détection des STEC du top 5 après enrichissement a permis l'isolement d'une *E. coli* O157:H7 dans les boues épaissies de l'abattoir de bovins adultes.

Dans l'abattoir de bovins adultes, les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes étaient faibles et moins de 5% d'*E. coli* étaient MDR ; et aucune *E. coli* n'était positive pour le gène d'intégrase *intI* (Tableau 8).

Inversément, dans l'abattoir de veaux, quel que soit le point de prélèvement, les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes étaient significativement élevées et les pourcentages d'*E. coli* MDR étaient de 62,5% à 80,0%. Les pourcentages d'*E. coli* positives pour *intI1* étaient supérieurs à 50% dans tous les points de prélèvements. Les *E. coli* positives pour *intI2* étaient détectées dans tous les points de prélèvement à l'exception des boues épaissies. De plus, 13 isolats d'*E. coli* étaient positives pour les gènes *intI1* et *intI2*. Aucune souche n'était positive pour *intI3*.

En ce qui concerne l'impact du traitement épuratoire, dans les deux abattoirs, les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes n'étaient pas significativement différents quel que soit le point de prélèvement. Il en était de même pour les pourcentages d'*E. coli* positives pour *intI1* dans la STEP d'abattoir de veaux. Enfin compte tenu du pourcentage d'*E. coli* MDR et du débit moyen des eaux usées traitées dans l'abattoir de veaux ($382 \text{ m}^3/\text{j}$), il a été estimé que $2,6 \times 10^{10}$ *E. coli* MDR étaient quotidiennement rejetées dans la rivière réceptrice.

Tableau 7. Dénombrements d'*E. coli* et pourcentages d'isolats d'*E. coli* positives pour *stx* et *eae* dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes et de veaux

Point de prélèvement	Dénombrements d' <i>E. coli</i> ^a		Nombre d' <i>E. coli</i> testées pour les gènes <i>stx</i> et <i>eae</i>		Pourcentages (Nombre)			
					Isolats d' <i>E. coli</i> positives pour <i>stx</i>		Isolats d' <i>E. coli</i> positives pour <i>eae</i>	
	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux
Effluents bruts	8.5 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵	395	398	0.0 (0)	0.5 (2)	0.8 (3)	0.3 (1)
Effluents traités	6.5 x 10 ²	9.0 x 10 ¹	401	396	0.0 (0)	0.0 (0)	1.2 (5)	0.3 (1)
Boues activées	2.0 x 10 ³	5.5 x 10 ³	397	398	0.3 (1)	0.0 (0)	0.3 (1)	0.0 (0)
Boues épaissies	3.8 x 10 ⁴	2.6 x 10 ⁵	399	398	0.5 (2)	0.5 (2)	0.3 (1)	0.3 (1)

a UFC/mL pour les effluents et UFC/g pour les boues

Tableau 8. Pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes, positives pour *intI1*, *intI2* dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes et veaux

Point de prélèvement	Pourcentage (Nombre)							
	<i>E. coli</i> résistantes à au moins un antibiotique		<i>E. coli</i> MDR		<i>E. coli</i> positive pour <i>intI1</i>		<i>E. coli</i> positive pour <i>intI2</i>	
	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux	Bovins adultes	Veaux
Effluents bruts	5.0 (2)	87.5 (35)	2.5 (1)	80.0 (32)	0.0 (0)	57.5 (23)	0.0 (0)	2.5 (1)
Effluents traités	5.0 (2)	90.0 (36)	5.0 (2)	77.5 (31)	0.0 (0)	65.0 (26)	0.0 (0)	10.0 (4)
Boues activées	15.0 (6)	92.5 (37)	2.5 (1)	72.5 (29)	0.0 (0)	50.0 (20)	0.0 (0)	0.0 (0)
Boues épaissies	15.0 (6)	92.5 (37)	5.0 (2)	62.5 (25)	0.0 (0)	52.5 (21)	0.0 (0)	20.0 (10)

a Pour chaque abattoir, 40 isolats d'*E. coli* ont été testés par point de prélèvement.

7.2.2 Composition génétique des populations d'*E. coli*

Dans l'objectif de déterminer la composition génétique des *E. coli* isolées de bovins adultes et de veaux, l'assignation aux 8 phylogroupes a été réalisée chez les 320 isolats d'*E. coli* où l'antibiorésistance avait été recherchée (Figure 20). Les phylogroupes de deux isolats d'*E. coli* par abattoirs n'ont pu être déterminés. Une différence évidente a été observée entre les deux catégories de bovins. Les phylogroupes les plus prévalents étaient B1 suivi de A chez les bovins adultes, tandis que les plus prévalents étaient A suivi de B1 dans les abattoirs de veaux.

Pour chaque catégorie de bovins, aucune différence significative n'a pu être observée entre les proportions d'*E. coli* antibiorésistantes au sein des phylogroupes A et B1 (Figure 20). La même observation a été faite pour le portage d'intégrons dans la population d'*E. coli* isolées dans la STEP de veaux (Figure 21).

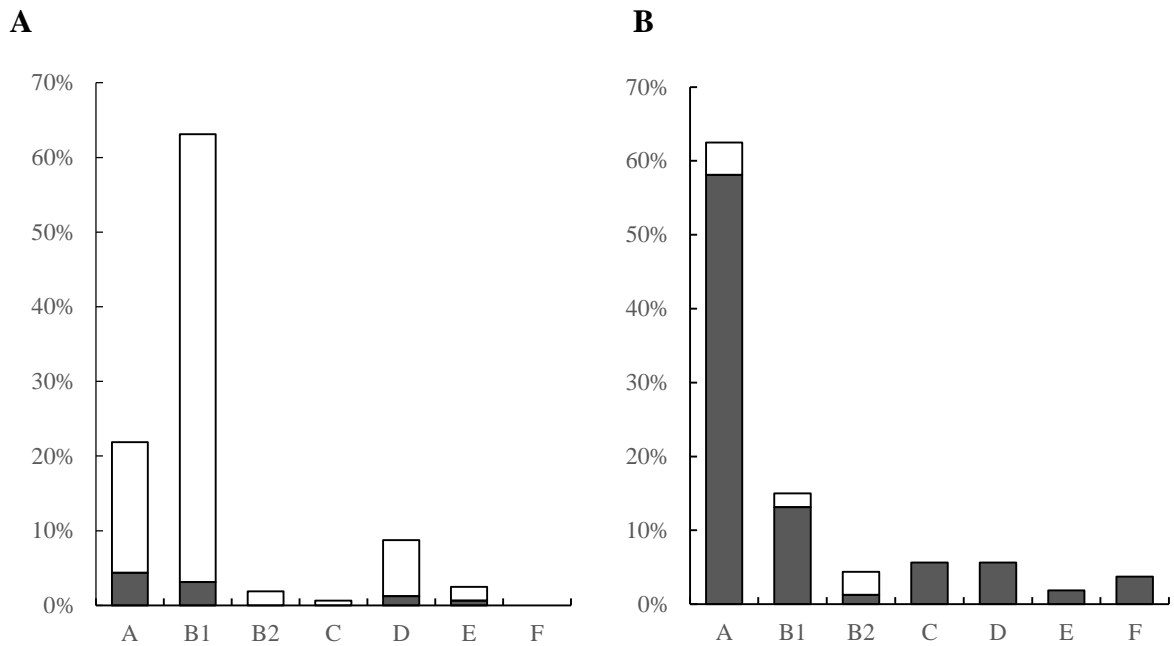


Figure 20. Distribution des phylogroupes pour les 160 *E. coli* isolées dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes (A) et de veaux (B).

Dans chaque STEP, 40 isolats d'*E. coli* ont été testés par point de prélèvement (effluents bruts, effluents traités, boues activées et boues épaissies). Les phylogroupes de 2 isolats d'*E. coli* n'ont pu être déterminés pour chaque abattoir. Les bandes pleines indiquent les proportions d'isolats d'*E. coli* antibiotorésistants.

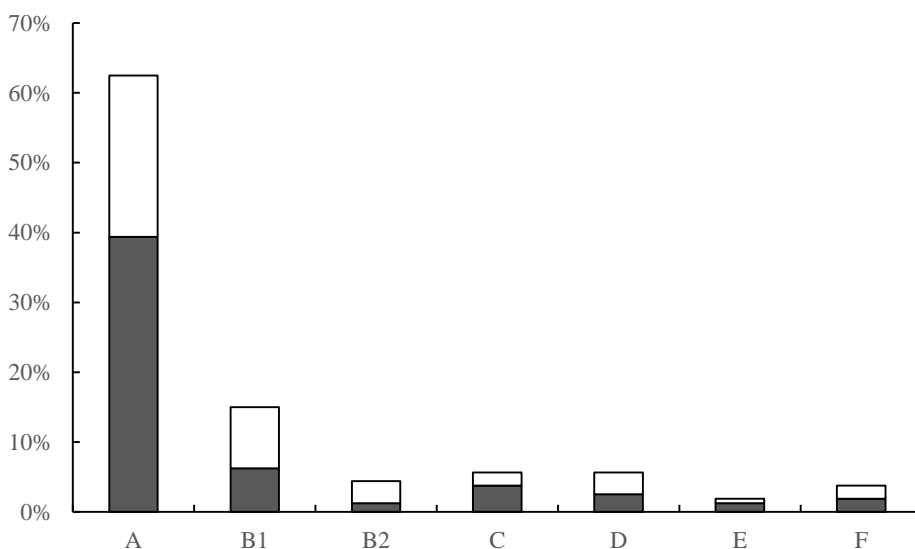


Figure 21. Distribution des phylogroupes pour les 160 *E. coli* isolées dans la STEP d'abattoir de veaux.

Les proportions d'*E. coli* porteuses d'intégrons de classe 1 et 2 au sein de chaque phylogroupe sont représentées par les bandes pleines.

7.2.3 Caractéristiques des isolats d'*E. coli* positifs pour les gènes *stx* et *eae*

Les STEC et EPEC ont été davantage caractérisées d'un point de vue génétique dans le but de préciser leur capacité à induire la maladie chez l'homme (Tableau 9). La souche la plus potentiellement pathogène était une STEC O157:H7 portant les gènes *stx*_{1a}, *stx*_{2c}, *eae*- γ 1. Elle a été isolée après enrichissement par IMS au niveau des boues épaissies d'abattoir de bovins adultes. Parmi les 7 STEC, détectées dans la collection des 3182 isolats d'*E. coli*, le gène *stx*1 a été détecté au niveau de 6 souches dont le sous-type *stx*_{1d} dans les boues de bovins adultes et *stx*_{1a} dans les effluents bruts et boues épaissies de veaux. Une souche positive simultanément pour les gènes *stx*_{2a} et *stx*_{2d} a été isolée dans les boues d'abattoir de bovins adultes.

Les souches EPEC étaient toutes négatives pour le gène *bfpA* et le facteur d'adhérence des EPEC (EAF), ce qui conduisit à les classer comme EPEC atypiques (aEPEC) (Kaper et al., 2004). Le variant *eae* le plus détecté était *eae*- θ . Pour ce qui est de l'antibiorésistance, il est important de noter que sur les 13 souches STEC et aEPEC isolées chez les bovins adultes, seulement 3 étaient résistantes (3/13) et aucune n'était MDR. Au contraire, les 7 STEC et aEPEC isolées dans les effluents et boues d'abattoir de veaux étaient toutes résistantes ; 6 d'entre elles présentaient un phénotype de multirésistance et 3 étaient positives pour le gène *intI1* (souches O, Q, S).

Tableau 9. Caractéristiques des *E. coli* positives pour les gènes *stx* et *eae* isolées dans les STEPs d'abattoirs de bovins adultes et de veaux

Souche ^a	Abattoir	Point de prélèvement	Présence de ^c :		Phénotype de résistance ^e	Présence du gène <i>intI</i> ^c	Phylo-groupe
			<i>eae</i> (sous-type ^d)	<i>stx</i> (sous-type)			
STEC O157:H7							
N	Bovins adultes	Boues épaissies	+ (γ 1)	+ (<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2c})	S	-	E
STEC							
I	Bovins adultes	Boues activées	-	+ (<i>stx</i> _{1d})	S	-	B1
K	Bovins adultes	Boues épaissies	-	+ (<i>stx</i> _{2a} , <i>stx</i> _{2d})	S	-	B1
L	Bovins adultes	Boues épaissies	-	+ (<i>stx</i> _{1d})	GEN STR	-	B1
O	Veaux	Effluents bruts	-	+ (<i>stx</i> _{1a})	AMP STR TET CHL SSS TMP	+	E
P	Veaux	Effluents bruts	-	+ (<i>stx</i> _{1a})	AMP KAN STR TET SSS TMP	-	B1
T	Veaux	Boues épaissies	-	+ (<i>stx</i> _{1a})	AMP KAN STR TET SSS	-	A
U	Veaux	Boues épaissies	-	+ (<i>stx</i> _{1a})	GEN KAN STR	-	B1
aEPEC							
A	Bovins adultes	Effluents bruts	+ (ND)	-	S	-	B1
B	Bovins adultes	Effluents bruts	+ (β 1)	-	S	-	B1
C	Bovins adultes	Effluents bruts	+ (ND)	-	S	-	B1
D	Bovins adultes	Effluents traités	+ (θ)	-	S	-	B1
E	Bovins adultes	Effluents traités	+ (θ)	-	AMP	-	B1
F	Bovins adultes	Effluents traités	+ (θ)	-	S	-	B1
G	Bovins adultes	Effluents traités	+ (θ)	-	S	-	B1
H	Bovins adultes	Effluents traités	+ (θ)	-	STR	-	Indéterminé
J	Bovins adultes	Effluents traités	+ (θ)	-	S	-	B1
M	Bovins adultes	Effluents traités	+ (θ)	-	S	-	B1
Q	Veaux	Effluents bruts	+ (θ)	-	AMP STR TET CHL SSS TMP	+	A
R ^b	Veaux	Effluents traités	+ (γ 1)	-	GEN KAN STR TMP	-	E
S	Veaux	Boues épaissies	+ (θ)	-	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP	+	A

a La souche STEC O157:H7 a été isolée après enrichissement par IMS, tandis que les STEC et aEPEC ont été isolées par PCR en testant environ 400 isolats d'*E. coli* par point de prélèvement.

b La souche R était positive pour le gène *ihp1*_{O145}.

c +, présent; -, absent.

d Les variants suivants du gène *eae* : β 1, γ 1, ε et γ 2/ θ ont été recherchés pour toutes les *E. coli* positives pour le gène *eae*; ND, Non détecté.

e S, sensible à tous les antibiotiques testés; AMP, ampicilline; CHL, chloramphénicol; GEN, gentamicine; KAN, kanamycine; SSS, sulfamides; STR, streptomycine; TET, tétracycline; TMP, triméthoprim.

7.2.4 Caractéristiques des isolats d'*E. coli* antibiorésistants et positifs pour *intI*

Comme mentionné dans le paragraphe 7.2.1, peu d'*E. coli* isolées dans les effluents et boues d'abattoir de bovins adultes étaient antibiorésistantes. Ces isolats étaient principalement résistants à la tétracycline, l'ampicilline, les sulfamides et la streptomycine (Figure 22). Seulement 3,8% des isolats étaient MDR.

Inversément, dans les effluents et boues de veaux, des pourcentages élevés de résistance étaient observés pour la tétracycline, l'ampicilline, les sulfamides, la streptomycine et le triméthoprime (Figure 22).

De plus, 6 isolats étaient résistants à la ciprofloxacine. Des phénotypes MDR ont été observés pour 73,1% des isolats ; et 18,8% étaient résistants à au moins 6 classes d'antibiotiques. Aucun isolat n'a présenté de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations.

La recherche des gènes d'antibiorésistance a permis de mettre en évidence la présence simultanée de deux gènes de résistance à la tétracycline (*tet(A)* et *tet(B)*), sulfamides (combinaisons multiples des gènes *sulI*, *sulII* et *sulIII*) et streptomycine (*strA-strB* et *aadA1*) (Tableau 10).

En ce qui concerne le portage des intégrons, les isolats d'*E. coli* positifs pour les gènes *intI1*, *intI2* ont été uniquement détectés dans les effluents bruts et boues d'abattoir de veaux. Parmi les 90 isolats d'*E. coli* positives pour *intI1*, 88 étaient MDR; tandis que parmi les 70 isolats d'*E. coli* négatives pour *intI1*, 29 étaient MDR. Les différences entre les fréquences de phénotypes MDR et isolats d'*E. coli* positifs et négatifs pour *intI1* étaient significatives.

Parmi les 30 isolats d'*E. coli* résistantes à au moins 6 antibiotiques, 25 étaient positives pour *intI*. La caractérisation des régions variables des intégrons de classe 1 et 2 a été conduite sur 21 isolats d'*E. coli* positifs pour *intI1* résistants à au moins 6 classes d'antibiotiques (Tableau 11). Ces *E. coli* ont été sélectionnées à la suite d'analyses PFGE (données non publiées).

Par ailleurs, les régions variables des intégrons de classe 1 ont été séquencées pour une STEC et 2 aEPEC isolées de STEP d'abattoir de veaux. Nous n'avons pas réussi à déterminer les réseaux de cassettes de gènes pour 5 des isolats d'*E. coli* étudiés. Pour les intégrons de classe 1, le réseau de cassettes le plus fréquent dans les effluents liquides avant et après traitement était *dfrA1-aadA1* suivi de *dfrA17-aadA5* dans les boues activées et épaissies. La souche B3-28 contenait un grand réseau de cassettes de gènes *dfrA16-bla_{PSE1}-aadA2-cmlA*. La souche S positive pour eae contenait un réseau de cassettes inhabituel *aadB-aadA1-IS*.

En ce qui concerne les intégrons de classe 2, 3 réseaux de cassettes de gènes ont été détectés : *dfrA-sat*, *estX-sat* et *estX-sat2-aadA1*. Il était intéressant de remarquer que les intégrons

portaient une faible diversité de cassettes de résistance. Les principaux gènes de résistance que nous avons détectés par PCR étaient en majorité localisés en dehors des intégrons (Tableau 11).

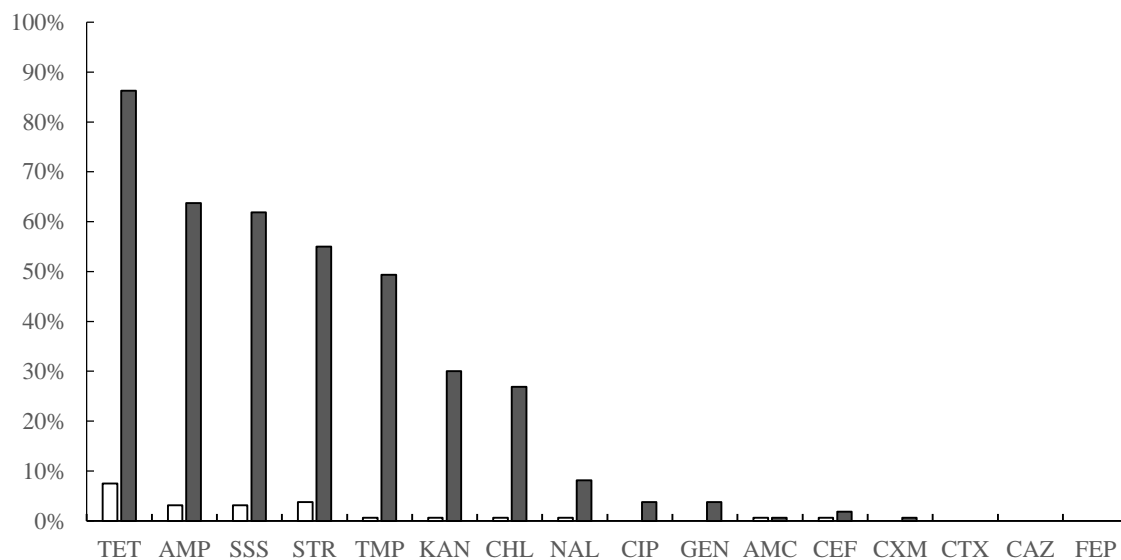


Figure 22. Pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes isolées de STEPs d'abattoirs de bovins adultes (bandes vides) et de veaux (bandes pleines).

AMP, ampicilline; AMC, amoxicilline- acide clavulanique; CAZ, ceftazidime; CEF, céphalothine; CTX, céfotaxime; CXM, céfuroxime; CHL, chloramphénicol; CIP, ciprofloxacine; FEP, céfépime; GEN, gentamicine; KAN, kanamycine; NAL, acide nalidixique; SSS, sulfamides; STR, streptomycine; TET, tétracycline; TMP, triméthoprime.

Tableau 10. Fréquence des gènes d'antibiorésistance (ARGs) chez les *E. coli* isolées de STEPs d'abattoirs de bovins adultes et veaux

Antibiotique (Nombre d'isolats d' <i>E. coli</i> résistants)	ARGs ^a	% (Nombre) d'isolats d' <i>E. coli</i>
Tétracycline (150)	<i>tet(A)</i>	66.0 (99)
	<i>tet(B)</i>	9.3 (14)
	<i>tet(A) & tet(B)</i>	18.0 (27)
	n.d.	6.7 (10)
Ampicilline (107)	<i>bla_{TEM}</i>	94.4 (101)
	n.d.	5.6 (6)
Sulfamides (104)	<i>sulI</i>	22.1 (23)
	<i>sulII</i>	26.0 (27)
	<i>sulII</i>	13.5 (14)
	<i>sulI & sulII</i>	19.2 (20)
	<i>sulI & sulIII</i>	14.4 (15)
	<i>sulII & sulIII</i>	1.9 (2)
	<i>sulI & sulII & sulIII</i>	1.0 (1)
n.d.	1.9 (2)	
Streptomycine (94)	<i>strA-strB</i>	35.1 (33)
	<i>aadA1</i>	6.4 (6)
	<i>strA-strB & aadA1</i>	54.3 (51)
	n.d.	4.2 (4)
Chloramphénicol (44)	<i>cmlA</i>	22.7 (10)
	<i>catI</i>	72.7 (32)
	<i>catII</i>	0.0 (0)
	<i>catIII</i>	0.0 (0)
	n.d.	4.6 (2)

a n.d. non déterminé

Tableau 11. Phénotype de résistance et réseau de cassettes de gènes des *E. coli* isolées dans la STEP d'abattoir de veaux

Souche ^a	Point de prélèvement	Phénotype de résistance ^d	gène <i>intI</i>	Réseau de cassettes de gènes ^e	Phylo- groupe
B1-8	Effluents bruts	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP NAL	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>dfrA-sat</i>	E
B1-11	Effluents bruts	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B1-13	Effluents bruts	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	E
B1-14	Effluents bruts	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	C
B1-18	Effluents bruts	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	F
B1-22	Effluents bruts	AMP KAN STR TET SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	B1
B1-39	Effluents bruts	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	C
O ^b	Effluents bruts	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	n.d.	E
Q ^c	Effluents bruts	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B2-3	Effluents traités	AMP TET CHL SSS TMP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B2-19	Effluents traités	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	B1
B2-28	Effluents traités	AMP GEN KAN TET CHL SSS TMP	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>estX-sat</i>	A
B3-17	Boues activées	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B3-19	Boues activées	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	B1
B3-25	Boues activées	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA17-aadA5</i>	B1
B3-28	Boues activées	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA16-bla_{PSE1}-aadA2-cmlA1</i>	A
B3-31	Boues activées	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B3-43	Boues activées	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B3-46	Boues activées	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B4-20	Boues activées	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>estX-sat2-aadA1</i>	A
B4-37	Boues épaissies	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>estX-sat2-aadA1</i>	A
B4-44	Boues épaissies	AMP GEN KAN TET SSS TMP NAL	1	<i>dfrA17-aadA5</i>	Indéter- miné
B4-53	Boues épaissies	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	B2
S ^c	Boues épaissies	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>aadB-aadA1-IS</i>	A

a Identification des souches : B1, Effluents bruts; B2, effluents traités; B3, boues activées; B4, boues épaissies; O,

Q et S étaient des souches positives pour les gènes *stx* ou *eae*

b La souche O était positive pour le gène *stx_{1a}*.

c Les souches Q et S étaient positives pour le gène *eae-θ*.

d AMP, ampicilline; CHL, chloramphénicol; CIP, ciprofloxacine; GEN, gentamicine; KAN, kanamycine; NAL, acide nalidixique; SSS, sulfamides; STR, streptomycine; TET, tétracycline; TMP, triméthoprime

e *aadA*, aminoglycoside adenylyltransferases conférant la résistance à la streptomycine et spectinomycine; *aadB*, aminoglycoside adenylyltransferases conférant la résistance à la gentamicine, kanamycine and tobramycine; *bla_{PSE1}*, β-lactamase conférant la résistance aux β-lactamines; *cmlA1*, chloramphenicol exporter conférant la résistance au chloramphénicol; *dfrA*, dihydrofolate reductase qui confère la résistance au triméthoprim; *estX*, putative esterase / hydrolase; IS, Insertion Sequence; *sat*, streptothricin acetyltransferase conférant la résistance à la streptothricine; n.d., non déterminé.

7.3 DISCUSSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'implication des effluents d'abattoirs de bovins dans le risque de dissémination environnementale d'*E. coli* pathogènes et antibiorésistantes. Nous nous sommes intéressés à deux catégories d'abattoirs. L'un abattait uniquement des bovins adultes et l'autre uniquement des veaux. Les deux abattoirs disposaient chacun d'une station d'épuration complète avec un système d'épuration à base de boues activées.

7.3.1 Impact du traitement épuratoire sur les populations d'*E. coli*

L'impact du traitement épuratoire a été évalué sur les charges bactériennes d'*E. coli* viables. Comme nous l'avons déjà observé dans des STEPs d'abattoirs multiespèces à différentes dates de prélèvement, le traitement épuratoire a permis une réduction d'au moins 99% de la charge bactérienne en *E. coli* (Bibbal et al., 2014a). Cependant, jusqu'à 10^2 UFC/mL d'*E. coli* étaient rejetées dans les rivières réceptrices et jusqu'à 10^5 UFC/mL d'*E. coli* étaient présentes dans les boues épaissies. Les charges bactériennes en *E. coli* étaient semblables à celles des effluents et boues observées dans les STEPs urbaines (Reinthal et al., 2003; Pignato et al., 2010).

Pour chaque point de prélèvement, le pourcentage d'*E. coli* antibiorésistantes a été estimé. Afin d'analyser en profondeur les caractéristiques génétiques des populations d'*E. coli* dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur une campagne de prélèvement dans chaque STEP, où nous avons isolé et analysé un nombre important de souches. Ce choix pourrait probablement limiter l'extrapolation et les interprétations statistiques. Cependant, dans le but d'obtenir des échantillons représentatifs, les prélèvements que nous avons analysés avaient été collectés sur une journée entière d'activité des STEPs.

Par ailleurs, il est important de noter que les niveaux de résistance et la distribution phylogénétique des *E. coli* obtenus dans les effluents de l'abattoir de veaux, étaient similaires à ceux rapportés par Haenni *et al.* pour des populations d'*E. coli* isolées de fèces de 491 veaux prélevés dans 12 abattoirs pendant une période de 6 mois (Haenni et al., 2014). Tous ces éléments montrent que nos données étaient reproductibles.

La tendance observée est que le traitement épuratoire n'a pas eu d'impact sur les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes, positives pour *intI1*. A notre connaissance, cette étude est la première qui a évalué l'impact du traitement épuratoire sur les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes isolées de STEPs d'abattoirs de bovins.

Nos données peuvent être comparées à celles qui ont rapporté l'impact de traitements épuratoires sur les bactéries indicatrices de contamination fécale dans des STEPs urbaines utilisant le traitement épuratoire par les boues activées. La tendance que nous avons observée

est différente de celle de la majorité de ces études qui ont souvent montré une augmentation du pourcentage de bactéries antibiorésistantes.

De nombreuses études déclarent que le transfert horizontal de gènes et/ou la sélection de bactéries antibiorésistantes par des antibiotiques potentiellement présents dans les STEP s pourraient expliquer ces augmentations (Moura et al., 2007; Luczkiewicz et al., 2010). Cependant, ces phénomènes n'ont pas été complètement élucidés et d'autres mécanismes pourraient être impliqués. L'élimination sélective de microorganismes sensibles par rapport à leurs homologues résistants pourrait favoriser l'augmentation de la résistance (Ferreira da Silva et al., 2006; Figueira et al., 2011). Kim et ses collaborateurs ont démontré que la survie des bactéries antibiorésistantes était significativement influencée par les changements de condition du traitement épuratoire (Kim et al., 2007).

Au contraire, comme observé dans notre étude, certaines études ont rapporté que les pourcentages de coliformes fécaux ou *E. coli* antibiorésistants n'étaient pas impactés par les traitements épuratoires dans les STEP s (Reinthal et al., 2003; Biswal et al., 2014). Ferreira et ses collaborateurs ont rapporté des fréquences similaires d'*E. coli* positives pour *intI1* dans les effluents bruts et traités, en revanche ils observaient une augmentation du pourcentage d'*E. coli* antibiorésistantes (Ferreira da Silva et al., 2007).

Enfin, très peu d'études ont montré une diminution de la prévalence de souches antibiorésistantes (Garcia et al., 2007; Rijal et al., 2009). Les raisons de cette diminution n'ont pas encore été complètement élucidées.

7.3.2 Dissémination des souches d'*E. coli* pathogènes

La souche la plus pathogène a été isolée dans les boues épaissies d'abattoirs de bovins adultes par IMS après enrichissement. Ces boues sont destinées à être épandues sur des parcours agricoles. Il s'agissait d'une *E. coli* positive pour les gènes *stx*_{1a}, *stx*_{2c} et *eae-γ1*. Cette souche peut être considérée comme hautement pathogène pour l'homme (ANSES, 2010).

En France, dans une étude précédente, la recherche d'*E. coli* appartenant au séro groupe O157 dans les effluents et boues de 12 STEP s d'abattoirs multi-espèces avait conduit à la détection de STEC O157:H7 dans les effluents bruts (Loukiadis et al., 2006). Plus récemment, une étude en Turquie a détecté des STEC O157:H7 dans des échantillons d'eaux usées d'abattoirs de bovins (3 sur 24 testés), qui étaient rejetées dans la rivière réceptrice sans traitement épuratoire préalable (Ayaz et al., 2014). La détection de STEC O157:H7 dans les effluents rejetés dans la rivière et dans les boues est préoccupante pour la santé publique. En effet, il a été montré que les *E. coli* O157:H7 peuvent survivre dans les environnements aquatiques de 2 semaines à 10

mois (Chekabab et al., 2013). De plus, les temps de survie de ces souches après application sur les parcours agricoles peuvent varier de 70 à 266 jours après épandage (Franz et al., 2011). Les STEC O157:H7 peuvent par conséquent être transmises aux humains *via* le contact avec des environnements contaminés ou la consommation d'eau ou de végétaux contaminés (Chekabab et al., 2013).

La souche STEC O157:H7 que nous avons isolée était sensible à tous les antibiotiques testés. En Turquie, les souches STEC O157:H7 isolées dans les effluents bruts d'abattoir de bovins étaient également sensibles à l'exception d'une souche multirésistante (Ayaz et al., 2015).

La recherche des marqueurs génétiques associés aux EHEC dans les collections d'*E. coli* isolées sans enrichissement a montré que le pourcentage d'*E. coli* STEC et aEPEC était d'environ 1%, ce qui est cohérent avec les études précédentes menées dans les effluents de STEPs d'abattoirs multi-espèces (Garcia-Aljaro et al., 2004; Loukiadis et al., 2006). Parmi les souches détectées, certaines portaient des marqueurs de virulence déjà associés à des *E. coli* responsables de maladie humaine. Une souche aEPEC était positive pour le sous-type *eae*- β 1 déjà détecté chez des souches EPEC typiques et atypiques isolées dans les fèces de patients (Nataro and Kaper, 1998; Trabulsi et al., 2002). Pour les souches STEC, les sous-types *stx*_{1a}, *stx*_{2a}, *stx*_{2c} et *stx*_{2d} ont déjà été associés à des symptômes graves chez l'homme (Melton-Celsa, 2014).

7.3.3 Dissémination de souches d'*E. coli* antibiorésistantes

Dans les deux abattoirs, le traitement épuratoire n'a pas permis d'éliminer les *E. coli* antibiorésistantes dans les effluents et dans les boues. Par ailleurs, nous avons détecté des pourcentages significativement élevés d'*E. coli* antibiorésistantes dans les effluents et boues d'abattoir de veaux comparativement à celles de bovins adultes.

En outre, les isolats positifs pour *intI1* et *intI2* ont uniquement été détectés dans les effluents et boues d'abattoir de veaux. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études qui avaient rapporté un niveau élevé de résistance chez les *E. coli* isolées dans la flore fécale de veaux (Di Labio et al., 2007; Bosman et al., 2014). Ces études ont également identifié que, parmi les facteurs d'élevage, l'utilisation des antibiotiques augmentait significativement le risque d'apparition d'antibiorésistance au niveau de la ferme. Dans le but de surveiller l'usage et l'exposition des animaux aux antibiotiques, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) estime chaque année le niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques appelé ALEA (« *Animal level of exposure to antimicrobials* »). L'ALEA est calculé par le rapport du poids corporel traité sur la masse

animale susceptible d'être traitée aux antibiotiques. En 2012, l'ALEA a été estimé à 0,32 chez les bovins adultes et 3,41 chez les veaux (ANSES, 2013). De plus, l'ANSES estimait également que la moyenne de traitements par voie orale chez les veaux était de 4,20 par veau. L'antibiotique le plus administré était la tétracycline, ce qui correspond avec le fait que le plus haut niveau de résistance a été observé contre la tétracycline dans les effluents et les boues de notre étude.

Nous avons également montré que le niveau de résistance, indépendamment de la phylogénie, était lié à l'origine des bovins ; c'est-à-dire les bovins adultes vs les veaux de boucherie.

Premièrement, il était important de noter que toutes les souches STEC et aEPEC isolées des effluents de veaux étaient résistantes, en revanche ces souches étaient majoritairement sensibles lorsqu'elles étaient isolées dans les effluents de bovins adultes. Cette tendance indique que le niveau de résistance semblait associé à l'origine de la souche, indépendamment de la présence de gènes de virulence.

Deuxièmement, nous avons observé que pour chaque catégorie de bovins, l'antibiorésistance et le portage d'intégrons (pour les veaux) était indépendamment distribués à l'intérieur de chaque phylogroupe. Cette observation a également été faite par Haenni et ses collaborateurs qui ont étudié la distribution d'*E. coli* productrices de BLSEs isolées de fèces de veaux (Haenni et al., 2014). Ces résultats montraient qu'il n'y avait aucun lien entre l'antibiorésistance et la phylogénie chez les isolats d'*E. coli* testés.

7.3.4. Co-occurrence du gène *intI1* et du phénotype MDR

Dans notre étude, la présence du gène *intI1* dans les isolats d'*E. coli* était un bon indicateur de phénotypes de multirésistance, quel que soit le contenu des réseaux de cassettes de gènes. Le lien entre l'antibiorésistance et la présence d'intégrons est en accord avec de précédentes études (Leverstein-van Hall et al., 2003; Laroche et al., 2009). Les intégrons seuls n'expliquent pas complètement le phénotype de multirésistance. Les intégrons sont habituellement transportés par des transposons ou plasmides, qui peuvent également porter des gènes de résistance. Ce qui est cohérent avec le fait que les gènes majoritaires de résistance que nous avons détectés par PCR (*tet*, *bla_{TEM}*, *sulII*) n'étaient pas présents dans les cassettes de gènes des intégrons.

Nous avons montré que les intégrons de classe 1 et 2 contenaient peu de gènes de résistance, il s'agissait principalement des gènes *aadA* et *dfr* comme déjà reporté dans d'autres études s'intéressant aux *E. coli* isolées dans les fèces de bovins (Barlow et al., 2009; Karczmarczyk et al., 2011). Cependant, une *E. coli* positive pour *intI1* contenait les gènes *bla_{PSE}* et *cmlA1* qui avaient déjà été détectés dans des isolats d'*E. coli* (Du et al., 2005; Pallecchi et al., 2007).

Cette étude montre que dans les deux abattoirs, les pourcentages d'E. coli antibiorésistantes et positives pour int11 n'ont pas été impactés par le traitement épuratoire. Par ailleurs, nous avons observé que les pourcentages d'E. coli antibiorésistantes et positives pour int11 étaient significativement plus élevés dans les effluents et boues de l'abattoir de veaux comparativement à ceux de l'abattoir de bovins adultes. Environ 10¹⁰ E. coli multirésistantes étaient rejetées quotidiennement dans la rivière réceptrice des effluents d'abattoir de veaux. La souche la plus pathogène, une STEC O157:H7, isolée de boues d'abattoir de bovins adultes, pourrait se retrouver dans l'environnement après épandage.

En conséquence, nous avons montré que les risques pour la santé publique pourraient être différents, en fonction de la catégorie d'abattoir. Ils devraient être encore mieux caractérisés dans le but de proposer une meilleure gestion des eaux usées et boues afin de réduire au maximum la dissémination environnementale d'E. coli pathogènes et antibiorésistantes.

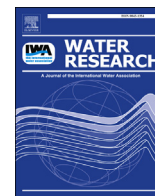
7.4 VALORISATION DES RESULTATS OBTENUS

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article publié dans la revue scientifique internationale *Water Research* ainsi que trois posters et trois communications orales présentés lors de congrès nationaux et internationaux.

7.4.1 Publication n°1

“Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health”

Maryse Michèle Um, Olivier Barraud, Monique Kérouédan, Margaux Gaschet, Thibault Stalder, Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, Hubert Brugère, Delphine Bibbal. *Water Research*, 2016 Jan 1, **88**:30-38.



Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health



Maryse Michèle Um^a, Olivier Barraud^{b, c, d}, Monique Kérourédan^a,
Margaux Gaschet^{b, c, d}, Thibault Stalder^e, Eric Oswald^f, Christophe Dagot^e,
Marie-Cecile Ploy^{b, c, d}, Hubert Brugère^a, Delphine Bibbal^{a, *}

^a INSERM UMR1043, INRA USC1360, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France

^b Université de Limoges, UMR1092, Limoges, France

^c INSERM, UMR1092, Limoges, France

^d CHU Limoges, laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Limoges, France

^e Université de Limoges, EA4330 GRESE, Limoges, France

^f INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2015

Received in revised form

9 September 2015

Accepted 15 September 2015

Available online 28 September 2015

Keywords:

Antibiotic-resistant *Escherichia coli*

Cattle slaughterhouse

STEC

Integrans

Wastewater treatment process

ABSTRACT

The goal of this study was to investigate the involvement of bovine slaughterhouse effluents and bio-solids in the risk of environmental dissemination of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli*. Several samples were collected from one adult cattle and one veal calf slaughterhouse wastewater treatment plant (WWTP). The treatment process had no impact on the percentage of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and on the percentage of atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC). A STEC O157:H7 was isolated from the thickened sludge of the adult cattle slaughterhouse. As thickened sludge is intended to be spread on agricultural lands, the detection of this pathogenic strain is a public health issue. The percentage of antibiotic-resistant *E. coli* was 5.0% and 87.5% in wastewater from the adult cattle and the veal calf slaughterhouse, respectively. These percentages were not significantly different after treatment. Integron-bearing *E. coli* isolates were only detected in the veal calf slaughterhouse WWTP with percentages above 50.0% for all sampling points whatever the step of the treatment process. Taken together, these findings highlighted the fact that different public health risks might be associated with adult cattle or veal calf slaughterhouses regarding the dissemination of pathogenic and antibiotic-resistant *E. coli* isolates into the environment.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The environment is a reservoir of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs), which is shaped by anthropogenic activities (Gaze et al., 2013; Marti et al., 2014). Indeed, the use of antibiotics for human, veterinary and agricultural purposes leads to their release in the environment. Moreover, antibiotic use in humans and animals leads to the selection of ARB in the digestive tract, which are also discharged into the

environment *via* wastewater of animal, domestic, hospital and industrial origin and *via* land application of animal waste (Pruden et al., 2013). The presence of ARB and ARGs in the environment is a public health issue, as the transfer of ARGs to human pathogenic bacteria could occur (Ashbolt et al., 2013).

Integrans are genetic elements that acquire and exchange gene cassettes. Integrans, associated with mobile genetic elements, carry mainly antibiotic resistance genes and consequently promote the spread of antibiotic resistance (Partridge et al., 2009). There is a growing concern about their prevalence in the environment, and how this prevalence is impacted by human activities (Amos et al., 2015). Urban wastewater treatment plants (WWTPs) are considered as “hotspots” for the release of ARB, ARGs and integrans into the environment (Rizzo et al., 2013; Stalder et al., 2012). However,

* Corresponding author. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, BP 87 614, 31 076 Toulouse Cedex 3, France.

E-mail address: d.bibbal@envt.fr (D. Bibbal).

only a few studies focused on slaughterhouse WWTPs (da Costa et al., 2008; Martins da Costa et al., 2006; Moura et al., 2007; Moura et al., 2010; Sabate et al., 2008).

Slaughterhouse WWTPs have also been involved in the environmental dissemination of zoonotic pathogenic bacteria, notably enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) (Ayaz et al., 2014; Garcia-Aljaro et al., 2004; Loukiadis et al., 2006). EHEC strains are a subset of Shiga toxin (*stx*)-producing *E. coli* strains (STEC) that are responsible for severe clinical symptoms, such as those of hemorrhagic colitis and the hemolytic uremic syndrome (Kaper et al., 2004). The French Agency for Food Safety defined five major EHEC strains as STEC belonging to serotypes O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 and O111:H8 (ANSES, 2010). When isolated from the food chain and the environment, these top five STEC are considered to be highly pathogenic for humans. The digestive tract of cattle has been identified a major reservoir of EHEC, and the contamination of the environment is due to bovine effluents (Chekabab et al., 2013). The consumption of contaminated water and contact with a contaminated environment have been shown to be the source of contamination of 10% of cases of EHEC O157:H7 outbreaks; and the consumption of contaminated fruits and vegetables has become more and more involved in EHEC O157:H7 infections in the USA (Snedeker et al., 2009; Xicohtencatl-Cortes et al., 2009).

The objective of this study was to assess the dissemination of antibiotic-resistant, integron bearing and pathogenic *E. coli* by bovine slaughterhouse effluents and biosolids. This study was conducted in two different bovine slaughterhouses using a same activated sludge process: one slaughtered adult cattle only and the other one veal calves only. Assessment of the risk of antibiotic-resistant and pathogenic *E. coli* dissemination between the two types of slaughterhouse has been investigated as well as the impact of the wastewater treatment process.

2. Materials and methods

2.1. Slaughterhouse wastewater treatment plants (WWTPs) and sampling

Samples were collected in two French slaughterhouses in May 2011. One slaughtered adult cattle up to 35,000 tons carcass weight equivalent per year. The other one slaughtered veal calves up to 25,500 tons carcass weight equivalent per year. These slaughterhouses possessed a WWTP, allowing them to discharge the treated effluents into the environment. For both slaughterhouses, the pretreatment was a mechanical screening and fat separation. The secondary treatment consisted of an activated sludge process. Sludge was thickened by centrifugation and stored before being disposed for land application. For the two WWTPs, the hydraulic retention time was 10 days, and the sludge retention time was 5 and 6 months for the adult cattle and the veal calf slaughterhouse WWTP, respectively. At the time of sampling, the temperature was approximately between 12 and 15 °C in the aeration tank of both slaughterhouses. Each slaughterhouse WWTP was visited once, and 4 samples were collected from each WWTP: wastewater, treated effluent, activated sludge and thickened sludge. Samples were collected over a 24 h activity of the slaughterhouse by an automatic refrigerated auto-samplers installed after the pretreatment step (wastewater) and before release into the river (treated effluents). Activated sludge and thickened sludge were obtained by a punctual sampling at the recirculation into the aeration tank and from the storage tank, respectively. Samples were collected in sterile container and shipped at 4 °C to the laboratory to be processed within 24 h. Effluents were analyzed for pH, Chemical Oxygen Demand (COD), measured by the colorimetric method (ISO

15705:2002), and Biochemical Oxygen Demand (BOD₅), using the OxiTop[®] system (WTW). The Total Suspended Solids (TSS) and the Volatile Suspended Solids (VSS) were done according to the standard method (AFNOR, NF T 90–105). The measured values are presented in Table 1.

2.2. Enumeration and isolation of *E. coli*

Wastewater and treated effluents (0.5 L) were concentrated to a final volume of 10 mL and 5 mL, respectively. Wet sludge (25 g) were diluted 10-fold (w/v) in 225 mL of modified tryptone salt broth (Oxoid, Dardilly, France). Decimal dilutions were then plated onto Petrifilm[™] Select *E. coli* (Grosseron, Saint Herblain, France). Bacterial enumerations were performed after incubation at 42 °C for 24 h. For each sampling point, a collection of about 400 *E. coli* isolates should be constituted. To this end, for each sampling point, about 20 Petrifilm[™] Select *E. coli* were inoculated with the dilutions giving at least 30 well isolated colonies. After incubation, about 400 isolates could be randomly picked for each sample and were grown at 37 °C for 24 h into 96-well microtiter plates containing LB broth. Isolates were then stored at –80 °C after addition of 30% glycerol for further analysis. Finally, a collection of 3182 *E. coli* isolates was saved.

2.3. Isolation of top five STEC after enrichment

Concentrated effluent samples (1 mL) were enriched in 9 mL of modified Trypticase soy broth, supplemented with novobiocin at 16 mg/L. For sludge, 10 mL of the first dilution used for enumeration were enriched in 90 mL of the same broth. Broths were then incubated overnight at 37 °C. Bacterial DNA was extracted from 1 mL of each enriched broth using lysis tube (Pall GeneDisc Technologies, Bruz, France). DNA extracts were then subjected to a sequential real time PCR-based approach for the detection of EHEC-associated genetic markers (Bibbal et al., 2014b). Isolations of *E. coli* strains belonging to the five targeted serotypes were performed for enriched broths that tested positive by PCR for the simultaneous presence of one *stx* gene, an *eae* subtype and its associated O group marker. Isolation procedure consisted of immunomagnetic separation (IMS)-assays using Dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), as recommended by the manufacturer. Ten microliters of immunoenriched bacteria were plated onto cefixime-tellurite-sorbitol-MacConkey agar (Oxoid, Dardilly, France) for *E. coli* O157, O103 and O111, onto cefixime-tellurite-rhamnose-MacConkey agar for *E. coli* O26 and onto cefixime-tellurite-raffinose-MacConkey agar for *E. coli* O145. A total of 10 plates were used for each serogroup and all media were incubated for 18–24 h at 37 °C. Up to 10 suspect colonies were tested by slide agglutination with serogroup specific antisera (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Once the targeted serogroup was confirmed by PCR, the presence of *stx* and *eae* gene was screened. The subtype of the *stx* gene was then determined and the presence of the *eae* variants $\beta 1$, $\gamma 1$, ϵ and $\gamma 2/\theta$ was tested as mentioned in the 2.4 section.

2.4. Detection and characterization of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* isolates

The 3182 *E. coli* isolates were screened for the presence of EHEC-associated genetic markers. They were grouped into pools from which DNA was extracted using NaOH. The detection of *stx1*, *stx2*, *eae* genes was performed by real-time PCR as previously described (Auvray et al., 2009; Nielsen and Andersen, 2003). Positive isolates for at least one virulence gene were confirmed to be *E. coli* with an API 20E test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Subtyping of *stx1* and *stx2* genes was performed as described by Scheutz et al.

Table 1
Characteristics of adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents at the time of sampling.

Sampling point	TSS (mg/L)		VSS (mg/L)		COD ^a (mg/L)		BOD ₅ ^b (mg/L)		pH	
	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf
Wastewater	5800	3600	5350	2270	1860	2275	2570	n.d.	7.6	7.5
Treated effluent	14	11	n.d.	n.d.	72	90	11	9	n.d.	7.1

n.d., not determined.

^a Soluble COD.

^b Total BOD₅ for wastewater and soluble BOD₅ for the treated effluent.

(Scheutz et al., 2012). The presence of the four following *eae* variants: $\beta 1$, $\gamma 1$, ϵ and $\gamma 2/\theta$ was screened by real-time PCR (Madic et al., 2011). In addition, *eae*-positive isolates were tested for the presence of *bfpA* gene and EPEC adherence factor (EAF) plasmid (Franke et al., 1994; Gunzburg et al., 1995). *E. coli* isolates were classified into two groups: STEC (positive for *stx1* and/or *stx2* genes) and atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) (positive for *eae* gene, and negative for *stx1*, *stx2*, *bfpA* and EAF plasmid (Kaper et al., 2004). The five major serotypes associated with EHEC (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O111:H8 and O103:H2) were investigated in STEC and aEPEC isolates, by real-time PCR (Madic et al., 2011; Perelle et al., 2004).

2.5. Detection and characterization of antibiotic-resistant *E. coli* isolates

For each sampling point, a sub-collection of 40 *E. coli* isolates confirmed with an API 20E test was randomly constituted. All the 320 *E. coli* isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing using a disk diffusion method according to the CLSI recommendations (CLSI, 2008, 2009a, 2009b). The 16 antibiotic disks (Bio-Rad[®], Marnes-La-Coquette, France) used in this study were ampicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, cephalothin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, streptomycin, gentamicin, kanamycin, tetracycline, nalidixic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, trimethoprim, and sulfonamides. *E. coli* ATCC 25922 was used as a control strain. Isolates were considered as multidrug resistant (MDR) when they exhibited resistance to at least 3 antibiotic classes (Schwarz et al., 2010). The isolates resistant to ampicillin, streptomycin, tetracycline, sulfonamides and/or chloramphenicol, were screened for the following resistance determinants: (*bla*_{TEM}), (*strA-strB*, *aadA1*), (*tet*(A), *tet*(B)), (*sull*, *sullI*, *sullII*), (*cmlA*, *catI*, *catII*, *catIII*) using primers and control strains as previously described by Bibbal et al. (Bibbal et al., 2009).

2.6. Detection of integron-positive *E. coli* isolates and characterization of the variable region of integrons

int11, *int12* and *int13* genes corresponding to the three main classes of integrons was screened in the collection of 320 *E. coli* isolates using a triplex real time PCR (Barraud et al., 2010). So as to determine the gene cassette arrays, the variable regions of class 1 and class 2 integrons were amplified with primers 5'CS/3'CS and hep51/hep74, respectively (Gassama Sow et al., 2010). PCR mixes of 50 μ L final volume were prepared with 5 μ L of total DNA using the Takara Ex Taq[™] (Takara) as recommended by the supplier. The PCR program consisted of a 3-min initial step at 95 °C, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 3 min, and a final step at 72 °C for 10 min. Sequencing was performed with the same primers using the BigDye[®] terminator (LifeTechnologies) as recommended by the supplier. Sequences were submitted to the Genbank nucleotide collection (nr/nt) using the BLAST alignment search tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) to check for homology

with previously reported gene cassettes.

2.7. Phylogenetic group typing of *E. coli* isolates

The phylogenetic group was determined for the 320 *E. coli* isolates by the new phylogenetic group assignment PCR-based method (Clermont et al., 2012). This method led to the assignment of an *E. coli* isolate to one of the eight phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, F, *Escherichia* cryptic clade I) and *Escherichia* cryptic clades II to V.

2.8. Statistical analysis

For each slaughterhouse, a Pearson's Chi-squared test was used to test if pathogenic, resistant and *int11*-positive *E. coli* isolates were evenly distributed among sampling points (null hypothesis). For each sampling point, this test was also used to evaluate if pathogenic and resistant *E. coli* isolates were evenly distributed among slaughterhouses. It was also used to test the distribution of antibiotic resistance among phylogenetic groups. The frequencies of MDR in *int11*-positive and *int11*-negative *E. coli* isolates were compared with Fischer's exact test. The statistical significance was set at a *P* value < 0.05. Statistical analyses were performed using the R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. Results

3.1. Treatment impact on *E. coli* populations

The impact of the slaughterhouse wastewater treatments was investigated on *E. coli* counts and on the percentage of pathogenic and antibiotic-resistant *E. coli* isolates. After treatment, the number of viable *E. coli* was reduced by about 99.9% in the wastewater effluent (Table 1). Treated effluents still contained around 10² CFU/mL *E. coli*; and up to 10⁵ CFU/g *E. coli* were present in the thickened sludges. The percentages of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* isolates were very low, and no significant difference was observed according to the slaughterhouse or the sampling point (Table 2). A total of 7 *stx*-positive *E. coli* isolates and 13 *eae*-positive *E. coli* isolates were detected by PCR screenings of 3182 isolates. None of the isolates harbored simultaneously *stx* and *eae* genes. Moreover, specific detection of the top five STEC by IMS after enrichment allowed the detection of one *E. coli* O157:H7 isolate in the thickened sludge from the adult cattle slaughterhouse.

In the adult cattle slaughterhouse, percentages of antibiotic-resistant *E. coli* were very low with less than 5.0% of MDR *E. coli*; and no *int11*-positive isolate was detected (Table 3). On the contrary, in the veal calf slaughterhouse, for each sampling point, the percentages of antibiotic-resistant were significantly higher with percentages of MDR *E. coli* between 62.5 and 80.0%. The percentage of *int11*-positive *E. coli* was above 50.0% for all sampling points. *Int12*-positive *E. coli* were isolated from all sampling points except

Table 2
E. coli counts and percentage of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* isolates in adult cattle and veal calf slaughterhouse WWTPs.

Sampling point	<i>E. coli</i> counts ^a		No. of <i>E. coli</i> screened for <i>stx</i> and <i>eae</i> genes		Percentage (No.) of			
	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf	<i>stx</i> -positive <i>E. coli</i> isolates		<i>eae</i> -positive <i>E. coli</i> isolates	
					Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf
Wastewater	8.5×10^5	1.4×10^5	395	398	0.0 (0)	0.5 (2)	0.8 (3)	0.3 (1)
Treated effluent	6.5×10^2	9.0×10^1	401	396	0.0 (0)	0.0 (0)	1.2 (5)	0.3 (1)
Activated sludge	2.0×10^3	5.5×10^3	397	398	0.3 (1)	0.0 (0)	0.3 (1)	0.0 (0)
Thickened sludge	3.8×10^4	2.6×10^5	399	398	0.5 (2)	0.5 (2)	0.3 (1)	0.3 (1)

^a CFU/mL for effluents and CFU/g for sludge.

Table 3
Percentage of antibiotic-resistant *E. coli*, *int11* and *int12*-positive *E. coli* in adult cattle and veal calf slaughterhouse WWTPs.^a

Sampling point	Percentage (No.) of							
	<i>E. coli</i> resistant to at least one antibiotic		MDR <i>E. coli</i>		<i>int11</i> -positive <i>E. coli</i>		<i>int12</i> -positive <i>E. coli</i>	
	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf	Adult cattle	Veal calf
Wastewater	5.0 (2)	87.5 (35)	2.5 (1)	80.0 (32)	0.0 (0)	57.5 (23)	0.0 (0)	2.5 (1)
Treated effluent	5.0 (2)	90.0 (36)	5.0 (2)	77.5 (31)	0.0 (0)	65.0 (26)	0.0 (0)	10.0 (4)
Activated sludge	15.0 (6)	92.5 (37)	2.5 (1)	72.5 (29)	0.0 (0)	50.0 (20)	0.0 (0)	0.0 (0)
Thickened sludge	15.0 (6)	92.5 (37)	5.0 (2)	62.5 (25)	0.0 (0)	52.5 (21)	0.0 (0)	20.0 (10)

^a In each slaughterhouse, 40 *E. coli* isolates were tested per sampling point.

from activated sludge. Moreover, 13 *E. coli* isolates harbored both *int11* and *int12* genes. No *int13* gene was detected. With regard to the treatment process impact, in both slaughterhouses, the percentages of antibiotic-resistant *E. coli* were not significantly different according to the sampling point, as well as percentages of *int11*-positive *E. coli* in the veal calf slaughterhouse plant. Finally, for the veal calf slaughterhouse, taking into account the percentage of MDR *E. coli* and the average flow of treated effluents ($382 \text{ m}^3/\text{day}$); it was estimated that 2.6×10^{10} MDR *E. coli* isolates were daily discharged into the recipient river.

3.2. Genetic composition of *E. coli* populations

In order to investigate the genetic composition of *E. coli* originating from adult cattle and veal calves, the affiliation to all eight phylogenetic groups was performed for the 320 *E. coli* isolates that were subjected to antimicrobial susceptibility testing (Fig. 1). Two *E. coli* isolates per slaughterhouse were unassignable. A clear difference was observed between the two bovine categories. The most prevalent groups were B1 followed by group A in the adult cattle slaughterhouse; whereas group A followed by group B1 were the most prevalent in the veal calf slaughterhouse. Within each bovine category, no significant difference was observed for the proportion of resistant *E. coli* isolates among the phylogenetic groups A and B1 (Fig. 1). The same phenomenon was observed for class 1 integron carriage in veal calf *E. coli* populations (data not shown).

3.3. Characteristics of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* isolates

STEC and EPEC were further characterized in order to precise their ability to cause human diseases (Table 4). The most pathogenic strain was a STEC O157:H7 harboring *stx*_{1a}, *stx*_{2c} and *eae*- γ 1 genes. It was isolated by IMS after enrichment of a sample of thickened sludge from the adult cattle slaughterhouse. Among the 7 STEC strains, detected by PCR screening of a collection of 3182 *E. coli* isolates, the gene *stx*₁ was detected in 6 strains, with *stx*_{1d} variant in adult cattle sludge and *stx*_{1a} in veal calf wastewater and thickened sludge. One strain harboring simultaneously *stx*_{2a} and *stx*_{2d} genes was isolated from adult cattle sludge. EPEC strains were

all negative for *bfpA* gene and EPEC adherence factor (EAF), which led their classification as atypical EPEC (aEPEC) (Kaper et al., 2004). The most detected *eae* variant was *eae*- θ .

With regard to antibiotic resistance, it is noteworthy that only a few STEC and aEPEC isolated from adult cattle were resistant (3/13), and no one was considered as MDR. On the contrary, the 7 STEC and aEPEC isolated from veal calf effluents and sludge were resistant, with 6 showing a MDR phenotype and 3 being positive for *int11* gene (strains O, Q and S).

3.4. Characteristics of antibiotic-resistant and *int11*-positive *E. coli* isolates

As mentioned in Section 3.1, only a few resistant *E. coli* isolates were present in adult cattle effluents and sludges. These isolates were mainly resistant to tetracycline, ampicillin, sulfonamides and streptomycin (Fig. 2). Only 3.8% of the isolates were MDR. On the contrary, in veal calf effluents and sludges, high percentages of resistance were detected for tetracycline, ampicillin, sulfonamides, streptomycin and trimethoprim (Fig. 2). Moreover, six *E. coli* isolates were resistant to ciprofloxacin. MDR phenotype was observed for 73.1% of the isolates; and 18.8% were resistant to at least 6 of the tested antibiotics. No isolate was resistant to third generation cephalosporin. The detection of ARGs highlighted the fact that the simultaneous presence of two different resistance genes was frequently observed for tetracycline (*tet*(A) and *tet*(B)), sulfonamides (multiple combinations of *sull*, *sullII* and *sullIII* genes) and streptomycin (*strA-strB* and *aadA1*) (Table 5). With regard to integron carriage, *int11*- and *int12* -positive *E. coli* isolates were only detected in veal calf effluents and sludges. Among the 90 *int11*-positive *E. coli* isolates, 88 showed MDR; whereas only 29 showed MDR among the 70 *int11*-negative isolates. The difference in the MDR phenotype frequency between *int11*-positive and *int11*-negative isolates was significant. Among the 30 *E. coli* resistant to at least 6 antibiotics, 25 were *int11*-positive.

Characterization of variable region of class 1 and 2 integrons was conducted on 21 *int11*-positive *E. coli* isolates resistant to at least 6 of the tested antibiotics (Table 6). These *E. coli* isolates were selected based on PFGE analysis (data not shown). Moreover, the

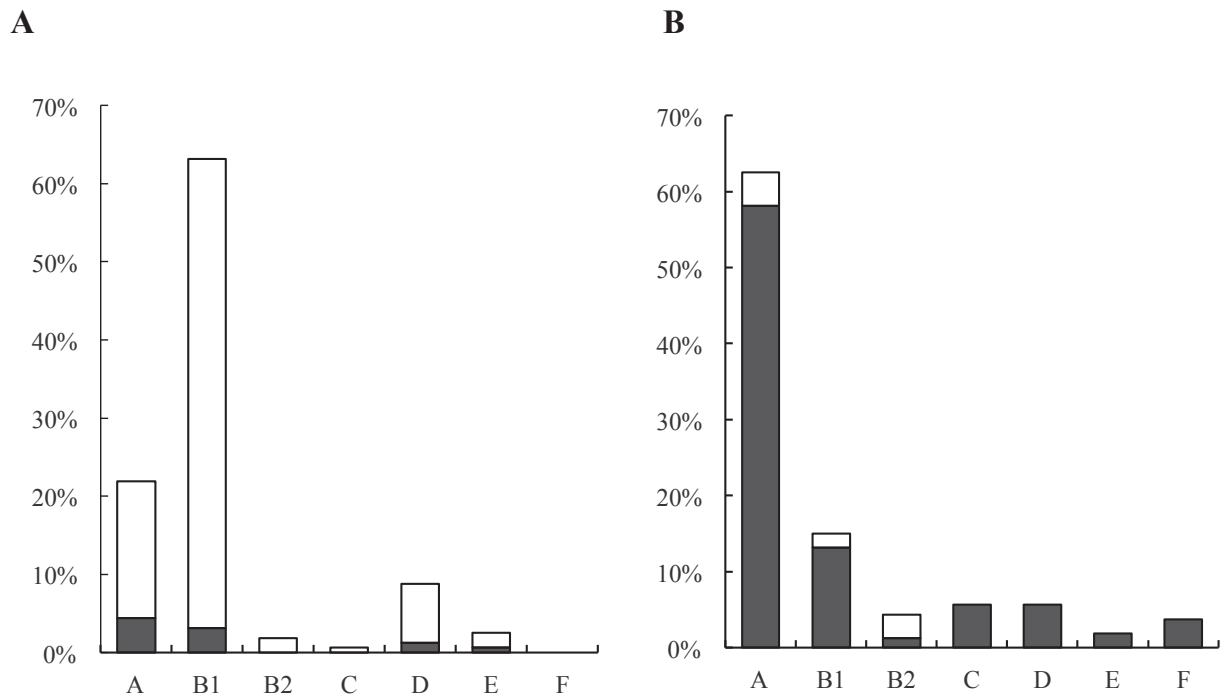


Fig. 1. Phylogenetic group distribution of 160 *E. coli* isolated from adult cattle (A) and 160 *E. coli* isolated from veal calf (B) slaughterhouse WWTPs. In each slaughterhouse, 40 *E. coli* isolates were tested per sampling point (wastewater, treated effluent, activated and thickened sludge). Two *E. coli* isolates per slaughterhouse were unassignable. Filled bars indicate the proportion of antibiotic-resistant *E. coli* isolates.

Table 4
Characteristics of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* isolated from adult cattle and veal calf slaughterhouse WWTPs.

Strain ^a	Slaughterhouse	Sampling point	Presence of ^c		Resistance phenotype ^e	Presence of <i>intI</i> gene ^c	Phylogenetic group		
			<i>eae</i> (subtype ^d)	<i>stx</i> (subtype)					
STEC O157:H7									
N	Adult cattle	Thickened sludge	+	(γ 1)	+	(<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2c})	S	–	E
STEC									
I	Adult cattle	Activated sludge	–		+	(<i>stx</i> _{1d})	S	–	B1
K	Adult cattle	Thickened sludge	–		+	(<i>stx</i> _{2a} , <i>stx</i> _{2d})	S	–	B1
L	Adult cattle	Thickened sludge	–		+	(<i>stx</i> _{1d})	GEN STR	–	B1
O	Veal calf	Wastewater	–		+	(<i>stx</i> _{1a})	AMP STR TET CHL SSS TMP	+	E
P	Veal calf	Wastewater	–		+	(<i>stx</i> _{1a})	AMP KAN STR TET SSS TMP	–	B1
T	Veal calf	Thickened sludge	–		+	(<i>stx</i> _{1a})	AMP KAN STR TET SSS	–	A
U	Veal calf	Thickened sludge	–		+	(<i>stx</i> _{1a})	GEN KAN STR	–	B1
aEPEC									
A	Adult cattle	Wastewater	+	(ND)	–		S	–	B1
B	Adult cattle	Wastewater	+	(β 1)	–		S	–	B1
C	Adult cattle	Wastewater	+	(ND)	–		S	–	B1
D	Adult cattle	Treated effluent	+	(θ)	–		S	–	B1
E	Adult cattle	Treated effluent	+	(θ)	–		AMP	–	B1
F	Adult cattle	Treated effluent	+	(θ)	–		S	–	B1
G	Adult cattle	Treated effluent	+	(θ)	–		S	–	B1
H	Adult cattle	Treated effluent	+	(θ)	–		STR	–	Unknown
J	Adult cattle	Activated sludge	+	(θ)	–		S	–	B1
M	Adult cattle	Thickened sludge	+	(θ)	–		S	–	B1
Q	Veal calf	Wastewater	+	(θ)	–		AMP STR TET CHL SSS TMP	+	A
R ^b	Veal calf	Treated effluent	+	(γ 1)	–		GEN KAN STR TMP	–	E
S	Veal calf	Thickened sludge	+	(θ)	–		AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP	+	A

^a The STEC O157:H7 was isolated by IMS after enrichment, whereas STEC and aEPEC were detected by PCR screenings of about 400 isolates per sampling point.

^b The strain R was positive for the *ihp1*_{O145} gene.

^c +, present; –, absent.

^d The presence of four following *eae* variants: β 1, γ 1, ϵ and γ 2/ θ was screened in *eae*-positive *E. coli*; ND, Not detected.

^e S, susceptible to all tested antibiotics; AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; SSS, sulfonamides; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim.

variable part of class 1 integrons was also sequenced for one STEC and two aEPEC, isolated from veal calf slaughterhouse. We did not manage to determine the gene cassette array for 5 of the isolates.

For class 1 integrons, the most frequent gene cassette array was *dfrA1-aadA1* throughout the process, followed by *dfrA17-aadA5* in activated and thickened sludges. The strain B3–28 contained a large

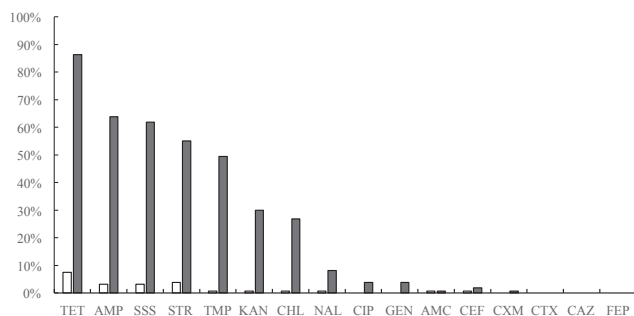


Fig. 2. Percentages of antibiotic-resistant *E. coli* isolated from adult cattle (open bars) and veal calf (filled bars) slaughterhouse WWTPs. AMP, ampicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; CEF, cephalothin; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NAL, nalidixic acid; SSS, sulfonamides; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim.

various multispecies slaughterhouse WWTPs at different sampling dates, treatment allowed a reduction of at least 99% of *E. coli* load (Bibbal et al., 2014a). Nevertheless, up to 10^2 CFU/mL *E. coli* were discharged into rivers and thickened sludge contained up to 10^5 CFU/g *E. coli*. These *E. coli* loads were similar to those of effluents and sludges of municipal WWTP (Pignato et al., 2009; Reinthaler et al., 2003).

For each sampling point, the percentage of antibiotic-resistant *E. coli* was estimated. In order to deeply investigate genetic characteristics of *E. coli* populations, we focused on one sample from which we isolated and analyzed a large number of strains. This might limit the relevance of the statistical analysis and of the generalization that can be done. However, the analyzed water samples were collected over a 24 h activity, in order to obtain a representative sample. Moreover, it must be stressed that our results regarding the level of resistance and the distribution of phylogenetic groups in *E. coli* populations, isolated from veal calf

Table 5
Frequency of ARGs in *E. coli* isolated from adult cattle and veal calf slaughterhouse WWTPs.

Antibiotic (No. of resistant isolates)	ARGs	% (No.) of <i>E. coli</i> isolates ^a
Tetracycline (150)	<i>tet(A)</i>	66.0 (99)
	<i>tet(B)</i>	9.3 (14)
	<i>tet(A) & tet(B)</i>	18.0 (27)
	n.d.	6.7 (10)
	<i>bla_{TEM}</i>	94.4 (101)
Ampicillin (107)	n.d.	5.6 (6)
	<i>sull</i>	22.1 (23)
Sulfonamides (104)	<i>sullI</i>	26.0 (27)
	<i>sullII</i>	13.5 (14)
	<i>sull & sullI</i>	19.2 (20)
	<i>sull & sullII</i>	14.4 (15)
	<i>sullI & sullII</i>	1.9 (2)
	<i>sull & sullI & sullII</i>	1.0 (1)
	n.d.	1.9 (2)
	<i>strA-strB</i>	35.1 (33)
Streptomycin (94)	<i>aadA1</i>	6.4 (6)
	<i>strA-strB & aadA1</i>	54.3 (51)
	n.d.	4.2 (4)
	<i>cmlA</i>	22.7 (10)
Chloramphenicol (44)	<i>catI</i>	72.7 (32)
	<i>catII</i>	0.0 (0)
	<i>catIII</i>	0.0 (0)
	n.d.	4.6 (2)

^a n.d. not detected.

gene cassette array: *dfrA16-bla_{PSSE1}-aadA2-cmlA*. The *eae*-positive strain S contained the infrequent cassette array *aadB-aadA1-IS*. As regards class 2 integrons, 3 genes cassettes arrays were detected: *dfrA-sat*, *estX-sat* and *estX-sat2-aadA1*. Interestingly, only a few kinds of resistance genes were carried by integrons. The ARGs that we detected were mainly located outside integrons (Table 5).

4. Discussion

The goal of our study was to investigate the involvement of bovine slaughterhouse effluents in the risk of environmental dissemination of antibiotic-resistant and pathogenic *E. coli*. We focused on two specific slaughterhouses; one processed adult cattle only and the other veal calves only. Both slaughterhouses had a dedicated WWTP using an activated sludge process.

4.1. Wastewater treatment impact on *E. coli* populations

The impact of the wastewater treatment processes was investigated on viable *E. coli* loads. As we have already observed in

slaughterhouse effluents, were the same as those reported by Haenni et al. for *E. coli* populations from feces of 491 veal calves sampled in 12 slaughterhouses during a 6-month period (Haenni et al., 2014). Finally, we observed the similar trend in both slaughterhouses. Taken together, these elements provided some indication of the reproducibility of the results. The observed trend is that the treatment process had no impact on the percentage of antibiotic-resistant and *intI1*-positive *E. coli* isolates. To our knowledge, this is the first report investigating the impact of wastewater treatment on the percentage of antibiotic-resistant *E. coli* isolates in bovine slaughterhouse WWTPs.

Our data can be compared to those of studies reporting the impact of municipal WWTP on indicator bacteria, using the same activated sludge process. The trends vary greatly with a majority of studies having found increases in the prevalence of antimicrobial resistance. Several studies stated that horizontal gene transfer and/or the selection of ARB by the antibiotics potentially present in the WWTP could explain these increases (Luczkiewicz et al., 2010; Moura et al., 2007). However, the role of these phenomena have not been fully explained yet and other mechanisms might be

Table 6
Resistance phenotype and gene cassette array of MDR *E. coli* isolated from veal calf slaughterhouse WWTP.

Strain ID ^a	Sampling point	Resistance phenotype ^d	<i>int1</i> gene	Gene cassette array ^e	Phylogenetic group
B1-8	Wastewater	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP NAL	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>dfrA-sat</i>	E
B1-11	Wastewater	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B1-13	Wastewater	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	E
B1-14	Wastewater	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	C
B1-18	Wastewater	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	F
B1-22	Wastewater	AMP KAN STR TET SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	B1
B1-39	Wastewater	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	C
O ^b	Wastewater	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	n.d.	E
Q ^c	Wastewater	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B2-3	Treated effluent	AMP TET CHL SSS TMP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B2-19	Treated effluent	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	n.d.	B1
B2-28	Treated effluent	AMP GEN KAN TET CHL SSS TMP	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>estX-sat</i>	A
B3-17	Activated sludge	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B3-19	Activated sludge	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	B1
B3-25	Activated sludge	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA17-aadA5</i>	B1
B3-28	Activated sludge	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA16-bla_{PSE1}-aadA2-cmlA1</i>	A
B3-31	Activated sludge	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B3-43	Activated sludge	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B3-46	Activated sludge	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	A
B4-20	Thickened sludge	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>estX-sat2-aadA1</i>	A
B4-37	Thickened sludge	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1 2	<i>dfrA1-aadA1</i> <i>estX-sat2-aadA1</i>	A
B4-44	Thickened sludge	AMP GEN KAN TET SSS TMP NAL	1	<i>dfrA17-aadA5</i>	Unknown
B4-53	Thickened sludge	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>	B2
S ^c	Thickened sludge	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>aadB-aadA1-IS</i>	A

^a Strain identification, B1, wastewater; B2, treated effluent; B3, activated sludge; B4, thickened sludge; O, Q and S were strains positive for *stx* or *eae* genes.

^b The strain O was positive for the *stx*_{1a} gene.

^c The strains Q and S were positive for the *eae*-0 gene.

^d AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NAL, nalidixic acid; SSS, sulfonamides; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim.

^e *aadA*, aminoglycoside adenyltransferases conferring resistance to streptomycin and spectinomycin; *aadB*, aminoglycoside adenyltransferases conferring resistance to gentamicin, kanamycin and tobramycin; *bla_{PSE1}*, β-lactamase conferring resistance to β-lactam antibiotics; *cmlA1*, chloramphenicol exporter conferring resistance to chloramphenicol; *dfrA*, dihydrofolate reductase conferring resistance to trimethoprim; *estX*, putative esterase/hydrolase; IS, Insertion Sequence; *sat*, streptothricin acetyltransferase conferring resistance to streptothricin; n.d., not detected.

involved. The preferential elimination of susceptible organisms rather than of their resistant counterparts may greatly for resistance increase (Ferreira da Silva et al., 2006; Figueira et al., 2011). Kim et al. demonstrated that the fate of ARB is affected significantly by changes in operating conditions (Kim et al., 2007). In contrast, as we observed, some studies reported that prevalences of resistant-fecal coliforms or *E. coli* were not impacted by treatment in municipal WWTP (Biswal et al., 2014; Reinthaler et al., 2003). Ferreira et al. reported a similar frequency of *int1*-positive *E. coli* isolates in raw and treated effluent, whereas they observed an increase in the level of resistance of *E. coli* isolates (Ferreira da Silva et al., 2007). Finally, only a few studies showed a decrease in the prevalence of antibiotic-resistant strains (Garcia et al., 2007; Rijal et al., 2009). The reasons for these differences are not clear and remain to be elucidated.

4.2. Dissemination of pathogenic *E. coli* strains

The most pathogenic strain was isolated from thickened sludge of adult cattle slaughterhouse by IMS after enrichment. This sludge might be spread on agricultural lands. It was an *E. coli* of serotype O157:H7 harboring *stx*_{1a}, *stx*_{2c} and *eae*-γ1 genes. This strain can be considered as highly pathogenic for humans (ANSES, 2010). Previously in France, the screening of *E. coli* belonging to serogroup O157 in effluents and biosolids of 12 multispecies slaughterhouse WWTPs led to the detection of two STEC O157:H7 in wastewater (Loukiadis et al., 2006). More recently, in Turkey, Ayaz et al. detected STEC O157:H7 in 3 out of 24 beef slaughterhouse wastewater that were discharged into river without treatment (Ayaz

et al., 2014). The detection of STEC O157:H7 in effluents discharged into rivers and sludges is a public health issue. Indeed, *E. coli* O157:H7 can survive in aquatic environments from 2 weeks to over 10 months (Chekabab et al., 2013). Moreover, survival times ranging from 70 to 266 days after land application have been reported for these strains (Franz et al., 2011). STEC O157:H7 could be then transmitted to humans via the contact with the contaminated environment or via the consumption of contaminated water, fruits or vegetables (Chekabab et al., 2013). Finally, this STEC O157:H7 was susceptible to all of the tested antibiotics. The STEC O157:H7 isolated from cattle slaughterhouse wastewater by Ayaz et al. were also mainly susceptible, except one MDR STEC O157:H7 strain (Ayaz et al., 2015).

The screening of EHEC associated genetic markers in *E. coli* collections showed that the percentage of STEC and EPEC was around 1%, which is in agreement with previous studies in multi-species slaughterhouse WWTP wastewaters (Garcia-Aljaro et al., 2004; Loukiadis et al., 2006). Among the detected strains, some harbored virulence markers that have already been shown to be associated with *E. coli* strains that cause human diseases. One aEPEC strain carried the *eae*-β1 subtype, reported in atypical and typical isolates from feces of sick humans (Nataro and Kaper, 1998; Trabulsi et al., 2002). With regard to STEC strains, the identified *stx*_{1a}, *stx*_{2a}, *stx*_{2c} and *stx*_{2d} subtypes have been shown to be linked with serious human diseases (Melton-Celsa, 2014).

4.3. Dissemination of antibiotic-resistant *E. coli* strains

In both slaughterhouses, treatment failed to eliminate

antibiotic-resistant *E. coli* strains in effluents and biosolids. Moreover, we detected significant higher percentages of antibiotic-resistant *E. coli* in veal calf effluents and biosolids compared to adult cattle ones. Besides, *int11*- and *int12*- positive isolates were only detected in veal calf effluents and biosolids. These results are in agreement with previous studies reporting a high level of resistance in *E. coli* isolated from the fecal flora of veal calves (Bosman et al., 2014; Di Labio et al., 2007). These studies also identified that, among risks factors in farm management, drug antimicrobial usage significantly increased the risk of antimicrobial resistance at farm level. In order to monitor the volumes and exposure of animals to antimicrobials, The French Agency for Food Safety (ANSES) estimates the Animal Level of Exposure to Antimicrobials (ALEA) every year. The ALEA is calculated by dividing the body weight treated by the animal mass that could potentially be treated with antimicrobials. For 2012, the ALEA was estimated to 0.32 for adult cattle and to 3.41 for veal calves (ANSES, 2013). Moreover, the ANSES also estimated that the average number of oral treatments was 4.20 per veal calf. The most administered antibiotic was tetracycline, which is in agreement with the fact that the highest level of resistance was observed for this antibiotic in effluents and biosolids.

We also showed that the level of resistance of *E. coli* isolates, regardless their genetic background, was related to their origin *i.e.* veal calves *versus* adult cattle. Firstly, it was noteworthy that all STEC and aEPEC isolated from veal calf effluents were resistant; whereas these strains were mainly susceptible when isolated from adult cattle effluents. This trend indicated that the level of antibiotic resistance seemed to be related with the origin of the strain, regardless the presence of virulence genes. Secondly, we observed that within each bovine category, antibiotic resistance and integron carriage (for veal calves) were equally distributed among the most prevalent phylogenetic groups. This phenomenon has been also observed by Haenni et al. regarding the ESBL-producing *E. coli* distribution among *E. coli* isolated from veal calf feces (Haenni et al., 2014). These finding highlighted the fact that there was no relationship between antimicrobial resistance and phylogenetic grouping.

4.4. Co-occurrence of *int11* gene and MDR phenotype

In our study, the presence of *int11* gene in *E. coli* isolates was a good indicator of a MDR phenotype, even regardless of the gene cassette content of the integron. This link between integrons and antibiotic resistance is in keeping with previous reports (Laroche et al., 2009; Leverstein-van Hall et al., 2003). Integrons alone clearly cannot explain the resistance to all the antibiotics, but integrons are usually carried by plasmids or transposons, which can also host other resistance genes. This is in agreement with our results with detection of resistance genes (*tet*, *bla_{TEM}*, *sullI*) mainly located outside the integrons. We showed that class 1 and 2 integrons contained few resistance genes, mainly *aadA* and *dfr* genes, as reported in other studies focused on *E. coli* isolated from cattle (Barlow et al., 2009; Karczmarczyk et al., 2011). Nevertheless, one *int11*-positive *E. coli* isolate contained *bla_{pSE}* and *cmlA1* genes which have already been detected in class 1 integron harbored by *E. coli* isolates (Du et al., 2005; Pallecchi et al., 2007).

5. Conclusion

- In both veal calf and adult cattle slaughterhouses, the percentages of antibiotic-resistant and *int11*-positive *E. coli* isolates were not impacted by the wastewater treatment process.
- Percentages of antibiotic-resistant and *int11*-positive *E. coli* isolates were much higher in effluents and sludges of veal calf

slaughterhouse compared to adult cattle slaughterhouse ones. About 10¹⁰ MDR *E. coli* isolates were daily discharged into the receiving river.

- The most pathogenic strain, a STEC O157:H7, isolated from thickened sludge of adult cattle slaughterhouse, could reach the environment by land application.
- These different public health risks, according to the type of slaughterhouse, should be better characterized in order to propose suitable waste management to reduce the dissemination of antibiotic-resistant and pathogenic *E. coli*.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the French National Research Agency (ANR), program “Eco-Tech”, study “Défi-Viande” (ANR-09-ECOT-00603). We thank Damien Dubois, Richard Bonnet and Frederic Robin for providing us positive control strains, and Laurent Cavalié for his assistance in PFGE analysis.

References

- Amos, G.C., Gozzard, E., Carter, C.E., Mead, A., Bowes, M.J., Hawkey, P.M., Zhang, L., Singer, A.C., Gaze, W.H., Wellington, E.M., 2015. Validated predictive modelling of the environmental resistome. *ISME J.* 9, 1467–1476.
- ANSES, 2010. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety. Opinion of the French Food Safety Agency on the Advisability of Revising the Definition of Pathogenic STEC, Specified in AFSSA's Opinion of 15 July 2008. Anses, Maisons-Alfort, France.
- ANSES, 2013. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety. Sales Survey of Veterinary Medicinal Products Containing Antimicrobials in France, 2013 (Maisons-Alfort, France).
- Ashbolt, N.J., Amezcua, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K.K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze, W.H., Heberer, T., Lawrence, J.R., Larsson, D.G., McEwen, S.A., Ryan, J.J., Schonfeld, J., Silley, P., Snape, J.R., Van den Eede, C., Topp, E., 2013. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ. Health Perspect.* 121, 993–1001.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Tache, J., Derzelle, S., 2009. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 554–559.
- Ayaz, N.D., Gencay, Y.E., Erol, I., 2014. Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7(+)/H7(-) isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. *Int. J. Food Microbiol.* 174, 31–38.
- Ayaz, N.D., Gencay, Y.E., Erol, I., 2015. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* O157 from cattle and slaughterhouse wastewater isolates. *Ann. Microbiol.* 65, 1137–1144.
- Barlow, R.S., Fegan, N., Gobijs, K.S., 2009. Integron-containing bacteria in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 107, 540–545.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1642–1645.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Prere, M.F., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009. Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2999–3006.
- Bibbal, D., Kerouedan, M., Loukiadis, E., Scheutz, F., Oswald, E., Brugere, H., 2014a. Slaughterhouse effluent discharges into rivers not responsible for environmental occurrence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 168, 451–454.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kerouedan, M., Peytavin de Garam, C., Ferre, F., Cartier, P., Gay, E., Oswald, E., Auvray, F., Brugere, H., 2014b. Intimin gene (*eae*) subtype-based real-time PCR strategy for specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in cattle feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1177–1184.
- Biswal, B.K., Mazza, A., Masson, L., Gehr, R., Frigon, D., 2014. Impact of wastewater treatment processes on antimicrobial resistance genes and their co-occurrence with virulence genes in *Escherichia coli*. *Water Res.* 50, 245–253.
- Bosman, A.B., Wagenaar, J.A., Stegeman, J.A., Vernooij, J.C., Mevius, D.J., 2014. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* in veal calves is associated with antimicrobial drug use. *Epidemiol. Infect.* 142, 1893–1904.
- Chekabab, S.M., Paquin-Veillet, J., Dozois, C.M., Harel, J., 2013. The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.* 341, 1–12.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2012. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and

- detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58–65.
- CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals-third Edition. Document M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
- CLSI, 2009a. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-tenth Edition. CLSI Document M02-a10. CLSI, Wayne, PA.
- CLSI, 2009b. Performance Standards for Antimicrobial Testing; 19th Informational Supplement. Document M100-s19. CLSI, Wayne, PA.
- da Costa, P.M., Vaz-Pires, P., Bernardo, F., 2008. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated in wastewater and sludge from poultry slaughterhouse wastewater plants. *J. Environ. Health* 70, 40–45, 51, 53.
- Di Labio, E., Regula, G., Steiner, A., Miserez, R., Thomann, A., Ledergerber, U., 2007. Antimicrobial resistance in bacteria from Swiss veal calves at slaughter. *Zoonoses Public Health* 54, 344–352.
- Du, X., Shen, Z., Wu, B., Xia, S., Shen, J., 2005. Characterization of class 1 integron-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 295–298.
- Ferreira da Silva, M., Tiago, I., Verissimo, A., Boaventura, R.A., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2006. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 322–329.
- Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2007. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 166–176.
- Figueira, V., Serra, E., Manaia, C.M., 2011. Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci. Total Environ.* 409, 1017–1023.
- Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L.H., Baljer, G., Beutin, L., Karch, H., 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2460–2463.
- Franz, E., van Hoek, A.H., Bouw, E., Aarts, H.J., 2011. Variability of *Escherichia coli* O157 strain survival in manure-amended soil in relation to strain origin, virulence profile, and carbon nutrition profile. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8088–8096.
- Garcia-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., Blanch, A.R., 2004. Prevalence of the *stx2* gene in coliform populations from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3535–3540.
- Garcia, S., Wade, B., Bauer, C., Craig, C., Nakaoka, K., Lorowitz, W., 2007. The effect of wastewater treatment on antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. *Water Environ. Res.* 79, 2387–2395.
- Gassama Sow, A., Aidara-Kane, A., Barraud, O., Gatet, M., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4, 207–212.
- Gaze, W.H., Krone, S.M., Larsson, D.G., Li, X.Z., Robinson, J.A., Simonet, P., Smalla, K., Timinouni, M., Topp, E., Wellington, E.M., Wright, G.D., Zhu, Y.G., 2013. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 19.
- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., Riley, L.W., 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1375–1377.
- Haenni, M., Chatre, P., Metayer, V., Bour, M., Signol, E., Madec, J.Y., Gay, E., 2014. Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet. Microbiol.* 171, 321–327.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 2, 123–140.
- Karczmarczyk, M., Walsh, C., Slowey, R., Leonard, N., Fanning, S., 2011. Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7121–7127.
- Kim, S., Jensen, J.N., Aga, D.S., Weber, A.S., 2007. Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge. *Chemosphere* 66, 1643–1651.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 118–130.
- Leverstein-van Hall, M.A., M Blok, H.E., T Donders, A.R., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J., 2003. Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J. Infect. Dis.* 187, 251–259.
- Loukiadis, E., Kerouredan, M., Beutin, L., Oswald, E., Brugere, H., 2006. Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3245–3251.
- Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., Olanczuk-Neyman, K., 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 44, 5089–5097.
- Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C.P., Marault, M., Scheutz, F., Brugere, H., Jamet, E., Auvray, F., 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2035–2041.
- Marti, E., Variatza, E., Balcazar, J.L., 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 22, 36–41.
- Martins da Costa, P.M., Vaz-Pires, P.M., Bernardo, F.M., 2006. Antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 1393–1403.
- Melton-Celsa, A.R., 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.* 2.
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., Correia, A., 2007. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1243–1250.
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., Correia, A., 2010. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161, 58–66.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nielsen, E.M., Andersen, M.T., 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2884–2893.
- Pallecchi, L., Lucchetti, C., Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Gamboa, H., Carattoli, A., Paradisi, F., Rossolini, G.M., 2007. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1179–1184.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757–784.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P., 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes* 18, 185–192.
- Pignato, S., Coniglio, M.A., Faro, G., Weill, F.X., Giammanco, G., 2009. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *J. Water Health* 7, 251–258.
- Pruden, A., Larsson, D.G., Amezcua, A., Collignon, P., Brandt, K.K., Graham, D.W., Lazorchak, J.M., Suzuki, S., Silley, P., Snape, J.R., Topp, E., Zhang, T., Zhu, Y.G., 2013. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* 121, 878–885.
- Reinthal, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., Marth, E., 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 37, 1685–1690.
- Rijal, G.K., Zmuda, J.T., Gore, R., Abedin, Z., Granato, T., Kollias, L., Lanyon, R., 2009. Antibiotic resistant bacteria in wastewater processed by the metropolitan water reclamation district of Greater Chicago system. *Water Sci. Technol.* 59, 2297–2304.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360.
- Sabate, M., Prats, G., Moreno, E., Balleste, E., Blanch, A.R., Andreu, A., 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res. Microbiol.* 159, 288–293.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2951–2963.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duikeren, E., Johnson, A.P., Gastra, W., 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 601–604.
- Snedeker, K.G., Shaw, D.J., Locking, M.E., Prescott, R.J., 2009. Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC Infect. Dis.* 9, 144.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.C., 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3, 119.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Tardelli Gomes, T.A., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 508–513.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Sanchez Chacon, E., Saldana, Z., Freer, E., Giron, J.A., 2009. Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *J. Food Prot.* 72, 1531–1537.

7.4.2 Communications orales

7.4.2.1 Communication n°1



« *Escherichia coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons isolées d'effluents d'abattoirs bovins »

Um Maryse Michèle, Bibbal Delphine, Kérouédan Monique, Stalder Thibault, Barraud Olivier, Casellas Magali, Gaschet Margaux, Oswald Eric, Dagot Christophe, Ploy Marie-Cécile, Brugère Hubert.

Communication effectuée lors du 10^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM).

A l'Institut Pasteur de Paris, du 31 Mars au 1^{er} Avril 2014

Résumé

Objectifs : Peu d'informations sont disponibles sur la présence de souches d'*Escherichia coli* antibiorésistantes dans les effluents d'abattoirs de bovins. L'objectif de cette étude était d'évaluer leur prévalence aux différents stades du processus épuratoire des effluents, afin d'en apprécier l'impact. La présence d'intégrons a également été recherchée, afin de préciser leur lien avec la résistance aux antibiotiques.

Matériel et méthodes : Les effluents de station d'épuration d'un abattoir de bovins adultes et d'un abattoir de veaux ont été prélevés à quatre étapes : eaux usées, eaux traitées, boues circulantes et boues destinées à être épandues. Le dénombrement des souches d'*E. coli* a été réalisé. La résistance à 16 antibiotiques a été recherchée par la méthode de diffusion en milieu gélosé pour 40 souches d'*E. coli* par point de prélèvement. La présence d'intégrons de classe 1, 2 et 3 a été recherchée par PCR en temps réel, sur ces mêmes souches.

Résultats : Dans chacun des 2 abattoirs, le traitement épuratoire a permis de réduire de 3 Log la charge en *E. coli* pour les effluents liquides avec un rejet dans la rivière supérieur à 10² UFC/mL; 10⁵ UFC/mL étaient présentes dans les boues destinées à être épandues. Le pourcentage d'*E. coli* résistantes à au moins un des antibiotiques testés était significativement plus élevé dans les prélèvements d'abattoir de veaux (90,6%) que dans les prélèvements d'abattoir de bovins adultes (10,0%) ($p < 0,05$). Le niveau de résistance le plus élevé a été observé pour la tétracycline. Dans les prélèvements de l'abattoir de veaux, 45,0% des souches étaient résistantes à plus de 5 antibiotiques. Ces résultats sont en adéquation avec ceux

concernant les intégrons : 57,5% des *E. coli* de l'abattoir de veaux hébergeaient un intégron de classe 1, *versus* 0,0% pour ceux issus de l'abattoir de bovins adultes. Par ailleurs, un intégron de classe 2 a été identifié dans 15 souches isolées de l'abattoir de veaux; et aucun intégron de classe 3 n'a été détecté. Les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de classe 1 n'étaient pas significativement différents en fonction des points de prélèvement.

Conclusions : Cette étude a montré que les effluents et boues de station d'épuration d'abattoirs de bovins étaient contaminés par des *E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons, rejetées dans l'environnement. Ces pourcentages étaient plus élevés dans les effluents de l'abattoir de veaux. Le traitement épuratoire n'a pas eu d'impact sur ces pourcentages.

7.4.2.2 Communication n°2



« *Escherichia coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons isolées d'effluents d'abattoirs bovins »

Um Maryse Michèle, Bibbal Delphine, Kérourédan Monique, Stalder Thibault, Barraud Olivier, Casellas Magali, Gaschet Margaux, Oswald Eric, Dagot Christophe, Ploy Marie-Cécile, Brugère Hubert.

Communication effectuée lors du 6^{ème} Colloque International Francophone de Microbiologie Animale (CIFMA).

A l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) du 15 au 16 Mai 2014

Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence de souches d'*Escherichia coli* antibiorésistantes aux différents stades du processus épuratoire des effluents d'abattoirs de bovins, afin d'en apprécier l'impact. La présence d'intégrons a également été recherchée, afin de préciser leur lien avec la résistance aux antibiotiques.

Les effluents de station d'épuration d'un abattoir de bovins adultes et d'un abattoir de veaux ont été prélevés à quatre étapes : eaux usées, eaux traitées, boues circulantes et boues destinées à être épandues. La résistance à 16 antibiotiques a été recherchée par la méthode de diffusion en milieu gélosé pour 40 souches d'*E. coli* par point de prélèvement. La présence d'intégrons de classe 1, 2 et 3 a également été recherchée par PCR en temps réel, sur ces mêmes souches.

Dans chacun des 2 abattoirs, le traitement épuratoire a permis de réduire de 3 Log la charge en *E. coli* pour les effluents liquides avec un rejet dans la rivière supérieur à 10^2 UFC/mL; 10^5 UFC/mL étaient présentes dans les boues destinées à être épandues. Le pourcentage d'*E. coli* résistantes à au moins un des antibiotiques testés était significativement plus élevé dans les prélèvements d'abattoir de veaux (90,6%) que dans les prélèvements d'abattoir de bovins adultes (10,0%) ($p < 0,05$). Ces résultats sont en adéquation avec ceux concernant les intégrons : 57,5% des *E. coli* de l'abattoir de veaux hébergeaient un intégron de classe 1, *versus* 0,0% pour ceux issus de l'abattoir de bovins adultes. Les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de classe 1 n'étaient pas significativement différents en fonction des points de prélèvement.

En conclusion, cette étude a montré que les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons étaient plus élevés dans les effluents de l'abattoir de veaux. Le traitement épuratoire n'a pas eu d'impact sur ces pourcentages.

7.4.2.3 Communication n°3



« Antimicrobial resistance and carriage of integrons in *Escherichia coli* strains isolated in wastewater of cattle slaughterhouses in France »

Um Maryse Michèle, Bibbal Delphine, Kérourédan Monique, Oswald Eric, Brugère Hubert.
Communication effectuée lors du 6th International Water and Health seminar for PhD Students.
A Cannes du 16 au 18 Juin 2014



PRICE OF SCIENTIFIC COMMITTEE AS BRINGING THE BEST
CONTRIBUTION TO THE ADVANCEMENT OF WATER SAFETY.



(Prix SUEZ pour la meilleure contribution à l'avancée de la sécurité de l'eau)

Résumé

Objectives: Cattle are a reservoir of antibiotic resistant *E. coli* strains. However, little information is available concerning the prevalence of these resistant strains in slaughterhouse sewage. Resistant integrons (RIs) are genetic elements that acquire exchange and express antibiotic resistance genes. The aim of this study was to evaluate the prevalence of antibiotic resistant *E. coli* in bovine slaughterhouse effluents.

Material and Methods: Effluents of two French slaughterhouses were sampled: plant A, which only slaughtered adult cattle, and plant B which only slaughtered calves. Four types of samples have been taken: wastewater, treated effluent, circulating sludge and sludge. Bacterial counts were performed. The susceptibility of forty *E. coli* isolates per sampling point was investigated by disc diffusion method testing 16 antibiotics. The detection of class 1, 2, 3 has been performed by Real Time PCR on these strains.

Results: The treatment in the WWTP eliminated about 99% of the *E. coli* load in the inlet effluents. However, up to 10² CFU/mL *E. coli* were released into the river, and up to 10⁵ CFU/mL *E. coli* were present in sludge before land application. The percentage of *E. coli* resistant to at least one of the antibiotics tested was significantly higher in plant B samples (90.6%) than in plant A (10.0%) (p<0.05). The highest level of resistance was observed for tetracycline. In samples of plant B, 45.0% were resistant to more than five antibiotics. These results are consistent with those for integron-carriage: 57.5% of *E. coli* strains isolated from plant B harbored a class 1 integron, versus 0.0% for those from the plant B. In addition, a class

2 integron was identified in 15 strains isolated from the plant B and no class 3 integron was detected. Percentages of resistant *E. coli* and class 1 integron-carrying *E. coli* were not significantly different according to the sampling points.

Conclusions: This study shows that after treatment, effluent released in the environment still contained antibiotic resistant *E. coli* and class 1 RIs. The percentage of resistant and integron-carrying *E. coli* was significantly higher in calves slaughterhouse effluents. Finally, Wastewater treatment had no selective effect on percentages of resistant and integron-carrying *E. coli* isolated in effluents from both slaughterhouses.

Perspectives Liquid effluents are discharged into the natural environment and sludges spread on fields. Given the significant difference observed in level of antibiotic resistance between adult cattle and calves samples, it would be interesting to investigate the susceptibility to antibiotics and the role of mobile genetic elements in *E. coli* strains isolated from: wastewater of other animal species slaughterhouses (pig, small ruminants, etc.), also in cattle manure. Moreover, this study highlighted that the treatment had no impact on prevalence of resistant and integron-carrying *E. coli* isolates, it would be interesting as well to assess the impact of other wastewater treatment such as digester which consists on anaerobic treatment.

7.4.3 Poster n°1



“Antimicrobial resistance and carriage of integrons in *Escherichia coli* strains isolated from wastewater of cattle slaughterhouses in France”

Maryse Michèle Um, Delphine Bibbal, Monique Kérourédan, Thibault Stalder, Olivier Barraud, Magalie Casellas, Margaux Gaschet, , Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, Hubert Brugère.

Poster présenté lors du congrès « 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE) » à Ghent (Belgique) du 30 Juin au 3 Juillet 2013.

Antimicrobial resistance and carriage of integrons in *Escherichia coli* strains isolated in wastewater of cattle slaughterhouses in France

Um Maryse Michèle¹, Bibbal Delphine¹, Kérouédan Monique¹, Stalder Thibault², Barraud Olivier³, Casellas Magalie², Gaschet Marion³, Oswald Eric⁴, Dagot Christophe², Marie-Cecile Ploy³, Brugère Hubert¹



¹INSERM UMR1043, INRA USC1360, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France
²Université de Limoges, EA4330 GRESE, Limoges, France
³INSERM UMR 1092, Université de Limoges, Limoges, France
⁴INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France



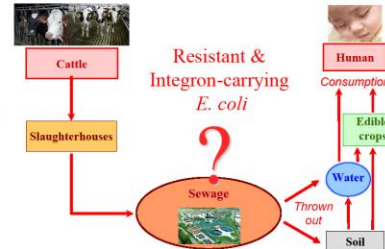
Introduction and Objectives

Cattle is a reservoir of antibiotic resistant *E. coli* strains. However little information is available concerning the presence of these resistant strains in cattle slaughterhouse effluents, which could be transmitted to humans via the consumption of water and vegetables.

Moreover, wastewater treatment plants (WWTP) are considered to be hot-spots for antibiotic resistance dissemination by horizontal transfer. Resistant integrons (RI) are genetic elements that acquire, exchange and express antibiotic resistance genes. The link between class 1 integron (RI1) carriage and phenotype of resistance is not yet clear.

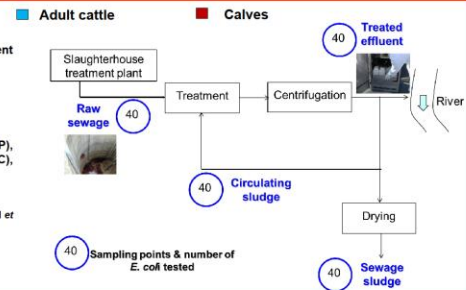
Objectives:

- To evaluate the impact of wastewater treatment on percentages of resistant and integron-carrying *E. coli* isolates.
- To clarify the link between integron carriage and multidrug resistance.



Material and Methods

- Sampling points: Wastewater of 2 slaughterhouses (adult cattle, calves) at 4 steps of sewage treatment (raw sewage, treated effluent, circulating sludge, sewage sludge).
- 320 *E. coli* isolates, DNA extraction with NaOH 0,5M.
- Total DNA extraction using PowerWater™ DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc).
- Antimicrobial susceptibility test: disk diffusion method (CLSI guidelines).
- 16 antibiotics tested: Tetracyclin (TET), Ampicillin (AMP), Streptomycin (STR), Sulfonamid (SUL), Trimethoprim (TMP), Kanamycin (KMN), Chloramphenicol (CHL), Gentamicin (GMN), Nalidixic acid (NAL), Amoxicillin-clavulanic acid (AMC), Ciprofloxacin (CIP), Cephalothin (CEF), Cefuroxime (CXM), Cefotaxim (CTX), Ceftazidime (CAZ), Cefepim (FEP).
- Multidrug resistance (MDR): resistance to 3 or more antibiotic classes (Schwarz et al., 2010, JAC, 65, 801-804).
- Screening of integrase genes in *E. coli* isolates (Triplex real time PCR targeting *int1*, *int2* and *int3* genes) (Barraud et al., 2010, JAC, 2010, 65, 1642-1645).
- Quantification of *int1* gene and 16S RNA-encoding gene in total DNA (qPCR).
- Statistical analysis: Pearson's chi-square test, chi square test.



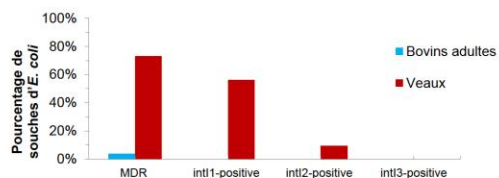
Results

Table 1: Enumeration of *E. coli*

Slaughterhouse plant	Enumeration of <i>E. coli</i> (CFU/ml)			
	Raw sewage	Treated effluent	Circulating sludge	Sewage sludge
Adult cattle	8,5. 10 ⁵	6,5. 10 ²	2,0. 10 ³	0,4. 10 ⁵
Calves	1,3. 10 ⁵	0,9. 10 ²	5,5. 10 ³	2,5. 10 ⁵

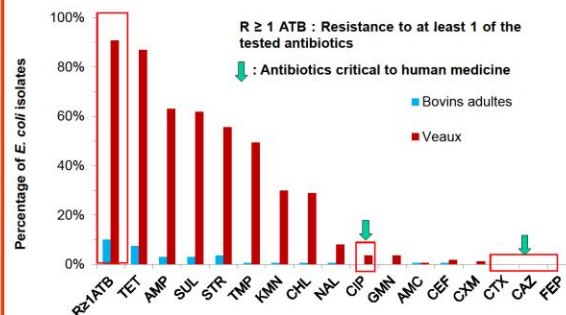
- The treatment in the WWTP eliminated about 3 Log of the *E. coli* load in the inlet effluents.
- However, up to 10² CFU/mL *E. coli* were released into the river, and up to 10⁵ CFU/mL *E. coli* were present in sludge before land application.

Graph 3: Percentages of multidrug resistant *E. coli* (MDR) and *int1*-positive *E. coli* (*int1*, *int2*, *int3*) isolates per slaughterhouse.



- The percentage of MDR and *int1*-positive *E. coli* was significantly higher in calves effluents and sludges compared to adult cattle effluents and sludges.
- No *int3* gene was detected in effluents coming from both slaughterhouses.

Graph 2: Percentage of *E. coli* resistant per antibiotic



- The percentage of resistant isolates to at least one antibiotic was higher in calves effluents compared to adult cattle effluents.
- More than 45% of *E. coli* strains were resistant to at least five antibiotics in effluents from calves slaughterhouse.

Table 4: Percentage of multidrug resistant *E. coli* (MDR), percentage of *int1*-positive *E. coli* (%*int1*) and quantification of *int1* gene from total DNA (RA: relative abundance of *int1* genes)

$$RA = \frac{[int1 \text{ copies.L}^{-1}]}{[16S \text{ RNA copies.L}^{-1}]}$$

Sampling points	Percentages of MDR, <i>int1</i> -positive <i>E. coli</i> strains and quantification of <i>int1</i> gene from total DNA					
	Adult cattle			Calves		
	MDR	% <i>int1</i>	RA	MDR	% <i>int1</i>	RA
Raw sewage	2,5%	0%	0,081	80,0%	57,5%	0,040
Treated effluent	5,0%	0%	0,016	77,5%	65,0%	0,018
Circulating sludge	2,5%	0%	No data	72,5%	50,0%	No data
Sewage sludge	5,0%	0%	No data	62,5%	52,5%	No data

- No significant difference was observed in the percentages of multidrug resistant and *int1*-carrying *E. coli* strains between the sampling points.
- No *int1*-positive *E. coli* strain was detected in adult cattle effluents, whereas *int1* genes were detected from total DNA.

Conclusion

- Cattle slaughterhouse wastewater was contaminated by antibiotic resistant *E. coli* isolates which were released into the environment.
- The percentage of resistant and integron-carrying *E. coli* was higher in calves slaughterhouse effluents.
- Wastewater treatment had no selective effect on percentages of resistant and integron-carrying *E. coli* isolated in effluents of both slaughterhouses.

7.4.4 Poster n°2

FOOD MICRO 2014 “Prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* and quantification of integrons in bovine wastewater slaughterhouse effluents”

Maryse Michèle Um, Delphine Bibbal, Monique Kérouédan, Thibault Stalder, Olivier Barraud, Magalie Casellas, Margaux Gaschet, , Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, **Hubert Brugère**.

Présenté lors du congrès « 24th International Committee on Food Microbiology and Hygiene conference (Food Micro) » à Nantes du 1 au 4 Septembre 2014.

Prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* and quantification of integrons in bovine wastewater slaughterhouse effluents.

UM Maryse Michèle¹, BIBBAL Delphine¹, KEROUEDAN Monique¹, STALDER Thibault², BARRAUD Olivier³, CASELLAS Magalie², GASCHET Magaux³, OSWALD Eric⁴, DAGOT Christophe², PLOY Marie-Cécile³, BRUGERE Hubert¹

¹INSERM UMR1043, INRA USC1360, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France
²Université de Limoges, EA4330 GRESE, Limoges, France
³INSERM UMR 1092, Université de Limoges, Limoges, France
⁴INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France



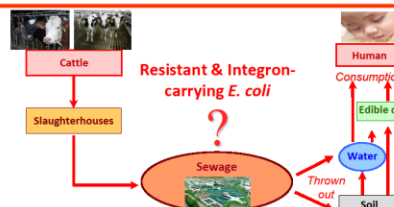
Introduction and Objectives

Cattle is a reservoir of antibiotic resistant *E. coli* strains. However, little information is available concerning the presence of these resistant strains in cattle slaughterhouse effluents, which could be transmitted to humans via the consumption of water and vegetables.

Moreover, wastewater treatment plants (WWTP) are considered to be hot-spots for antibiotic resistance dissemination by horizontal transfer. Resistant integrons (RI) are genetic elements that acquire, exchange and express antibiotic resistance genes. The link between class 1 integron (RI1) carriage and phenotype of resistance is not yet clear.

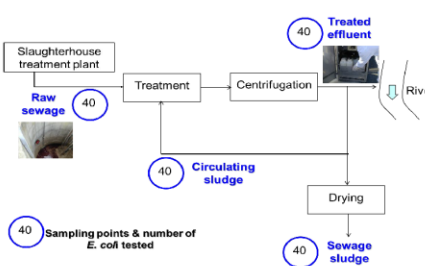
Objectives:

- > To evaluate the impact of wastewater treatment on percentages of resistant and integron-carrying *E. coli* isolates.
- > To clarify the link between integron carriage and multidrug resistance.



Material and Methods

- Sampling points: Wastewater of 2 slaughterhouses (adult cattle, calves) at 4 steps of sewage treatment (raw sewage, treated effluent, circulating sludge, sewage sludge)
- 320 *E. coli* isolates, DNA extraction with NaOH 0,5M
- Total DNA extraction using PowerWater™ DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc)
- Phylo-group assignment by PCR quadruplex and simplex according to the new *E. coli* phylotyping method (Clermont et al., 2013. Environ Microbiol Rep, 5, 58-65)
- Antimicrobial susceptibility test: disk diffusion method (CLSI guidelines)
- 16 antibiotics tested: Tetracyclin (TET), Ampicillin (AMP), Streptomycin (STR), Sulfonamid (SUL), Trimethoprim (TMP), Kanamycin (KMN), Chloramphenicol (CHL), Gentamicin (GMN), Nalidixic acid (NAL), Amoxicillin-clavulanic acid (AMC), Ciprofloxacin (CIP), Cephalothin (CEF), Cefuroxime (CXM), Cefotaxim (CTX), Ceftazidime (CAZ), Cefepim (FEP)
- Multidrug resistance (MDR): resistance to 3 or more antibiotic classes (Schwarz et al., 2010. JAC, 65, 601-604)
- Screening of integrase genes in *E. coli* isolates (Triplex real time PCR targeting *int1*, *int2* and *int3* genes) (Barnaud et al., 2010. JAC, 65, 1642-1645)
- Quantification of *int1* gene and 16S RNA-encoding gene in total DNA (qPCR)
- Statistical analysis: Pearson's chi-square test, chi square test



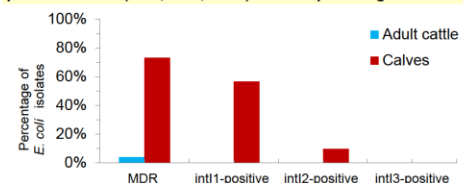
Results

Table 1: Enumeration of *E. coli*

Slaughterhouse plant	Enumeration of <i>E. coli</i> (CFU/ml)			
	Raw sewage	Treated effluent	Circulating sludge	Sewage sludge
Adult cattle	8.5. 10 ⁵	6.5. 10 ²	2.0. 10 ³	0.4. 10 ⁵
Calves	1.3. 10 ⁶	0.9. 10 ²	5.5. 10 ³	2.5. 10 ⁵

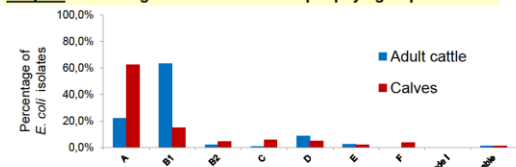
- The treatment in the WWTP eliminated about 3 Log of the *E. coli* load in the inlet effluents.
- However, up to 10² CFU/mL *E. coli* were released into the river, and up to 10⁵ CFU/mL *E. coli* were present in sludge before land application.

Graph 2: Percentages of multidrug resistant *E. coli* (MDR) and *int1*-positive *E. coli* (*int1*, *int2*, *int3*) isolates per slaughterhouse



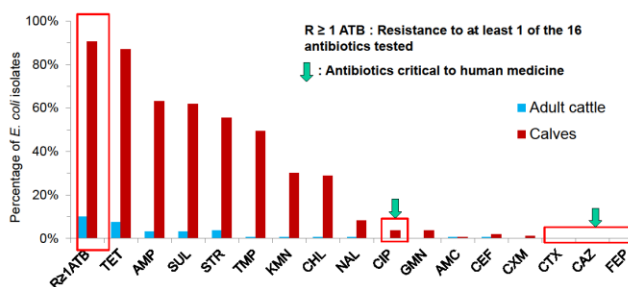
- The percentage of MDR and *int1*-positive *E. coli* was significantly higher in calves effluents and sludges compared to adult cattle effluents and sludges.
- No *int3* gene was detected in effluents from both slaughterhouses.

Graph 3: Percentages of *E. coli* isolates per phylogroup



- 62,5% of *E. coli* isolated from calve slaughterhouse effluents (vs 21,9% in adult cattle) belonged to phylogroup A whereas 63,1% of adult cattle slaughterhouse *E. coli* isolates belonged to phylogroup B1 (vs 15,0% in calves).

Graph 1: Percentages of *E. coli* isolates resistant per antibiotic



- The total percentage of resistant isolates to at least one antibiotic was higher in calves effluents compared to adult cattle effluents.
- More than 45% of *E. coli* isolates were resistant to at least five antibiotics in effluents from calves slaughterhouse.

Table 2: Percentage of multidrug resistant *E. coli* (MDR), percentage of *int1*-positive *E. coli* (%*int1*) and quantification of *int1* gene from total DNA (RA: relative abundance of *int1* genes)

$$RA = \frac{[int1 \text{ copies.L}^{-1}]}{[16S \text{ RNA copies.L}^{-1}]}$$

Sampling points	Percentages of MDR <i>E. coli</i> isolates, <i>int1</i> -positive <i>E. coli</i> isolates and quantification of <i>int1</i> gene from total DNA			
	Adult cattle		Calves	
	MDR	% <i>int1</i>	MDR	% <i>int1</i>
Raw sewage	2,5%	0%	80%	57,5%
Treated effluent	5%	0%	77,5%	65%
Circulating sludge	2,5%	0%	72,5%	50%
Sewage sludge	5%	0%	62,5%	52,5%

- No significant difference was observed in the percentages of multidrug resistant and *int1*-positive *E. coli* isolates between the sampling points.
- No *int1*-positive *E. coli* isolate was detected in adult cattle effluents, whereas *int1* genes were detected from total DNA.

Conclusions

- Cattle slaughterhouse wastewater was contaminated by antibiotic resistant *E. coli* isolates which were released into the environment.
- Most of *E. coli* isolated from calve slaughterhouse wastewater treatment plant belonged to phylogroup A while those isolated from adult cattle belonged to phylogroup B1.
- The percentage of resistant and integron-carrying *E. coli* was higher in calves slaughterhouse effluents.
- Wastewater treatment had no selective effect on percentages of resistant and integron-carrying *E. coli* isolated in effluents from both slaughterhouses.

Contact: h.brugere @envt.fr

7.4.5 Poster n°3

3rd International symposium on the environmental
dimension of antibiotic resistance
17 May - 21 May 2015 Wernigerode/Germany



“Antimicrobial resistance and integron carriage in *Escherichia coli* strains isolated from cattle slaughterhouse effluents”

Maryse Michèle Um, Olivier Barraud, Monique Kérouédan, Margaux Gaschet, Thibault Stalder, Eric Oswald, Christophe Dagot, Marie-Cecile Ploy, Hubert Brugère, Delphine Bibbal.
Poster présenté lors du congrès « 3rd International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance (EDAR 3) » à Wernigerode (Allemagne) du 17 au 21 Mai 2015.



Bourse de la fédération des sociétés européennes de Microbiologie (FEMS)
obtenue le 10 Avril 2015 pour présenter mes travaux de recherche à l'EDAR 3.

Antimicrobial resistance and integron carriage in *Escherichia coli* strains isolated from cattle slaughterhouse effluents

UM Marvse Michèle¹, BARRAUD Olivier², KEROUREDAN Monique¹, GASCHET Margaux², STALDER Thibault³, OSWALD Eric⁴, DAGOT Christophe³, PLOY Marie-Cecile², BRUGERE Hubert¹, BIBBAL Delphine¹

¹INSERM UMR1043, INRA USC1360, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France; ²INSERM UMR 1092, Université de Limoges, Limoges, France; ³Université de Limoges, EA4330 GRESE, Limoges, France; ⁴INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France

Introduction and Objectives

Cattle is a reservoir of antibiotic resistant *E. coli* strains. However, little information is available concerning the prevalences of resistant and integron-bearing *E. coli* strains in slaughterhouse effluents.

Objectives:

- Assessment of the risk of antibiotic resistant *E. coli* dissemination by an adult cattle and a veal calf slaughterhouse.
- Evaluation of the impact of slaughterhouse wastewater treatment on percentages of resistant and integron-bearing *E. coli* isolates.

Materials and Methods

- Two Slaughterhouse Wastewater Treatment Plants (SWWTPs): adult cattle and veal calf, 4 steps of sewage treatment → 320 *E. coli* isolates
- Antimicrobial susceptibility to 16 antibiotics tested by disk diffusion method (CLSI guidelines): Tetracycline (TET), Ampicillin (AMP), Streptomycin (STR), Sulfonamides (SUL), Trimethoprim (TMP), Kanamycin (KAN), Chloramphenicol (CHL), Gentamicin (GEN), Nalidixic acid (NAL), Amoxicillin-clavulanic acid (AMC), Ciprofloxacin (CIP), Cephalothin (CEF), Cefuroxime (CFM), Cefotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (FEP)
- Screening of *int1*, *int2* and *int3* genes (Barraud et al., 2010, JAC)
- Phylogroup assignment (Clermont et al., 2012, Environ Microbiol Rep)
- Characterization of variable region of integrons (Gassama Sow et al., 2010, J Infect Dev Ctries)
- Statistical analysis: Chi-squared and Fischer's exact test

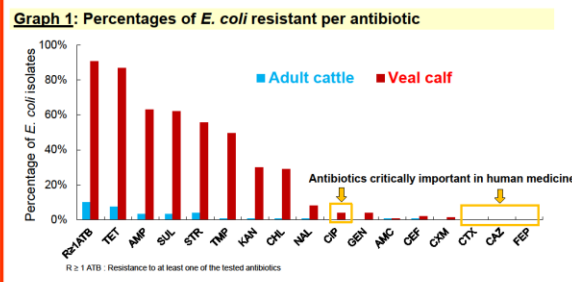
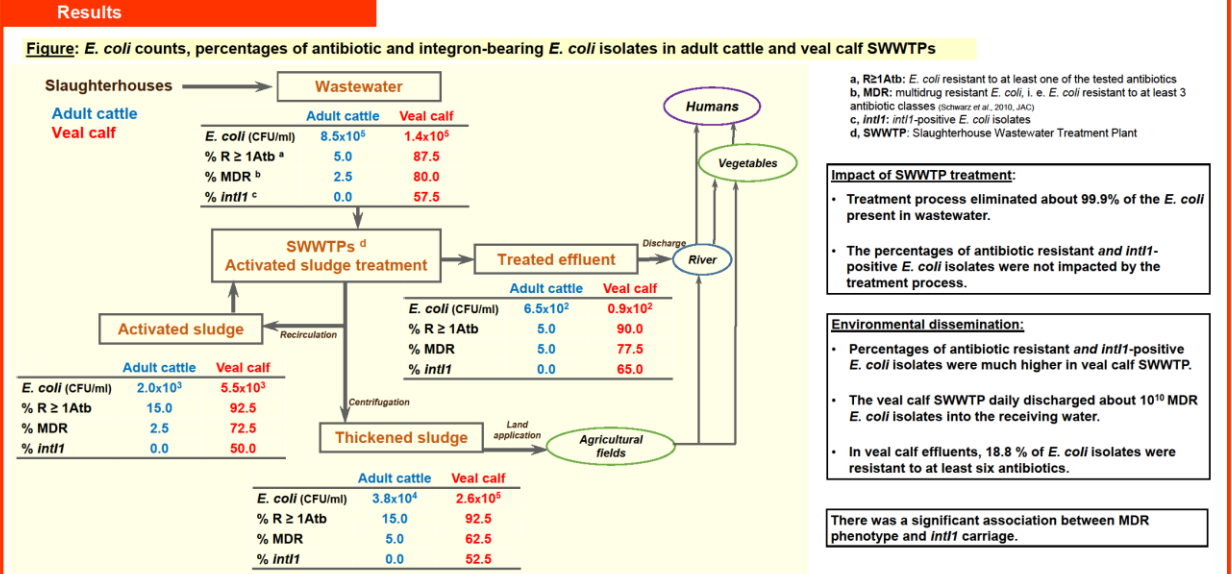
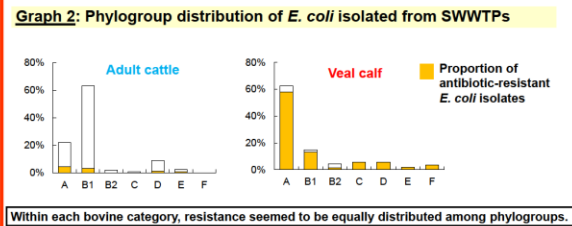


Table: Resistance phenotype and gene cassette array of MDR *E. coli* isolated from veal calf SWWTP^a

Strain	Sampling point ^b	Resistance phenotype	<i>int1</i> gene	Gene cassette array
B1-8	WW	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i> ^c
			2	<i>dfrA-sat</i>
B1-11	WW	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B1-22	WW	AMP KAN STR TET SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B1-39	WW	AMP KAN STR TET SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B2-3	TE	AMP TET CHL SSS TMP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B2-28	TE	AMP GEN KAN TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
			2	<i>estX-sat</i>
B3-17	AS	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B3-19	AS	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B3-25	AS	AMP GEN KAN STR TET CHL SSS TMP CIP NAL	1	<i>dfrA17-aadA5</i>
B3-28	AS	AMP STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA16-blb_{PESE1}-aadA2-cmlA1</i>
B3-31	AS	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B3-43	AS	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B3-46	AS	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
B4-20	TS	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
			2	<i>estX-sat2-aadA1</i>
B4-37	TS	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>
			2	<i>estX-sat2-aadA1</i>
B4-44	TS	AMP GEN KAN TET SSS TMP NAL	1	<i>dfrA17-aadA5</i>
B4-53	TS	AMP KAN STR TET CHL SSS TMP	1	<i>dfrA1-aadA1</i>

^a The gene cassette arrays were determined for *E. coli* isolates resistant to at least 6 of the tested antibiotics.
^b WW = wastewater, TE = treated effluent, AS = activated sludge, TS = thickened sludge
^c most frequent gene cassette array



Conclusions

- SWWTP treatment had no selective effect on the percentages of resistant and integron-bearing *E. coli* isolates.
- The percentages of MDR and integron-bearing *E. coli* isolates were much higher in veal calf SWWTP compared to adult cattle SWWTP.

Contact: d.bibbal@envt.fr

Chapitre 8. ETUDE 2. Etude comparative des profils d'antibiorésistance de souches d'*E. coli* productrices de shigatoxines et entéropathogènes de sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, et O145:H28 *versus* des *E. coli* ne possédant pas les caractéristiques des EHEC du top 5 (non-STECC et aEPEC du top 5) isolées de fèces de bovins adultes.

Les travaux présentés dans ce chapitre correspondent à la 2^{ème} partie de mon travail de thèse qui s'est focalisée sur l'évaluation de la résistance de souches STECC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes. Notamment, nous voulions comparer les profils de résistance de souches STECC du top 5 (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, et O145:H28) *versus* des *E. coli* ne possédant pas les caractéristiques des EHEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes prélevés dans 6 abattoirs français. Une précédente étude dans ces 6 abattoirs avait permis d'isoler des souches STECC mais aussi des aEPEC positives pour le gène *eae*, appartenant aux 5 sérotypes majeurs, mais négatives pour le gène *stx*.

Cette 2^{ème} partie du travail de thèse nous a permis d'évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques chez les STECC et aEPEC du top 5 précédemment isolées. Elle nous a ensuite permis d'évaluer les différences de résistance entre les STECC et aEPEC du top 5 *versus* les *E. coli* non-STECC et aEPEC du top 5 isolées de la flore fécale des mêmes bovins. Et enfin, d'étudier s'il existe un lien entre la virulence et la résistance, en vérifiant chez les STECC du top 5 résistantes, l'hypothèse de la localisation des gènes de résistance aux antibiotiques sur le plasmide de virulence des EHEC.

8.1 MATERIELS ET METHODES

8.1.1 Collections de STECC et aEPEC du top 5 et *E. coli* ne possédant pas les caractéristiques des STECC et aEPEC du top 5 (non-STECC et aEPEC du top 5)

Une étude précédente conduite dans des abattoirs français avait permis l'isolement de 39 STECC du top 5 et 80 souches aEPEC dans des fèces de bovins adultes (Bibbal et al., 2014b; Bibbal et al., 2015).

Ces souches avaient été isolées par IMS après enrichissement. Les caractéristiques de ces souches sont données dans le tableau 12. Les 119 souches ont été isolées à partir de 109 échantillons de fèces, certains bovins portant plus d'une souche appartenant au top 5. Pour

chaque bovin porteur, au moins une souche dominante parmi les *E. coli* a été isolée. A cette fin, pour chaque bovin porteur, un échantillon de fèces n'avait pas été soumis à l'enrichissement et stocké à -80°C lors de la précédente étude.

Ces échantillons ont été dilués au 10^{ème} et étalés sur des géloses RAPID'*E. coli* 2 agar (Bio-Rad®, Marnes-La-Coquette, France). Les gélosesensemencées ont ensuite été incubées 18-24h à 42°C. Après incubation, pour chaque échantillon de fèces, environ 8 colonies bien isolées ont été prélevées aléatoirement dans la flore fécale. A partir de ces colonies, des suspensions bactériennes en bouillon LB ont été obtenues sur microplaques 96 puits après incubation de 24h à 37°C. La confirmation de l'espèce *E. coli* a été réalisée grâce au test de production d'indole. Enfin, les isolats confirmés d'*E. coli* ont été stockés à -80°C après addition de 30% de glycérol. Pour chaque bovin, une souche d'*E. coli* a été analysée pour la recherche des marqueurs génétiques de virulence associés aux STEC du top 5 *stx*₁, *stx*₂, *eae*, et *ehxA* suivant ce qui avait été précédemment publié (Paton and Paton, 1998a).

Pour les *E. coli* positives pour les gènes *stx* et *eae*, la présence des 5 sérotypes majeurs a été recherchée (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O111:H8 et O103:H2) par PCR en temps réel (Perelle et al., 2004; Madic et al., 2011). La recherche des sous-types des gènes *stx*₁ et *stx*₂ a été effectuée comme il a été décrit précédemment par Scheutz *et al.* (Scheutz et al., 2012), et les sous-types γ , β , ϵ , et θ du gène *eae* ont été recherchés par PCR en temps-réel (Madic et al., 2011).

Tableau 12. Nombre des STEC et aEPEC étudiées par sérotype

Sérotype	Nombre de STEC testées (n=39)	Nombre d'aEPEC testées (n=80)
O157:H7 (n=27)	19	8
O26:H11 (n=51)	6	45
O103:H2 (n=27)	8	19
O145:H28 (n=12)	4	8
O111:H8 (n=2)	2	0

8.1.2 Détection et caractérisation des isolats d'*E. coli* antibiorésistantes et des gènes d'antibiorésistance

La résistance phénotypique a été recherchée pour les souches STEC du top 5, les aEPEC, et les autres *E. coli* par la méthode de diffusion en milieu gélosé ou antibiogramme selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie (SFM) et le European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (CA-SFM/EUCAST, 2014). Les 16 disques antibiotiques (Bio-Rad®, Marnes-La-Coquette, France) utilisés dans cette étude étaient : la tétracycline (TET), l'ampicilline (AMP), la streptomycine (STR), les sulfamides (SSS), la triméthoprim (TMP), le chloramphénicol (CHL), la gentamicine (GEN), l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC), l'acide nalidixique (NAL), la ciprofloxacine (CIP), la céfalexine (LEX), le céfuroxime (CXM), la céfotaxime (CTX), la ceftazidime (CAZ), le céfépime (FEP) et l'ertapénème (ETP). La souche de référence sensible aux antibiotiques testés était *E. coli* ATCC 25922.

Les souches d'*E. coli* ont été considérées comme multirésistantes lorsqu'elles étaient résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques (Schwarz et al., 2010). La distinction de classes d'antibiotiques est faite pour certaines familles lorsque les mécanismes de résistances diffèrent par classes d'antibiotiques au sein d'une même famille; c'est le cas de la famille des β -lactamines (3 classes : pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes), les aminoglycosides (3 classes: streptomycine, kanamycine et gentamicine) et les quinolones (2 classes : ciprofloxacine (fluoroquinolone) et acide nalidixique).

Pour les isolats d'*E. coli* résistants à l'ampicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la streptomycine, la tétracycline, les sulfamides, le chloramphénicol et/ou le florfénicol, les principaux gènes de résistance *bla*_{TEM}, (*strA-strB*, *aadA1*), (*tet(A)*, *tet(B)*), (*sulI*, *sulII*, *sulIII*), (*cmlA*, *catI*, *catII*, *catIII*) ont été recherchés par PCR conventionnelle avec les amorces et souches contrôles précédemment décrites (Bibbal et al., 2009b).

La collection des souches STEC du top 5 et aEPEC a été testée pour la présence des gènes *intI1*, *intI2* et *intI3* qui correspondent aux 3 principales classes d'intégrons mobiles par PCR triplex en temps réel (Barraud et al., 2010). Enfin, les CMI d'azithromycine ont été déterminées pour les 39 STEC du top 5 par E-test suivant les recommandations du fabricant (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

8.1.3 Phylotypage des isolats d'*E. coli*

La recherche des groupes phylogénétiques pour les souches STEC du top 5, et les *E. coli* ne possédant pas les caractéristiques des EHEC du top 5 a été réalisée grâce à la nouvelle méthode

de phylotypage (Clermont et al., 2012). Cette méthode a permis l'assignation des isolats à un des 8 phylogroupes (A, B1, B2, C, D, E, F, Clade I) et aux clades II à V.

8.1.4 Expression des gènes *stx* : mise en évidence par le test de cytotoxicité sur des cellules Vero en culture

Les cellules Vero ont été mises en culture à raison de 5×10^3 cellules Vero/puits dans des microplaques 96 puits. Elles ont été cultivées pendant une nuit à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂ dans du milieu DMEM 1X (« Dulbecco's Minimum Essential Medium containing non-essential amino acids ») (Gibco®, Life technologies, UK), supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau (SVF) (Gibco®, South America).

Les isolats ont été incubés en bouillon LB à 37°C, sous agitation pendant une nuit et ensuite mis en sous-culture en bouillon LB supplémenté avec de la mitomycine C à 200 mM (pour augmenter la production de shigatoxine) à 37°C pendant 16h.

Un volume de 2 mL de culture bactérienne contenant 10^9 UFC/mL ajusté avec du milieu LB a été centrifugé à 6000 g à 4°C pendant 5min. Le surnageant obtenu a été filtré grâce à un filtre à membrane de 0,22 µm (Millipore, Carrighwohill, Ireland) puis dilué en série (1:4) avec du PBS (« Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ») (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

L'interaction bactérie-cellule a été effectuée en additionnant 10µl de chaque dilution à chaque puits de cellules Vero. Après 72h d'interaction à 37°C, les cellules ont été lavées 3 fois avec de l'HBSS (« Hank's Balanced Salt Solution ») (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), puis fixées avec 3,7% de Paraformaldéhyde pendant 15 min, et ensuite lavées à nouveau 3 fois avec 100 µl de PBS et 100 µl de Tris-HCl de pH 8,5 à 0,01 M.

Les cellules fixées ont ensuite été colorées avec 100 µl de bleu de méthylène à 1% dans du Tris-HCl pendant 45 min, puis lavées ensuite avec 100 µl d'eau distillée et 100 µl de Tris-HCl, et enfin séchées pendant la nuit.

Le bleu de méthylène a été extrait avec 100µl de HCl à 0,1M sous agitation. Après 15 min d'extraction, 75 µl de cellules ont été transférées dans de nouvelles microplaques 96 puits et la densité colorimétrique de chaque puits a été mesurée grâce au lecteur de microplaque TECAN (Infinite M200) à une longueur d'onde de 660 nm. Les souches d'*E. coli* EDL933 O157:H7 (*stx*_{1a}, *stx*_{2c}, *eae-γ*) et DH5α ont été utilisées respectivement comme contrôles positif et négatif. Ce test a été répété deux fois de façon indépendante pour chaque isolat.

8.1.5 Expression phénotypique du gène *eae* codé par le LEE : mise en évidence de l'adhésion par le test FAS sur des cellules HeLa en culture

Les souches STEC du top 5 résistantes et sensibles ont été incubées en bouillon LB sous agitation à 37°C pendant une nuit. Les cellules HeLa ont été cultivées à raison de $3,7 \times 10^4$ cellules/puits dans des chambres de culture cellulaire Lab-Tek 8 (Nunc) et mises en incubation 24 h dans les mêmes conditions que pour les cellules Vero. Les cellules HeLa ont été lavées 3 fois avec du HBSS préchauffé à 37°C.

L'interaction bactérie-cellule a été effectuée en additionnant 10^2 bactéries par cellule HeLa dans 500µl d'un milieu DMEM tamponné à 25mM et supplémenté avec du SVF à 5%. Après 6h d'interaction à 37°C, les cellules ont été lavées 6 fois avec de l'HBSS, puis fixées avec du Paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 20 min à température ambiante et ensuite perméabilisées avec du Triton X-100 à 0.25% dans PBS pendant 5 min. L'actine a été marquée avec la Rhodamine-phalloïdine (Molecular Probes®) suivant les recommandations du fabricant. Les souches EPEC E2348/69 O127:H6 (Levine et al., 1985) et DH5α ont été utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif.

8.1.6 Procédures de transformation

L'ADN plasmidique a été extrait grâce au QIAGEN® Plasmid Maxi Kit, et transformé dans des cellules *E. coli* chimiocompétentes One Shot TOP10 (Invitrogen/Life Technology®) en suivant les recommandations du fabricant.

Pour chaque souche, 50µl ont été étalés en duplicat sur des géloses LBA sélectives additionnées d'ampicilline, (16µg/ml), tétracycline, (16 µg/ml), sur des géloses Mueller Hinton contenant du sulfaméthoxazole (502 µg/ml).

Après transformation, une unique souche *E. coli* TOP10 transformée a été sélectionnée sur chaque gélose sélective et testée pour la présence du gène *ehxA*. La recherche d'*ehxA* a été réalisée par PCR conventionnelle en utilisant les amorces précédemment décrites (Paton and Paton, 1998a). Les transformants positifs pour *ehxA* ont été testés pour la présence des principaux gènes de résistance (*bla*_{TEM}), (*strA-strB*), (*tet(A)*), (*sulIII*) impliqués dans les phénotypes de résistance des souches parentales STEC du top 5.

Dans l'objectif de déterminer le contenu et la taille des plasmides des transformants positifs, l'ADN plasmidique des transformants a été extrait par la méthode de Kado et Liu (Kado and Liu, 1981). Pour chaque souche, le gel d'agarose Kado et Liu a été chargé avec la souche 39R681 marqueur de taille, EDL933, la souche parentale STEC du top 5, et le transformant

positif pour *ehxA* et les gènes de résistance. La souche de référence EDL933 a été utilisée comme contrôle positif pour la présence du plasmide de virulence des EHEC de 90 kb.

8.2 RESULTATS

8.2.1 Résistance et caractéristiques des souches STEC et aEPEC du top 5.

Parmi les 119 souches STEC et aEPEC du top 5, 16 (13,4%) étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés (Figure 23). Parmi les 39 STEC du top 5 étudiées, 7 étaient résistantes à au moins un antibiotique (17,9%) (Tableau 13). Elles appartenaient aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, et O111:H8. Six d'entre elles étaient multirésistantes et les principales résistances observées étaient contre l'ampicilline, la streptomycine, la tétracycline et les sulfamides. Une souche était résistante à l'acide nalidixique. Toutes les STEC du top 5 étaient sensibles à l'azithromycine.

En ce qui concerne la résistance des aEPEC, notre étude a montré que 9 des 80 (11,3%) souches étudiées étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés (Figure 23).

Toutes ces souches résistantes appartenaient au sérotype O26:H11 (Tableau 13). Elles étaient toutes résistantes à la tétracycline et 4 étaient multirésistantes.

Les principaux gènes de résistance impliqués dans les phénotypes de résistance étaient les gènes *bla_{TEM}*, *strA-strB*, *tet(A)* et *sulIII*. Enfin, une seule souche (H52-O26-1) était positive pour le gène *intI1*.

L'étude de la distribution des groupes phylogénétiques a montré que les STEC et les aEPEC du top 5 appartenaient soit au phylogroupe B1 soit au phylogroupe E (Tableau 14). Les STEC et les aEPEC du top 5 des sérotypes O26:H11, O103:H2, et O111:H2 ont été assignées au phylogroupe B1, tandis que celles des sérotypes O157:H7 et O145:H28 ont toutes été assignées au phylogroupe E.

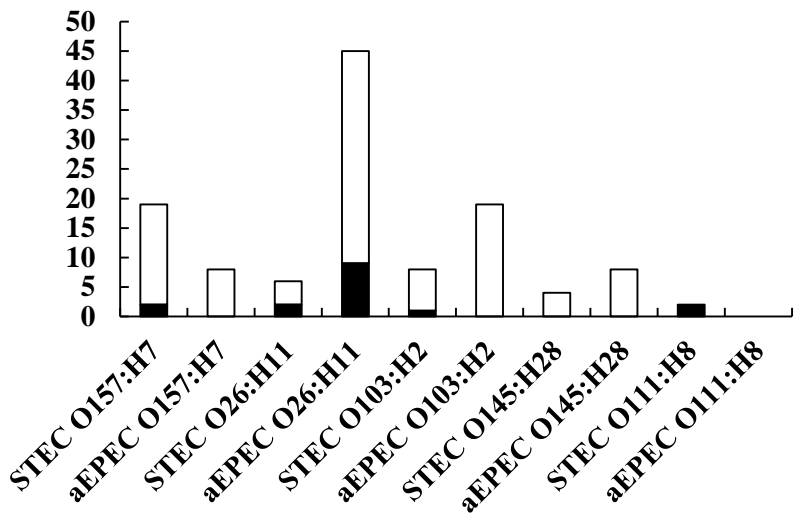


Figure 23. Nombre de souches STEC et aEPEC du top 5 testées par sérotype. Les bandes pleines indiquent le nombre de souches résistantes.

Tableau 13. Profils d'antibiorésistance des STEC et aEPEC du top 5, fréquence des *E. coli* ne possédant pas les caractéristiques des STEC et aEPEC du top 5 (non-STECC et aEPEC du top 5) isolées des mêmes bovins porteurs

Identification des STEC et aEPEC du top 5	Sérotype	Combinaison des gènes de virulence	Phénotype de résistance ^a	Combinaison des gènes de résistance ^b	Nombre d' <i>E. coli</i> non-STECC et aEPEC du top 5 résistantes/ Nombre d' <i>E. coli</i> non-STECC et aEPEC du top 5 testées
STECC					
C61-O157-1	O157:H7	<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2c} , <i>eae-γ</i> 1, <i>ehxA</i> , <i>tox</i> B	AMC-AMP-STR-TET-SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul</i> III	0/5
H13-O157-1	O157:H7	<i>stx</i> _{2c} , <i>eae-γ</i> 1, <i>ehxA</i> , <i>tox</i> B	TET	<i>tet</i> (A)	0/5
I92-O26-1	O26:H11	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae-β</i> 1	STR-TET-SSS	<i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul</i> III	0/5
K106-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1, <i>ehxA</i> , <i>tox</i> B	AMP-STR-SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>sul</i> III	0/5
L24-O103-1	O103:H2	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae-ε</i> , <i>ehxA</i>	AMP-STR-TET-SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul</i> III	0/5
J43-O111-1	O111:H8	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae-θ</i> , <i>ehxA</i>	AMP-STR-TET-SSS-NAL	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul</i> III	0/5
K50-O111-1	O111:H8	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae-θ</i> , <i>ehxA</i>	AMP-STR-TET-SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul</i> III	0/5
aEPEC					
A81-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	AMC-AMP-STR-TET-SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet</i> (A), <i>sul</i> III	0/5
A85-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	STR-TET-CHL-SSS	<i>strA-strB</i> , <i>flo</i> R, <i>sul</i> III	0/2
A86-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	STR-TET-CHL-SSS	<i>strA-strB</i> , <i>flo</i> R, <i>sul</i> III	0/1
A138-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	TET	n.d.	0/5
A140-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	TET	n.d.	0/5
H14-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	TET	n.d.	0/5
H52-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	STR-TET-CHL-SSS	<i>aadA</i> 1, <i>tet</i> (A), <i>cmlA</i> , <i>sul</i> III, <i>int</i> I	0/5
I77-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	TET	n.d.	n.a. ^c
I79-O26-1	O26:H11	<i>eae-β</i> 1	TET	n.d.	1/5 ^d

a AMC, amoxicilline plus acide clavulanique; AMP, ampicilline; CHL, chloramphénicol; NAL, acide nalidixique; SSS, sulfamides; STR, streptomycine; TET, tétracycline.

b Les gènes de résistance suivant ont été recherchés: *bla*_{TEM}, *strA-strB*, *aadA*1, *tet*(A), *tet*(B), *sul*I, *sul*III, *sul*III, *cmlA*, *cat*I, *cat*II, *cat*III et *flo*R; n.d., non déterminé.

c n.a., pour le bovin porteur I77, le rapport « nombre d'*E. coli* non-STECC et aEPEC du top 5 résistantes/ nombre d'*E. coli* non-STECC et aEPEC du top 5 testées » n'était pas applicable, car la souche aEPEC et 4 souches *E. coli* non-STECC et aEPEC du top 5 testées appartenaient au même clone. Quand à la 5^{ème} souche *E. coli* non-STECC et aEPEC du top 5 testée, elle était sensible à tous les antibiotiques.

d Pour le bovin porteur I79, la souche *E. coli* non-STECC et aEPEC du top 5 I79-D était résistante à la tétracycline. Des caractérisations génétiques ultérieures ont montré qu'elle était positive pour le gène *eae-β*1 et pour le sérotype O26:H11.

n.d., non déterminé.

Tableau 14. Distribution des phylogroupes des souches STEC et aEPEC du top 5 et *E. coli* non-STE C et aEPEC du top 5

Phylogroupe	Nombre de STEC et aEPEC du top 5 (n=119)	Nombre d' <i>E. coli</i> non-STE C et aEPEC du top 5 (n=97)
A	0	6
B1	80	79
B2	0	0
C	0	1
D	0	2
E	39	8
F	0	0
Clade III, IV, V	0	1

8.2.2 Résistance et caractéristiques des *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5

Afin de comparer les fréquences de résistance entre les souches STEC et aEPEC du top 5, aEPEC et les *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5, la recherche d'un isolat dominant d'*E. coli* dans la flore fécale commensale de chaque bovin porteur a été réalisée. Parmi les 109 bovins porteurs, 104 échantillons de fèces avaient pu être conservés à -80°C. Un isolat d'*E. coli* a pu être obtenu pour 103 échantillons de fèces.

La recherche des marqueurs génétiques associés aux EHEC a montré que 14 des *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 étaient positives pour au moins un des marqueurs recherchés (Tableau 15).

Six de ces souches présentaient des caractéristiques de souches appartenant au top 5. De plus, pour 5 bovins porteurs, (A126, A75, C24, I77, et J25), la souche STEC ou aEPEC du top 5 et l'autre souche *E. coli* présentaient les mêmes caractéristiques génétiques, les mêmes phylogroupes et les mêmes phénotypes de résistance. Ces observations indiquaient qu'il pourrait s'agir de clones identiques. Ces 5 bovins étaient probablement des super excréteurs de la souche STEC ou aEPEC du top 5. Ces souches ont donc été exclues de l'analyse comparative pour la résistance et la phylogénie des souches du top 5 *versus* les *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 de la flore commensale.

Huit autres *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 étaient positives pour des marqueurs génétiques associés aux EHEC. Cinq souches étaient positives pour les gènes *stx*_{1d} ou *stx*_{2c}, et 3 souches étaient positives pour le gène *eae*, mais elles n'appartenaient pas à un sérotype du top 5.

Au final, les phénotypes de résistance des STEC et aEPEC du top 5 ont pu être comparés à celui d'une souche *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 pour 97 bovins porteurs. Cette étude comparative a montré une différence notable.

Toutes les *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 étaient sensibles ; en revanche 13,4% des STEC et aEPEC du top 5 étaient résistantes à au moins un antibiotique testé. De plus, pour chaque bovin porteur d'une STEC du top 5 résistante, jusqu'à 5 isolats d'*E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 ont été testés pour la résistance (Tableau 13). Ils étaient tous sensibles, à l'exception de ceux du bovin I79. Pour ce bovin, une des 5 *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 testées était résistante à la tétracycline. Des caractérisations génétiques ultérieures ont montré que cette souche et la souche STEC du top 5 devaient appartenir au même clone.

Pour ce qui est de la composition génétique des *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5, le phylogroupe le plus prévalent était le groupe B1 (79/97), suivi des groupes E (8/97) et A (6/97) (Tableau 14).

Tableau 15. Caractéristiques des *E. coli* positives pour les marqueurs génétiques associés aux EHEC

<i>E. coli</i> positives pour les marqueurs génétiques associés aux EHEC					Souche du top 5 isolée chez le même bovin	
Identification des souches	Combinaison des gènes de virulence	Sérotype ^b	Phénotype de résistance ^c	Phylogroupe	Identification des souches	Pathotype
STEC du top 5 et aEPEC						
A126-A	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i> -β1, <i>ehxA</i>	O26:H11	S	B1	A126-O26-1	STEC O26:H11
A75-A	<i>eae</i> -β1	O26:H11	S	B1	A75-O26-1	aEPEC O26:H11
C24-A	<i>eae</i> -β1	O26:H11	S	B1	C24-O26-1	aEPEC O26:H11
I77-A	<i>eae</i> -β1	O26:H11	TET	B1	I77-O26-1	aEPEC O26:H11
J25-A	<i>eae</i> -β1	O26:H11	S	B1	J25-O26-2	aEPEC O26:H11
J28-A	<i>eae</i> -β1, <i>ehxA</i>	O26:H11	S	B1	J28-O157-1	STEC O157:H7
STEC						
A119-A	<i>stx</i> _{1d}		S	D	A119-O145-1	STEC O145:H28
C61-A	<i>stx</i> _{1d}		S	E	C61-O157-1	STEC O157:H7
G15-A	<i>stx</i> _{2c}		S	B1	G15-O157-1	STEC O157:H7
J76-A	<i>stx</i> _{2c}		S	B1	J76-O157-1 J76-O26-1	STEC O157:H7 aEPEC O26:H11
L119-A	<i>stx</i> _{1d}	O26:H n.d.	S	B1	L119-O26-1	aEPEC O26:H11
Souches positives pour <i>eae</i>						
A141-A	<i>eae</i> -θ		S	B1	A141-O157-1	aEPEC O26:H11
A143-A	<i>eae</i> -θ		S	B1	A143-O157-1	aEPEC O157:H7
L97-A	<i>eae</i> n.d. ^a , <i>ehxA</i>		S	B1	L97-O145-3	aEPEC O145:H28

a n.d., le sous-type *eae* était indéterminable

b La présence des sérotypes du top 5 a été recherché; n.d. non déterminé.

c TET, tétracycline. S, sensible à tous les antibiotiques testés.

8.2.3 Test de cytotoxicité et test FAS pour les souches STEC du top 5 résistantes et sensibles

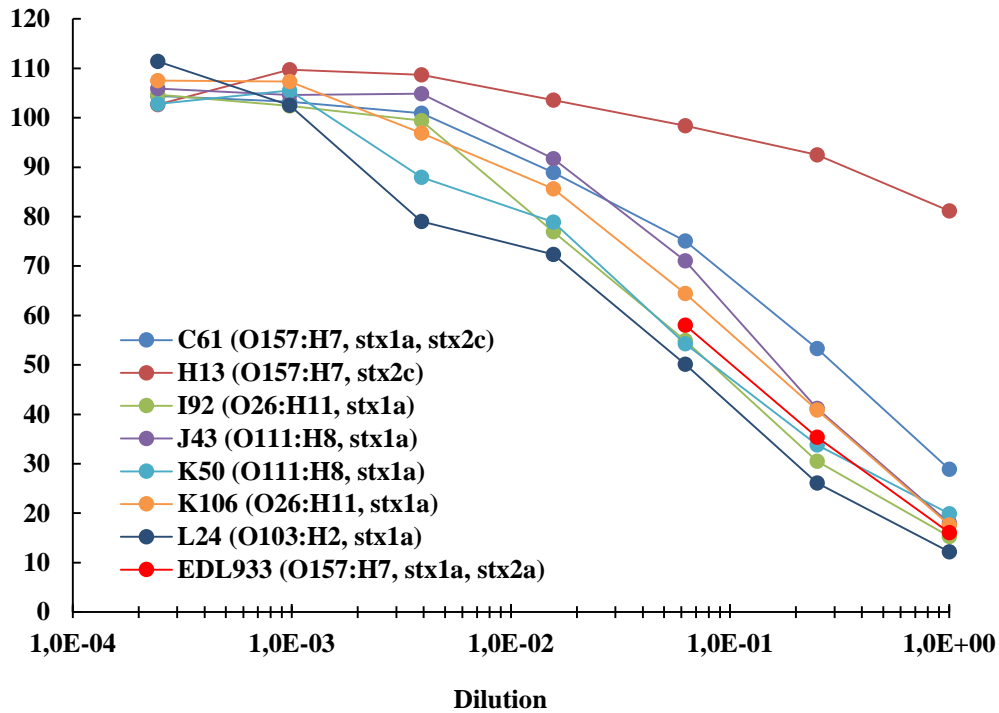
Afin de préciser la capacité des STEC du top 5 résistantes et sensibles à causer la maladie chez l'homme, leur activité cytotoxique sur cellules Vero et leur adhésion sur cellules HeLa ont été évaluées.

Parmi les 7 STEC du top 5 résistantes testées, 6 présentaient une activité cytotoxique sur les cellules Vero (Figure 24). Et parmi les 6 souches STEC du top 5 sensibles testées, 5 présentaient une activité cytotoxique sur les cellules Vero. Les souches H13-O157-1 résistante (O157:H7, *eae-γ1*, *stx_{2c}*) et K143-O157-1 sensible (O157:H7, *stx_{2c}*) n'ont eu aucun effet détectable comparativement au contrôle négatif *E. coli* DH5a.

La capacité d'adhésion des STEC du top 5 résistantes et sensibles aux cellules HeLa a été étudiée par le test FAS. Les 13 souches adhéraient aux cellules HeLa en induisant une accumulation de filaments d'actine en dessous de la zone d'adhésion (Figure 25).

Aucune différence de virulence n'a été observée entre les souches STEC du top 5 résistantes et sensibles testées.

A



B

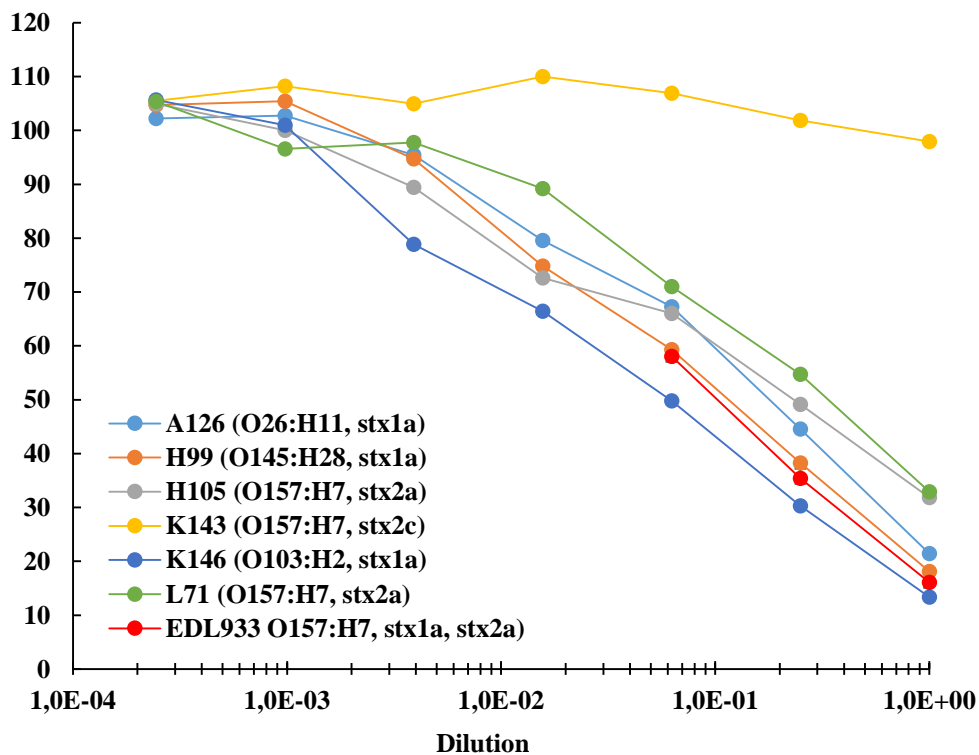


Figure 24. Activité cytotoxique des souches STEC du top 5 résistantes (A) et sensibles (B) sur les cellules Vero. Le taux de survie des cellules Vero traitées avec le surnageant de la souche DH5a correspond à 100%. EDL933 a été utilisée comme souche contrôle positive.

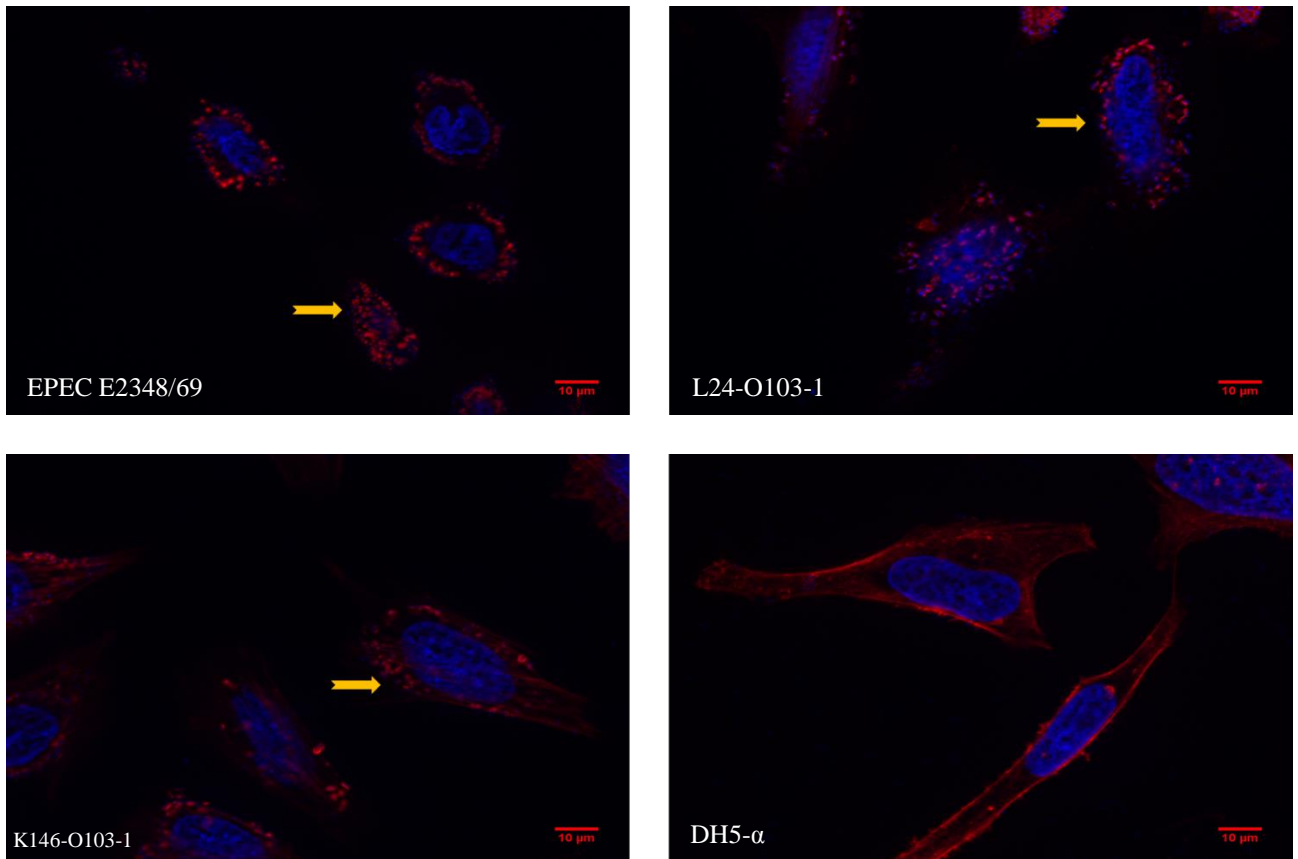


Figure 25. Test FAS des souches STEC du top 5 (O103:H2, *stx*_{1a}, *eae*-ε) L24-O103-1 antibiotorésistante et K146-O103-1 sensible sur des cellules HeLa.

L'accumulation d'actine au niveau des sites d'adhésion des souches bactériennes testées est visualisée par la flèche jaune (→). Les souches EPEC E2348/69 et DH5-α ont été utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif. Test visualisé au microscope ApoTome Zeiss, Objective Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27.

8.2.4 Localisation des gènes de résistance chez les souches STEC

La possibilité de localisation des gènes de résistance sur le plasmide de virulence des EHEC a été étudiée. Le gène *ehxA* étant un marqueur fiable de la présence du plasmide de virulence des EHEC chez les souches STEC O157 et non O157, il a été recherché chez toutes les STEC du top 5. Il était présent chez 38 des 39 STEC étudiées (Tableau 16).

Pour ce qui est des STEC du top 5 résistantes, 6 étaient positives pour le gène *ehxA* (Tableau 13). Inversement, aucune des souches aEPEC O26:H11 résistantes n'était positive pour *ehxA* (Tableau 13). Ce qui est cohérent avec le fait que la fréquence des aEPEC O26:H11 positives pour *ehxA* était faible (13/45) (Tableau 16). Pour toutes les STEC du top 5 résistantes, les expérimentations de transformation ont conduit à l'obtention d'un transformant sur les géloses supplémentées en antibiotiques (Tableau 17). Pour la seule souche STEC du top 5 négative pour *ehxA* (I92-O26-1), les transformants étaient positifs pour les gènes de résistance présents chez la souche parentale (*strA-strB*, *tet(A)*, *sulIII*).

Pour les souches STEC positives pour *ehxA*, le gène n'a pas été détecté chez deux transformants. Les souches parentales appartenaient aux sérotypes O157:H7, et seuls les gènes *sulIII* et *tet(A)* respectivement avaient été transférés pour les souches STEC résistantes C61-O157-1 et H13-O157-1.

Le cotransfert des gènes de résistance et du gène *ehxA* a été observé pour 4 STEC dont une appartenait au sérotype O26:H11, une au sérotype O103:H2, et deux au sérotype O111:H8. Tous les gènes de résistance des souches parentales avaient été transférés (*bla_{TEM}*, *strA-strB*, *tet(A)*, *sulIII*).

Le gel d'électrophorèse a montré que chaque transformant portait un unique plasmide de grande taille située entre 147 et 63 kb. La figure 26 montre que parmi tous les plasmides présents dans la souche K50-O111-1, un seul portait concomitamment les gènes de résistance et le gène *ehxA*. Le même résultat a été obtenu avec les souches K106-O26-1, L24-O103-1 et J43-O111-1.

Tableau 16. Nombre des STEC et aEPEC étudiées par sérotype et nombre de souches positives pour le gène *ehxA*

Sérotype	STEC (n=39)		aEPEC (n=80)	
	Nombre de souches testées	Nombre de souches positives pour <i>ehxA</i>	Nombre de souches testées	Nombre de souches positives pour <i>ehxA</i>
O157:H7 (n=27)	19	19	8	8
O26:H11 (n=51)	6	5	45	13
O103:H2 (n=27)	8	8	19	19
O145:H28 (n=12)	4	4	8	8
O111:H8 (n=2)	2	2	0	0

Tableau 17. Résultat des expérimentations de transformation avec l'ADN plasmidique extrait des souches STEC du top 5 résistantes.

Identification des souches	Sérotype	Combinaison des gènes de résistance	Transformation (antibiotiques de sélection) ^a	Transfert du gène <i>ehxA</i>	Transfert des gènes de résistance
Positive pour <i>ehxA</i>					
C61-O157-1	O157:H7	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>	+ (SSS)	-	<i>sulIII</i>
H13-O157-1	O157:H7	<i>tet(A)</i>	+ (TET)	-	<i>tet(A)</i>
K106-O26-1	O26:H11	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>sulIII</i>	+ (AMP, SSS)	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>sulIII</i>
L24-O103-1	O103:H2	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>	+ (AMP, SSS, TET)	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>
J43-O111-1	O111:H8	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>	+ (AMP, SSS, TET)	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>
K50-O111-1	O111:H8	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>	+ (AMP, SSS, TET)	+	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>
Négative pour <i>ehxA</i>					
I92-O26-1	O26:H11	<i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>	+ (TET, SSS)	n.a ^b	<i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sulIII</i>

a AMP, ampicilline; SSS, sulfamides; TET, tétracycline.

b n.a, non applicable, car la souche I92-O26-1 était négative pour *ehxA*.

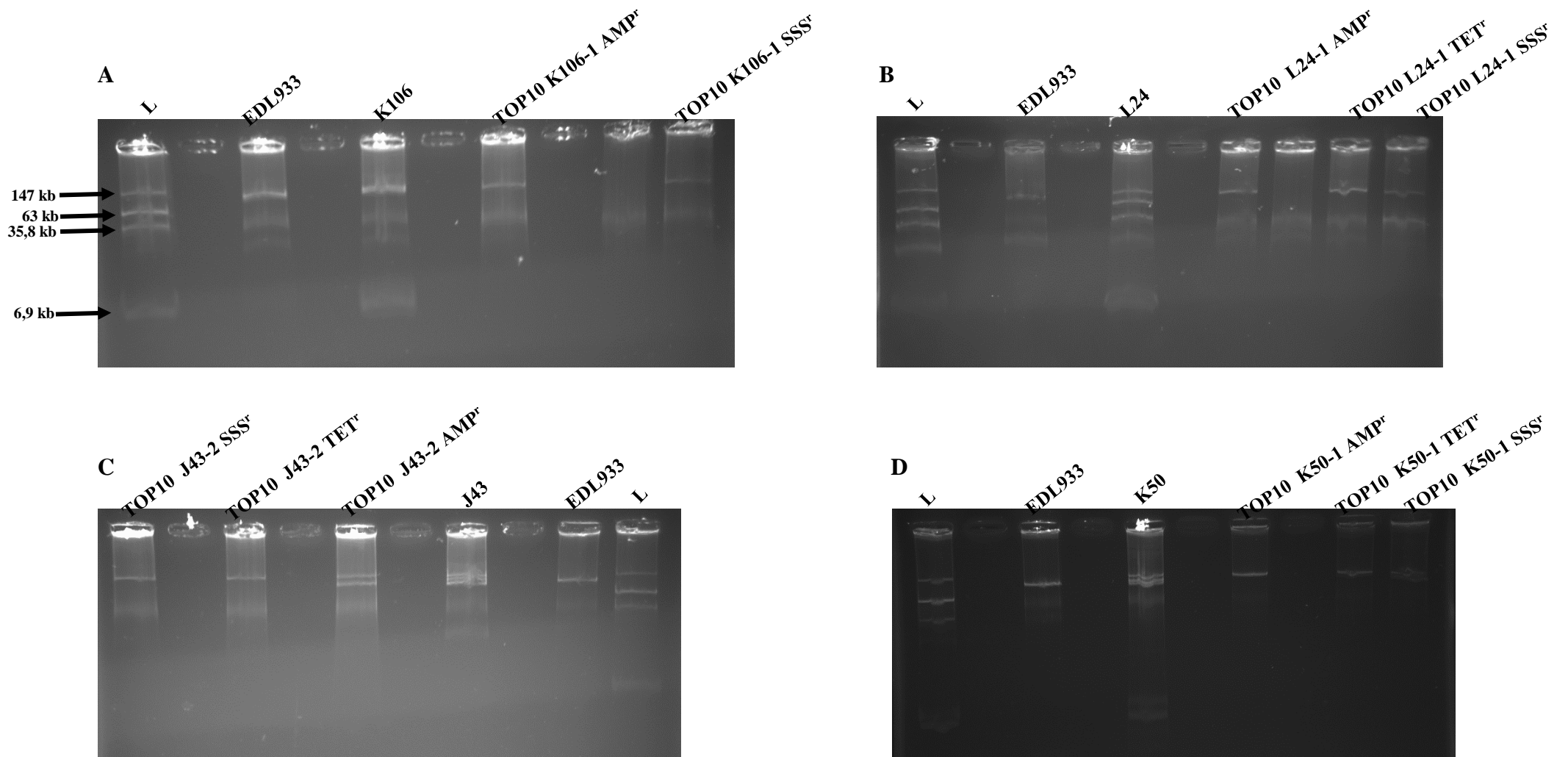


Figure 26. Profils des plasmides extraits par la méthode de Kado et Liu.

Piste L, les quatre plasmides de la souche 39R681 utilisée comme marqueur de taille; Piste EDL9333, souche EDL933 portant le plasmide de virulence des EHEC de 90 kb EHEC; Piste K106, L24, J43, K50, souches parentales K106-O26-1, L24-O103-1, J43-O111-1, et K50-O111-1 ; Pistes TOP10 K106-1 AMP^r, TOP10 L24-1 AMP^r, TOP10 J43-2 AMP^r, TOP10 K50-1 AMP^r; TOP10 L24-1TET^r, TOP10 J43-2TET^r, TOP10 K50-1 TET^r; TOP10 K106-1 SSS^r, TOP10 L24-1 SSS^r, TOP10 J43-2 SSS^r, TOP10 K50-1 SSS^r, E. coli TOP10 transformées sélectionnées sur géloses additionnées respectivement en ampicilline, tétracycline, et sulfamides ; elles portent le plasmide positif pour les gènes de résistance et le gène ehxA.

8.3 DISCUSSION

Notre objectif était de réaliser une étude comparative des profils de résistance des souches STEC et aEPEC du top 5 *versus* des *E. coli* non-STEC et aEPEC de la flore fécale des mêmes bovins. Les STEC et aEPEC du top 5 avaient été isolées de fèces de bovins durant une étude de prévalence conduite dans des abattoirs français. Ces souches avaient été isolées par IMS après enrichissement des fèces (Bibbal et al., 2014b; Bibbal et al., 2015).

Pour chacun des 109 bovins porteurs, la recherche d'un isolat d'*E. coli* dominant parmi les *E. coli* dans la flore fécale a été effectuée. Pour atteindre cet objectif, un échantillon de fèces qui n'avait pas été soumis à l'enrichissement avait été stocké. La recherche des marqueurs génétiques associés aux EHEC chez les autres *E. coli* a montré que 14 *E. coli* étaient positives pour ces marqueurs. Nous avons montré que pour 5 bovins, la souche STEC du top 5 et l'autre souche *E. coli* étaient des clones. Ceci est cohérent avec le fait que les STEC et aEPEC du top 5 sont présentes la plupart du temps en faible concentration dans les fèces, d'où le recours à une étape préalable d'enrichissement pour pouvoir les isoler (Durso and Keen, 2007; Verstraete et al., 2010), mais que certains bovins porteurs d'une souche STEC peuvent excréter jusqu'à 10^4 bactéries/g de fèces. D'autres STEC et souches positives pour le gène *eae* ont été identifiées mais elles ne présentaient pas les caractéristiques des STEC du top 5. Enfin, après exclusion des souches STEC et aEPEC du top 5, une collection de 97 *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 a été obtenue. Ces souches appartenaient principalement au phylogroupe B1, ce qui correspond à la distribution phylogénétique des *E. coli* isolées dans les fèces de bovins adultes (Baldy-Chudzik et al., 2008; Carlos et al., 2010).

L'étude des profils de résistance a montré que toutes les *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5 étaient sensibles aux antibiotiques testés. Nous avons précédemment montré que les eaux usées d'abattoirs de bovins ne contenaient que 5% d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques (Um et al., 2016). Dans l'Union européenne, il a été rapporté que les *E. coli* indicatrices isolées de bovins adultes à l'abattoir présentaient de faibles pourcentages de résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol (de 1,4 à 2,3%) et pour les *E. coli* indicatrices isolées chez les bovins à viande en Espagne et en Allemagne, seulement 0,6 à 19,8% étaient résistantes à l'un des antibiotiques testés (EFSA, 2015).

Au contraire, la résistance a été observée pour les souches STEC et aEPEC du top 5. L'étude de la résistance des aEPEC a montré que 9 des 80 souches étudiées étaient résistantes (11,3%). Cependant, ce pourcentage demeure faible comparativement aux données de la littérature. Mora

et ses collaborateurs ont montré que parmi les 34 souches aEPEC O26:H11 isolées de bovins, 60% étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés et 23% à au moins 5 antibiotiques (Mora et al., 2005).

Parmi les 39 souches STEC du top 5 étudiées, 7 (17,9%) étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés et 6 étaient multirésistantes (15,4%). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études. Par exemple aux Etats-Unis, Beier et ses collaborateurs ont observé que parmi 344 STEC O157:H7 isolées de fèces de bovins dans des abattoirs, de carcasses, au niveau des membres, et dans de la viande hachée, seulement 14% étaient résistantes (Beier et al., 2013). Au Japon, la résistance a été détectée chez 13,3% des STEC O157 isolées chez des bovins à viande (Sasaki et al., 2012).

Au contraire, en Espagne, Cabal et ses collaborateurs ont rapporté que sur 50 STEC O157:H7 isolées de fèces de bovins dans des abattoirs, 64% étaient résistants à la tétracycline, la streptomycine, les sulfamides, et 34% étaient résistantes à l'ampicilline (Cabal et al., 2013). En outre, au Canada, le pourcentage de STEC O157 résistantes était significativement différent chez les souches humaines par rapport à celles isolées de bovins : 38% *versus* 60% (Vidovic et al., 2013).

De hauts niveaux de résistance ont été rapportés chez d'autres sérotypes de STEC isolés de bovins (O26:H11; O111:H8; O103:H2) (Karama et al., 2008; Scott et al., 2009). Les raisons de ces différences demeurent non élucidées et requièrent davantage de données.

Enfin, il est important de souligner que toutes les STEC du top 5 étaient sensibles à l'azithromycine. Une étude récente, en France, a également montré que 508 EHEC isolées de patients étaient sensibles à l'azithromycine à l'exception de deux souches atypiques (Jost et al., 2016).

L'observation la plus frappante de notre étude était la nette différence entre les niveaux de résistance des STEC du top 5 et les aEPEC en comparaison avec les *E. coli* non-STECS et aEPEC du top 5. Le sujet du lien entre la virulence et la résistance est complexe. Son étude devrait prendre en considération la diversité des gènes de résistance, de virulence, les espèces bactériennes, les hôtes et les niches écologiques (Martinez and Baquero, 2002; Da Silva and Mendonca, 2012; Beceiro et al., 2013).

Très peu d'études se sont intéressées au lien entre les marqueurs de virulence d'*E. coli* responsables de diarrhée et les gènes de résistance. Chez les populations rurales de l'Equateur, le pourcentage de résistance était significativement élevé chez les *E. coli* responsables de diarrhée appartenant aux pathotypes (ETEC, EPEC, EIEC, EAEC, et DAEC) par rapport aux

E. coli commensales (Zhang et al., 2015). Dans une autre étude conduite sur des porcs sains, il a été montré qu'il existait une association statistique positive entre des gènes de résistance et de virulence, notamment *stx1*, *stx2*, *eae*, *estA*, *estB*, *elt*, *aidA-1*, et *fedA1* chez des *E. coli* isolées de fèces (Rosengren et al., 2009). Dans notre étude, nous avons montré que les STEC pouvaient être plus résistantes que les *E. coli* non-STEC et aEPEC du top 5.

Nous avons également vérifié l'expression des phénotypes de virulence chez les STEC résistantes. Toutes les STEC résistantes étaient capables de causer des lésions d'attachement et d'effacement. Elles étaient aussi responsables de la cytotoxicité sur des cellules Vero, à l'exception de la souche positive pour le gène *stx2c*, ce qui est cohérent avec ce qui a été publié précédemment (Schmitt et al., 1991). En effet, il a été démontré que la shigatoxine 2c (Stx2c) était 25 fois moins cytotoxique pour des cellules Vero que Stx2a (Fuller et al., 2011).

Nous avons soulevé la question d'un possible lien entre les gènes de résistance et de virulence. En effet, la colocalisation de gènes de résistance et virulence a été montrée dans la littérature sur le plasmide de virulence des EHEC pO26-CRL. Ce plasmide était extrait de la souche EHEC O26:H- (O6877) (Venturini et al., 2010). Le gène *ehxA* est un marqueur fiable de la présence du plasmide de virulence des EHEC dans les souches O157 et non-O157 (Levine et al., 1987; Brunder et al., 1999). Ce gène a été identifié chez 38 des 39 STEC de notre collection. Parmi les 7 souches STEC résistantes, 6 étaient positives pour le gène *ehxA*, ce qui soulève la question de la localisation des gènes de résistance sur le plasmide de virulence des EHEC. Pour 4 de ces souches, nous avons démontré que le gène *ehxA* et les gènes de résistance *bla_{TEM}*, *strA-strB*, *tet(A)*, *sulIII* étaient localisés sur le même grand plasmide, qui est probablement le plasmide de virulence des EHEC. Il est important de noter que ces souches appartenaient aux sérotypes O26:H11, O103:H2 et O111:H8, et qu'elles avaient été isolées de bovins originaires de fermes différentes, durant différentes campagnes de prélèvement (Bibbal et al., 2015).

Afin de vérifier l'hypothèse d'un recrutement de gènes de résistance sur les plasmides de virulence des EHEC, une étude comparative des séquences complètes de ces plasmides est nécessaire. Le séquençage a permis à Venturini et ses collaborateurs de rapporter que le plasmide de virulence des EHEC pO26-CRL contenait un transposon Tn21 qui codait pour la résistance à 6 classes d'antibiotiques (ampicilline, streptomycine, sulfathiazole, kanamycine et néomycine, triméthoprime et chlorure de mercure) (Venturini et al., 2010). La revue de Martinez et Baquero a traité du sujet des interactions entre la pathogénie, le potentiel épidémique et la résistance aux antibiotiques. Ces auteurs soulignent que l'association entre les

gènes de résistance et de virulence pourrait être une nouvelle stratégie d'adaptation dans l'évolution des bactéries et la colonisation de nouveaux hôtes et environnements (Martinez and Baquero, 2002). La revue qui s'est intéressée aux familles de plasmides de résistance chez les entérobactéries partageait la même hypothèse (Carattoli, 2009). Il doit être souligné que nous avons rapporté la colocalisation des gènes de résistance *bla*_{TEM}, *strA-strB*, *tet(A)*, *sulIII* et du gène *ehxA* chez des souches STEC appartenant à divers sérotypes et isolées chez des bovins originaires de différentes fermes. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'évènements de transfert latéral de gènes qui aurait conduit à la dissémination de gènes de résistance chez les souches STEC. La dissémination de la résistance pourrait être due à l'intégration d'un transposon de résistance sur le plasmide de virulence des EHEC. En effet, les gènes de résistance *bla*_{TEM}, *strA-strB*, *tet(A)* et *sulIII* qui ont été décrits comme colocalisés avec le gène *ehxA*, sont reconnus comme étant très souvent associés aux transposons (Venturini et al., 2010; Djordjevic et al., 2013; Venturini et al., 2013).

Pour conclure, nous avons montré que le pourcentage de résistance chez les souches considérées comme hautement pathogènes pour l'homme était faible (<18%). En revanche, nous avons observé que les pourcentages de résistance des STEC et aEPEC du top 5 étaient élevés par rapport à celui des E. coli non-STEC et aEPEC du top 5 isolées de la flore fécale des mêmes bovins adultes. Pour 4 des 7 STEC du top 5 résistantes, nous avons démontré que les gènes de résistance aux antibiotiques étaient localisés sur un grand plasmide, qui était probablement le plasmide de virulence des EHEC. Toutes ces souches STEC ont montré une capacité à produire des lésions d'attachement et d'effacement, elles étaient aussi toxiques pour les cellules Vero. Cette étude soulève la question d'une possible expansion clonale de telles souches pathogènes, notamment par des pressions de sélection due à l'usage d'antibiotiques chez les bovins porteurs.

Afin de vérifier et comprendre les mécanismes à l'origine de la localisation des gènes de résistance sur le plasmide de virulence des EHEC, il serait donc intéressant de séquencer en entier les plasmides de virulence des EHEC multirésistantes. L'analyse des séquences nous permettrait de définir avec précision l'apparition de la résistance sur ces plasmides et l'historique et les supports impliqués dans les évènements de transfert des gènes de résistance.

8.4 VALORISATION DES RESULTATS OBTENUS

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de 3 posters et d'une communication orale présentés dans des congrès nationaux et internationaux.

8.4.1 Communication orale n°1



« Antibiorésistance comparée d'*Escherichia coli* productrices ou non de shigatoxines ».

Communication effectuée lors du 12ème Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM)

A l'Institut Pasteur de Paris du 21 au 23 Mars 2016.

Résumé

En France, les *E. coli* productrices de shigatoxines (STEC) appartenant aux sérotypes du Top 5 (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28) sont considérées comme des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) hautement pathogènes. L'étude de leur prévalence dans le cheptel bovin a de plus permis d'isoler des *E. coli* entéropathogènes atypiques (aEPEC) possédant les mêmes caractéristiques génétiques à l'exception du gène *stx*.

L'objectif de cette étude était de comparer les profils de résistance aux antibiotiques de 39 STEC du Top 5 et 80 aEPEC à ceux d'*E. coli* dominantes de la flore fécale isolées de prélèvements de fèces de bovins adultes au stade de l'abattoir.

Les souches STEC et aEPEC ont été isolées après enrichissement et séparation immunomagnétique. Les clones d'*E. coli* considérés comme dominants dans la flore fécale des bovins porteurs d'une souche STEC ou aEPEC ont été isolés après étalement de fèces non enrichis sur géloses RAPID'*E.coli* 2.

Sept souches STEC (deux O157:H7, deux O26:H11, une O103:H2 et deux O111:H8) étaient résistantes (17.9%) dont 6 multirésistantes (MDR) (15.4%). Une résistance a été observée à l'ampicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, la streptomycine, la tétracycline, les sulfamides, le triméthoprime et l'acide nalidixique. Parmi les souches aEPEC, neuf O26:H11 étaient résistantes (11.3%), dont 4 MDR. Toutes étaient résistantes à la tétracycline. Une seule souche aEPEC O26:H11 MDR était porteuse du gène d'intégrase *intI1*. L'isolement d'un clone

d'*E. coli* dominant dans la flore fécale des 109 bovins porteurs de STEC ou de souches aEPEC a permis l'obtention de 102 *E. coli* qui ne présentaient pas les caractéristiques génétiques des STEC du Top 5 ni des aEPEC. Ces souches étaient toutes sensibles aux 16 antibiotiques testés. Nous avons montré que le gène de l'entérohémolysine A (*ehxA*), porté par le plasmide de virulence des EHEC, et les gènes de résistance *bla*_{TEM}, *strA-strB*, *tet(A)*, *sulII* étaient présents sur un même plasmide pour 4 souches antibiorésistantes du Top 5 (une O26:H11, une O103:H2, deux O111:H8). Ces résultats ont permis de mettre en évidence un possible lien entre certains marqueurs génétiques associés à la virulence des EHEC et des gènes de résistance aux antibiotiques.

Mots clés: *Escherichia coli*, STEC, aEPEC, gènes d'antibiorésistance, facteurs de virulence, entérohémolysine, bovins adultes.

8.4.2 Poster n°1 et n°2



“Antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28 isolated from slaughtered adult cattle in France”

Maryse Michèle Um, Monique Kérourédan, Estelle Loukiadis, Frederic Auvray, Eric Oswald, Hubert Brugère, **Delphine Bibbal**.

Présenté lors du congrès « 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE) » à Tours du 29 Juin au 1 Juillet 2015

ICOMST 2015 “Antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28 isolated from cattle slaughtered in France”

Maryse Michèle Um, Delphine Bibbal, Monique Kérourédan, Estelle Loukiadis, Frederic Auvray, Eric Oswald, **Hubert Brugère**.

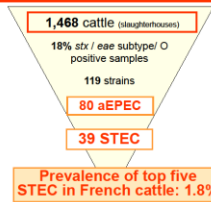
Présenté lors du congrès « 61st International Congress of Meat Science and Technology (iCOMST) » à Clermont-Ferrand du 23 au 28 Août 2015.

Antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28 isolated from slaughtered adult cattle in France

UM Maryse Michèle¹, KEROUEDAN Monique¹, LOUKIADIS Estelle², AUVRAY Frédéric³, OSWALD Eric⁴, BRUGERE Hubert¹, BIBBAL Delphine¹
¹Université de Toulouse, INP-ENVT, INSERM UMR 1043, INRA USC 1360, Toulouse, France; ²Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR STEC, CNRS UMR 5557 Microbial Ecology, Marcy l'Etoile, France; ³Université Paris-Est, Anses, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France; ⁴INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France

Introduction and Objectives

In France, the main typical pathogenic enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) are defined as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) belonging to top five serotypes (Anses, 2010); and cattle are known to be the reservoir of STEC strains.
 We previously evaluated the prevalence of top five STEC strains in slaughtered adult cattle in France (Bibbal et al., 2016, AEM).
 Atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC), with the same genetic characteristics as top five STEC strains except that they lacked an *stx* gene, were also recovered from these samples.



EHEC are responsible for severe clinical symptoms, such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Although antibiotic treatment remains controversial in the case of EHEC infection, some classes of antibiotics are often used in clinical practice (Agger et al., JAC, 2015).

Objectives:

- Determine the antimicrobial resistance of top five STEC and aEPEC isolated from French adult cattle.
- Compare *Stx* toxicity in Vero cells and adherence to HeLa cells between STEC resistant and susceptible strains.

Materials and Methods

Number of STEC and aEPEC strains tested per serotype:

	O157:H7	O26:H11	O103:H2	O145:H28	O111:H8	Total
STEC	19	6	8	4	2	39
aEPEC	8	45	19	8	0	80

(Bibbal et al., 2014, 2016, AEM)

Screenings of the 119 STEC and aEPEC strains:

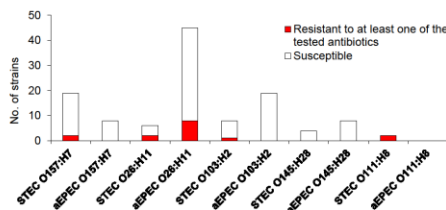
- Antimicrobial susceptibility to 16 antibiotics tested by disk diffusion method (SFM - EUCAST guidelines): Tetracycline (TET), Ampicillin (AMP), Streptomycin (STR), Sulfonamides (SSS), Trimethoprim (TMP), Chloramphenicol (CHL), Gentamicin (GEN), Nalidixic acid (NAL), Amoxicillin-clavulanic acid (AMC), Ciprofloxacin (CIP), Ceftriaxone (CEX), Cefotaxime (CTX), Cefazolin (CAZ), Cefepime (FEP) and Ertapenem (ETP)
- int1*, *int2* and *int3* genes (Beraud et al., 2010, JAC)

- Determination of azithromycin MICs for the 39 top five STEC using E-test.
- Screening of resistant genes (*bla*_{TEM}), (*strA-strB*, *aadA1*), (*tet(A)*, *tet(B)*), (*suII*, *suII*, *suIII*), (*cmiA*, *catI*, *catII*, *catIII*, *floR*) (Bibbal et al., 2009, AEM)
- Vero cell cytotoxicity test and Fluorescent-Actin Staining test for 7 resistant and 6 susceptible STEC strains (oswald et al., 2006, Infect. Immun.; Sacher et al., 2016, AAC)

Results

Result 1: Screening of antimicrobial resistance of 39 top five STEC and 80 aEPEC

Graph 1: Number of top five STEC and aEPEC resistant strains



- Among the 39 top five STEC tested, 7 strains were resistant to one of the tested antibiotics (18%).
- As regards aEPEC, 8 of the 80 tested strains were resistant (10%).
- Among the 119 strains, only one was positive for the *int1* gene (0.8%).
- All the STEC strains were susceptible to azithromycin.

Table 1: Resistance profile of top five STEC and aEPEC strains isolated from bovine feces

Strain	Cattle category ^a	Serotype	Presence of: <i>stx</i> (subtype)	<i>eae</i> (subtype)	Resistance phenotype ^b	Combination of resistance genes ^d	<i>int1</i> gene ^e
STEC							
C61	DC	O157:H7	+ (<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2c})	+ (γ1)	AMC AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>suII</i> , <i>tet(A)</i>	-
H13	YBB	O157:H7	+ (<i>stx</i> _{1a})	+ (γ1)	TET	-	-
I92	YDB	O26:H11	+ (<i>stx</i> _{1a})	+ (β1)	STR TET SSS	<i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>suII</i>	-
K106	YDB	O26:H11	+ (<i>stx</i> _{1a})	+ (β1)	AMP STR SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>suII</i>	-
L24	YDB	O103:H2	+ (<i>stx</i> _{1a})	+ (ε)	AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>suII</i>	-
J43	DC	O111:H8	+ (<i>stx</i> _{1a})	+ (θ)	AMP STR TET SSS NAL	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>suII</i>	-
K50	YDB	O111:H8	+ (<i>stx</i> _{1a})	+ (θ)	AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>suII</i>	-
aEPEC							
A81	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	AMC AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>suII</i>	-
A85	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	STR TET CHL SSS	<i>strA-strB</i> , <i>floR</i> , <i>suII</i>	-
A86	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	STR TET CHL SSS	<i>strA-strB</i> , <i>floR</i> , <i>suII</i>	-
A138	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	TET	nd	-
A140	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	TET	nd	-
H14	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	TET	nd	-
H52	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	STR TET CHL SSS	<i>aadA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>cmiA</i> , <i>suII</i>	+ (<i>int1</i>)
I79	YDB	O26:H11	-	+ (β1)	TET	nd	-

a: DC, Dairy cow; YBB, Young beef bull; YDB, Young dairy bull; b: +, present; -, absent; c: AMC, amoxicillin plus clavulanic acid; AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; NAL, nalidixic acid; SSS, sulfonamides; STR, streptomycin; TET, tetracycline; d: nd, not determined

Result 2: Comparison of *Stx* toxicity in Vero cells and adherence to HeLa cells between 7 resistant STEC and 6 susceptible STEC

Graph 2: Cytotoxic activity in Vero cells

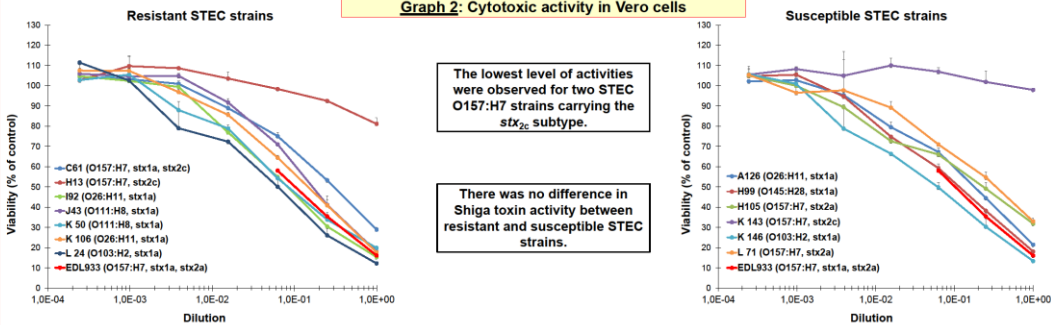
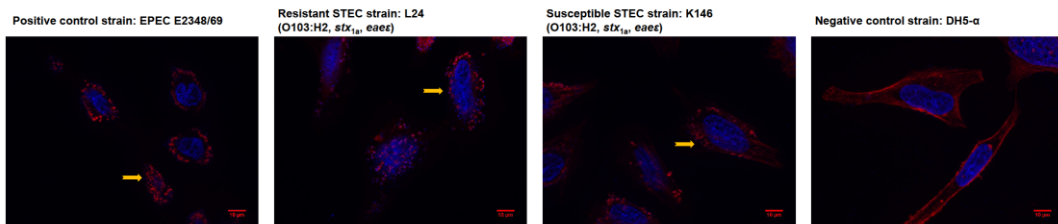


Fig 1: Fluorescent-Actin Staining test (HeLa cells)



Actin accumulation at sites of bacterial adhesion
 Microscope Axiophot Zeiss, Objective Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27

All resistant and susceptible STEC strains were adherent to HeLa cells.

Conclusions

- The level of resistance of top five STEC and aEPEC isolated from slaughtered adult cattle in France was low.
- Harboring resistance genes had no effect on Shiga toxin activity and adherence to HeLa cells.

8.4.3 Poster n°3



“Antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28 isolated from cattle slaughtered in France”

Delphine Bibbal, Maryse Michèle Um, Monique Kérouredan, Estelle Loukiadis, Frederic Auvray, Eric Oswald, Hubert Brugère.

Présenté lors du congrès « 9th Triennial International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* (VTEC) meeting » à Boston (Etats-Unis) du 13 au 16 Septembre 2015.

INP
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE

BIBBAL Delphine¹, UM Maryse Michèle¹, KEROURÉDAN Monique¹, LOUKIADIS Estelle², AUVRAY Frederic³, OSWALD Eric⁴, BRUGÈRE Hubert¹

¹Université de Toulouse, INP-ENVY, INSERM UMR 1043, INRA USC 1360, Toulouse, France; ²Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR 1285, St-Genès, France; ³INRA USC 1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France; ⁴INRA USC 1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France

Introduction and Objectives

In France, the main typical pathogenic enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) are defined as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) belonging to top five serotypes (i.e., O157 and O26) and cattle are known to be the reservoir of STEC strains. We previously estimated the prevalence of top five STEC strains in slaughtered adult cattle in France (Bibbal et al., 2014-2015).

Atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC), with the same genetic characteristics as top five STEC strains except that they lacked an *stx* gene, were also recovered from these samples.

EHEC are responsible for severe clinical symptoms, such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Although antibiotic treatment remains controversial in the case of EHEC infection, some classes of antibiotics are often used in clinical practice (Agar et al., JAC, 2016).

Objective 1: Determine the antimicrobial resistance of top five STEC and aEPEC isolated from French adult cattle.

Objective 2: Compare (investigate) *Stx* toxicity in Vero cells and adherence to HeLa cells between STEC resistant and susceptible strains.

1,468 cattle (slaughterhouses)

18% *stx* / *eae* subtype/O positive samples

119 strains

80 aEPEC

39 STEC

Prevalence of top five STEC in French cattle: 1.8%

Materials and Methods

Number of STEC and aEPEC strains tested per serotype:

	O157:H7	O26:H11	O103:H2	O145:H28	O111:H8	Total
STEC	19	6	8	4	2	39
aEPEC	8	45	19	0	0	80

Screenings of the 119 STEC and aEPEC strains:

- Antimicrobial susceptibility to 16 antibiotics tested by disk diffusion method (BFM - EUCAST guidelines)
- Determination of azithromycin MICs for the 39 top five STEC using E-test.
- Screening of resistance genes (*bla*_{TEM}, *strA-strB*, *zsdA1*, *intA*, *intB*), (*suil*, *suil2*, *suil3*), (*cmfA*, *caat*, *caat2*, *caat3*, *flaR*) (Babal et al., 2011, 2016).
- Vero cell cytotoxicity test and Fluorescent-Actin Staining test for 7 resistant and 6 susceptible STEC strains (Oswald et al., 2005; Inaba, Imman, Saechai et al., 2016, AAC).
- Phylogroup assignment (Clement et al., 2013, Environ Microbiol Rep)

Result 1: Screening of antimicrobial resistance of 39 top five STEC and 80 aEPEC

Graph 1: Number of top five STEC and aEPEC resistant strains

- Among the 39 top five STEC tested, 7 strains were resistant to one of the tested antibiotics (18%).
- As regards aEPEC, 8 of the 80 tested strains were resistant (10%).
- Among the 119 strains, only one was positive for the *intI* gene (0.8%).
- All the STEC strains were susceptible to azithromycin.

Table 1: Resistance profile of top five STEC and aEPEC strains isolated from bovine feces

Strain	Cattle category	Serotype	Presence of: <i>stx</i> (subtype)	<i>eae</i> (subtype)	Resistance phenotype ^a	Combination of resistance genes ^b	<i>intI</i> gene ^c
STEC							
C81	DC	O157:H7	+	(H7c)	AMC AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>intA</i> (A)- <i>suil</i>	-
H13	YB	O157:H7	+	(H7c)	TET	<i>intA</i> (A)	-
IS2	YB	O26:H11	+	(H11c)	STR TET SSS	<i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>intA</i> (A)- <i>suil</i>	-
K108	YB	O26:H11	+	(H11c)	AMP STR SSS	<i>bla</i> _{TEM} - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>suil</i>	-
L24	YB	O103:H2	+	(H2c)	AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>intA</i> (A)- <i>suil</i>	-
J43	DC	O111:H8	+	(H8c)	AMP STR TET SSS NAL	<i>bla</i> _{TEM} - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>intA</i> (A)- <i>suil</i>	-
K30	YB	O111:H8	+	(H8c)	AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>intA</i> (A)- <i>suil</i>	-
aEPEC							
A81	YB	O26:H11	-	(H11c)	AMC AMP STR TET SSS	<i>bla</i> _{TEM} - <i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>intA</i> (A)- <i>suil</i>	-
A85	YB	O26:H11	-	(H11c)	STR TET CHL SSS	<i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>flaR</i> - <i>suil</i>	-
A88	YB	O26:H11	-	(H11c)	STR TET CHL SSS	<i>strA</i> - <i>strB</i> - <i>flaR</i> - <i>suil</i>	-
A138	YB	O26:H11	-	(H11c)	TET	nd	-
A140	YB	O26:H11	-	(H11c)	TET	nd	-
H14	YB	O26:H11	-	(H11c)	TET	nd	-
H52	YB	O26:H11	-	(H11c)	STR TET CHL SSS	<i>zsdA1</i> - <i>intA</i> (A)- <i>cmfA</i> - <i>suil</i>	+
I79	YB	O26:H11	-	(H11c)	TET	nd	-

^a DC, Dairy cow; YB, Young beef bull; YD, Young dairy bull; B, present; -, absent; AMC, amoxicillin plus clavulanic acid; AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; NAL, nalidixic acid; SSS, sulfamonomide; STR, streptomycin; TET, tetracycline; nd, not determined

Result 2: *Stx* toxicity and adherence to HeLa cells: 7 resistant STEC versus 6 susceptible STEC

Graph 2: Cytotoxic activity in Vero cells

- The lowest levels of activity were observed for two STEC O157:H7 strains carrying the *stx*_{2c} subtype.
- There was no difference in Shiga toxin activity between resistant and susceptible STEC strains.

Figure 1: Fluorescent-Actin Staining test (HeLa cells)

All resistant and susceptible STEC strains were adherent to HeLa cells.

Conclusions

- The level of resistance of top five STEC and aEPEC isolated from slaughtered adult cattle in France was low.
- No STEC strain was resistant to azithromycin.
- Harboring resistance genes had no effect on Shiga toxin activity and adherence to HeLa cells.

Perspectives

- It should be interesting to investigate if the low level of resistance was specific or not to STEC and aEPEC strains among *E. coli* populations of the digestive tract.
- The low level of toxicity of two strains O157:H7, harboring the *stx*_{2c} subtype, should be investigated.

Contact: d.bibbal@envt.fr

Chapitre 9. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont permis d'évaluer la prévalence des souches d'*E. coli* entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques dans les effluents de station d'épuration d'abattoirs de bovins adultes et de veaux, mais aussi de mieux caractériser la résistance des STEC du top 5, souches hautement pathogènes, isolées de fèces de bovins adultes abattus en France.

9.1 Effluents de station d'épuration d'abattoirs de bovins adultes et de veaux : vecteurs d'*E. coli* entérohémorragiques et/ou antibiorésistants

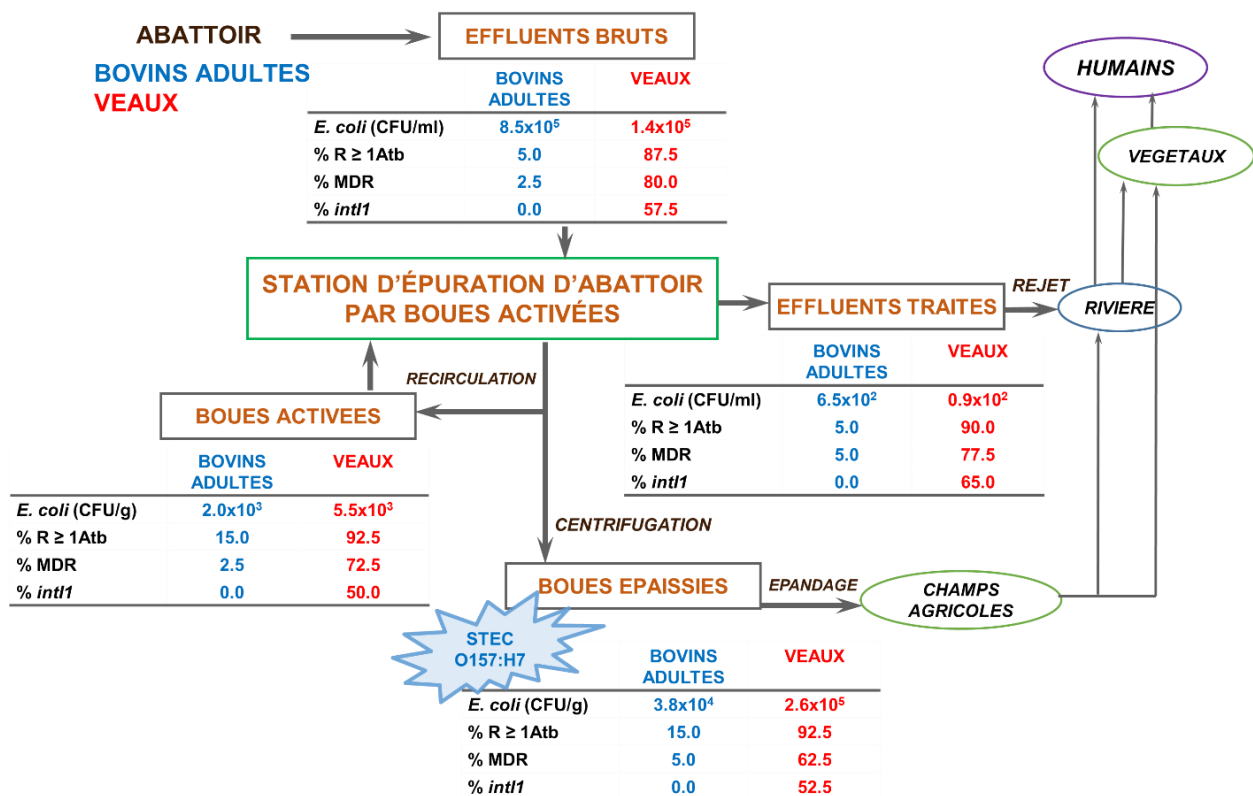


Figure 27. Incidence du nombre d'*E. coli* viables (CFU/ml ou CFU/g), pourcentages d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique (%R≥1Atb), résistantes à plus de 3 classes d'antibiotiques (%MDR) et porteuses d'intégron de classe 1 (%*int1*) dans les deux stations d'épuration d'abattoirs de bovins étudiées.

Le 1^{er} abattoir abattait uniquement que des bovins adultes (en bleu) et le second, exclusivement des veaux de boucherie (en rouge). Une STEC O157:H7 a été détectée dans les boues épaissies de la STEP d'abattoir de bovins adultes.

Notre étude a montré que les effluents d'abattoirs de veaux et de bovins adultes participent à la dissémination d'*E. coli* antibiorésistants et/ou pathogènes pour l'homme dans l'environnement. La Figure 27 résume l'ensemble des résultats relatifs à la caractérisation des effluents et des boues.

Une fréquence d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons plus élevée dans les effluents de la STEP d'abattoir de veaux

Nos études ont montré que les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de classe 1 étaient significativement plus élevés chez les souches isolées dans les effluents d'abattoir de veaux.

Les effluents de veaux de boucherie représenteraient donc un important réservoir de bactéries antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de résistance. Etant donné que l'exposition abusive et inappropriée aux antibiotiques est le facteur majeur de l'émergence de l'antibiorésistance dans cette catégorie de bovins, les méthodes de gestion au niveau des élevages de veaux de boucherie devraient être améliorées et l'usage des antibiotiques devrait être raisonné. Des propositions ont été faites dans la revue récente de Roca et de ses collaborateurs afin de limiter l'émergence et la dissémination de bactéries antibiorésistantes au niveau des élevages. Elles incluent notamment : (i) la limitation de l'usage des antibiotiques pour des fins non-thérapeutiques, (ii) l'amélioration des plans de biosécurité appliqués à la ferme, le développement de stratégies de traitement alternatifs et l'amélioration des pratiques d'hygiène, (iii) le développement des programmes de sensibilisation à destination des vétérinaires, des éleveurs, (iv) l'association entre les systèmes de surveillance de l'antibiorésistance chez les animaux et les humains (Roca et al., 2015).

De plus, les différences observées entre les effluents des 2 catégories de bovins impliquent différents risques pour la santé publique. Par conséquent, il serait intéressant de comparer ce résultat avec d'autres effluents de STEPs d'abattoirs spécialisés dans d'autres espèces, notamment les espèces qui sont connues comme des réservoirs importants d'IMs1 : les porcs (Sunde and Sorum, 1999; Agerso and Sandvang, 2005; Rao et al., 2008) et la volaille (Lee et al., 2002; Roe et al., 2003; Nandi et al., 2004; Yang et al., 2004), .

Pas d'impact du traitement épuratoire sur les pourcentages de souches *E. coli* productrices de shigatoxines et/ou résistantes aux antibiotiques

Notre étude montre également que les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes, porteuses d'*intI1* et/ou pathogènes, n'étaient pas significativement différentes quelle que soit l'étape du traitement épuratoire. Ces résultats indiquent que le traitement épuratoire n'a pas eu d'impact sur les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes, positives pour *intI1* et pathogènes.

Cependant, certaines études ont montré que le changement des conditions d'épuration dans les STEPs urbaines à base de boues activées pouvaient influencer l'impact du traitement épuratoire

sur les prévalences de bactéries antibiorésistantes (Mezrioui and Baleux, 1994; Guardabassi and Dalsgaard, 2002 ; Kim et al., 2007).

La revue de Bouki et ses collaborateurs sur la détection et le devenir des bactéries antibiorésistantes au niveau de STEPs urbaines indique que plusieurs études ont observé un effet sélectif du traitement épuratoire sur les bactéries résistantes (Bouki et al., 2013). Des hypothèses sur la présence de métabolites d'antibiotiques encore actifs (rejetés avec les eaux usées urbaines et hospitalières), qui favoriseraient la sélection des bactéries antibiorésistantes ou alors le transfert de la résistance entre bactéries dans les effluents de STEPs, reste encore à élucider.

Le traitement des effluents dans les STEPs n'est pas spécifiquement fait pour l'élimination des microorganismes pathogènes et/ou antibiorésistants, aussi la désinfection de l'effluent épuré avant rejet dans le milieu extérieur est-elle souvent appliquée dans certains pays comme l'étape finale de «nettoyage» des eaux usées des STEPs urbaines (NHMRC and NRMCC, 2004; Anastasi et al., 2013). D'où l'intérêt de vérifier l'impact d'autres modes de traitement épuratoire.

La chloration, les rayons ultraviolets et l'ozonation sont les trois traitements de désinfection les plus utilisés actuellement dans le monde (Koivunen and Heinonen-Tanski, 2005; Hijnen et al., 2006). Ils sont vus comme de possibles outils pour le contrôle de la dissémination de bactéries antibiorésistantes dans l'environnement, car ils peuvent réduire efficacement le nombre et les proportions de bactéries pathogènes et/ou antibiorésistantes (Guardabassi and Dalsgaard, 2002 ; Okoh et al., 2007).

Par conséquent, en prenant en compte les facteurs économiques, la nature des effluents (Lazarova et al., 1999), et leurs paramètres biochimiques (NHMRC and NRMCC, 2004; Spellman, 2008), mais aussi les types de microorganismes ciblés (Anastasi et al., 2013), des études ultérieures devraient être menées dans les STEPs d'abattoirs de bovins, pour mieux préciser les effets des technologies de désinfection et envisager la recommandation de leur usage comme possible solution (multifactorielle), de contrôle de la propagation de la résistance dans l'environnement.

Survie des souches d'*E. coli* productrices de shigatoxines et/ou résistantes dans l'environnement et contamination de l'homme ?

Les *E. coli* O157:H7 peuvent survivre 2 semaines à 10 mois dans les environnements aquatiques (Chekabab et al., 2013). Une étude sur des STEC O157:H7 a indiqué des temps de survie de 70 à 266 jours après épandage de fumier sur les parcours agricoles (Franz et al., 2011).

En ce qui concerne les bactéries résistantes, l'étude de Leclercq *et al.*, au niveau du continuum d'une rivière recevant les effluents liquides traités d'une STEP hospitalière, a montré que les proportions d'isolats d'*E. faecium* CC17 multirésistants préalablement dominants dans les eaux traitées diminuaient le long du continuum, au profit de sous populations plus diverses de la même espèce, qui étaient moins résistantes (Leclercq et al., 2013b).

Pour les effluents solides, Marti et ses collaborateurs qui ont évalué l'impact sur l'antibiorésistance de l'épandage du fumier de bovins laitiers sur des sols amendés ou non et sur les végétaux qui y sont cultivés, ont observé que l'épandage augmentait l'abondance de bactéries antibiorésistantes, et certains gènes et plasmides de résistance (*tet(B)*, *qnr*, IncP) spécifiques n'étaient présents qu'au niveau des végétaux récoltés sur les sols amendés (Marti et al., 2013).

Ces éléments mettent en évidence que les souches d'*E. coli* productrices de shigatoxines et/ou résistantes aux antibiotiques disséminées dans l'environnement peuvent survivre et potentiellement être à l'origine de la contamination de l'homme.

Cette contamination peut avoir lieu lors d'un contact direct avec l'environnement contaminé. En effet, plusieurs études ont rapporté des cas de contamination humaine à STEC suite à des baignades dans des cours d'eau, eaux récréatives contaminées ou même eaux de boisson (Caprioli et al., 2005; Soller et al., 2010).

Par ailleurs, la contamination de l'homme peut éventuellement avoir lieu lors de la consommation d'aliments contaminés par l'environnement.

De plus en plus d'études rapportent des épidémies associées à la consommation de produits végétaux contaminés par les STEC (comme signalé dans le chapitre 5) d'une part, et plusieurs autres ont rapporté la présence de bactéries antibiorésistantes dans les végétaux frais et à la vente au détail, d'autre part (Boehme et al., 2004; Rodriguez et al., 2006; Bezanson et al., 2008; Ruimy et al., 2010; Hassan et al., 2011; Raphael et al., 2011; Schwaiger et al., 2011; Walia et al., 2013).

Par conséquent, une caractérisation plus fine de la présence et du devenir des *E. coli* hautement pathogènes et/ou antibiorésistantes dans un milieu récepteur en amont et en aval du rejet des effluents liquides traités des STEPs d'abattoirs de bovins (à l'image de l'étude de Leclercq *et al.*) permettrait, *in fine*, de mieux préciser le risque de transmission à l'homme *via* l'exposition à ces milieux environnementaux contaminés.

Il serait également nécessaire de mener des études sur les temps de survie de ces souches dans les environnements récepteurs (cours d'eau, sols amendés) et sur les cultures agricoles irriguées.

Transfert de gènes de résistance et/ou de virulence dans les STEP et dans l'environnement

-Transfert des gènes de résistance au niveau des STEPs et dans l'environnement

Notre étude a montré, dans les effluents d'abattoir de veaux, que les *E. coli* porteuses d'intégrons de classe 1 étaient associées à la multirésistance. Ceci montre que les IM1s sont de bons indicateurs de la dissémination de l'antibiorésistance. Certaines études ont rapporté que les conditions environnementales dans les STEPs pouvaient augmenter les probabilités de transfert de gènes de résistance (Mach and Grimes, 1982; Kruse and Sorum, 1994; Pote et al., 2003; Davies, 2012). Il serait important d'évaluer ces probabilités de THG dans les STEPs d'abattoirs de bovins étudiés.

De plus, vu que l'environnement est un « hot spot » de THG (voir chapitre 4), il serait également intéressant d'étudier les possibilités d'échange de gènes de résistance ou d'éléments génétiques mobiles entre les *E. coli* résistantes et porteuses d'intégrons et les bactéries natives dans les environnements récepteurs afin de mieux préciser le risque de dissémination environnementale de la résistance.

Pour vérifier les probabilités de THG dans les STEPs, mais aussi dans les environnements récepteurs, des études de conjugaison peuvent être envisagées (Rizzo et al., 2013) dans les effluents liquides et boues de STEPs des abattoirs de bovins, et dans les matrices environnementales complexes (sol, milieu aquatique récepteur), soit par conjugaison basée sur les cultures bactériennes, soit par conjugaison basée sur la fluorescence ou encore par conjugaison basée sur des techniques de biologie moléculaire (qPCR).

-Transfert des gènes *stx* dans l'environnement

Etant donné que la transmission de gènes *stx* par les phages-Stx a été montrée au sein des populations d'*E. coli* à la suite d'un phénomène d'induction *in vitro* (Imamovic et al., 2009), il serait intéressant d'étudier la transmission du phage-Stx de la souche STEC O157:H7 au sein de la population d'*E. coli* ou à d'autres bactéries, après l'épandage des boues épaissies de STEP d'abattoir de bovins sur les sols agricoles. Notamment, à *Citrobacter freundii* qui est une entérobactérie productrice de Stxs (Tschape et al., 1995; Bai et al., 2012); elle est fréquemment retrouvée dans les échantillons de sol et est responsable d'infections opportunistes chez l'homme.

9.2 Résistance des souches STEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes à l'abattoir et comparaison avec les *E. coli* non-STECS et aEPEC du top 5 isolées chez les mêmes bovins

Nous avons montré que le pourcentage de résistance chez les STEC du top 5 et aEPEC considérées comme hautement pathogènes pour l'homme était faible (<18%). Toutes ces souches étaient sensibles à l'azithromycine. En revanche, les pourcentages de résistance des aEPEC et STEC du top 5 étaient significativement élevés comparativement aux *E. coli* non-STECS et aEPEC du top 5 isolées de la flore fécale commensale des mêmes bovins adultes. Enfin, pour quatre STEC du top 5 résistantes, les gènes de résistance *bla*_{TEM}, *strA-strB*, *tet(A)* et *sulIII* étaient localisés sur un grand plasmide, qui était probablement le plasmide de virulence des EHEC. La figure 28 présente l'ensemble des données relatives à la résistance des souches STEC du top 5 isolées de fèces de bovins adultes à l'abattoir, la comparaison de leur résistance avec les *E. coli* non-STECS et aEPEC du top 5 ainsi que la localisation des gènes majoritaires de résistance sur le plasmide de virulence des EHEC.

Risque d'expansion clonale des souches STEC du top 5 isolées de bovins adultes

Certaines études ont indiqué que l'association génétique de la résistance et la virulence serait un nouvel outil, dans l'évolution des bactéries pathogènes, leur permettant de mettre en place de nouvelles stratégies pour coloniser de nouvelles niches (Martinez and Baquero, 2002; Carattoli, 2009). Cette association génétique a été clairement montrée comme présentant un important bénéfice pour certaines souches d'*E. coli* chez l'homme et chez le porc, notamment pour les ExPEC multirésistantes épidémiques (Da Silva and Mendonca, 2012; Wyrsh et al., 2016).

En présence de traitement antibiotique, les germes pathogènes résistants sont rapidement sélectionnés (Beceiro et al., 2013), ainsi les clones épidémiques résistants peuvent devenir prédominants. L'exemple le plus connu est celui du clone épidémique résistant ExPEC O25:H4-ST131 qui est devenu international. Il possède un plasmide (pEK499) arborant simultanément des gènes *bla*_{CTX-M} et des gènes de virulence (Woodford et al., 2009).

Par conséquent, il serait intéressant d'étudier le risque pour la santé publique de l'expansion clonale des STEC du top 5 multirésistantes au niveau des élevages bovins et leurs environnements, qui pourrait être augmenté par des traitements antibiotiques chez les bovins porteurs de telles souches pathogènes.

Pour atteindre cet objectif (exploration de l'expansion clonale), une première piste d'étude simple et peu fastidieuse serait de déterminer s'il existe des similarités ou différences entre les Replicon Types (RT) des 4 plasmides EHEC multirésistants, via le « screening » par PCR des réplicons types, appelé PBRT (PCR-based replicon typing), des principales familles plasmidiques connues des entérobactéries (A/C, II, FIA, FIB, B/O, etc.) (Novick, 1987; Carattoli et al., 2005). Pour rappel, des plasmides incompatibles partagent les mêmes contrôles de réplication appelés « replicon type » ; ce sont des facteurs stables et constants pour le maintien du plasmide dans la bactérie (DeNap and Hergenrother, 2005).

Le séquençage des ADNs entiers des plasmides est une autre méthode à envisager pour explorer l'expansion clonale. Elle est plus précise et permettrait l'identification de nouvelles familles de plasmides, car certains plasmides demeurent non typables. A ce jour, les séquences entières de plus de 800 plasmides détectés au niveau du phylum des *Gammaproteobacteria* (dont *E. coli* est une espèce majoritaire) sont déjà disponibles (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) (Carattoli, 2009) ; certaines pourraient être utilisées comme des séquences de références pour l'annotation et l'assemblage.

Par ailleurs, le séquençage a permis à Venturini et ses collaborateurs de mettre en évidence la présence de copies identiques du transposon *Tn21* retrouvées au niveau de deux autres plasmides de résistance. Le premier était le plasmide de résistance pO26-CRL₁₂₅ présent dans la même souche clinique EHEC O26:H- multirésistante et le 2^{ème} était le pO111-CRL₁₁₅ extrait d'une souche aEPEC O111 multirésistante d'origine bovine (Venturini et al., 2013). D'où la nécessité de comparer les séquences complètes des plasmides de virulence multirésistants dans nos 4 souches STEC du top 5 multirésistants avec des séquences référencées de plasmides de virulence multirésistants présents dans des souches EHEC isolées de patients, afin de mieux préciser le risque de dissémination de l'antibiorésistance des bovins à l'homme et vice-versa au vu des relations épidémiologiques qui existent (Concept « One Health »).

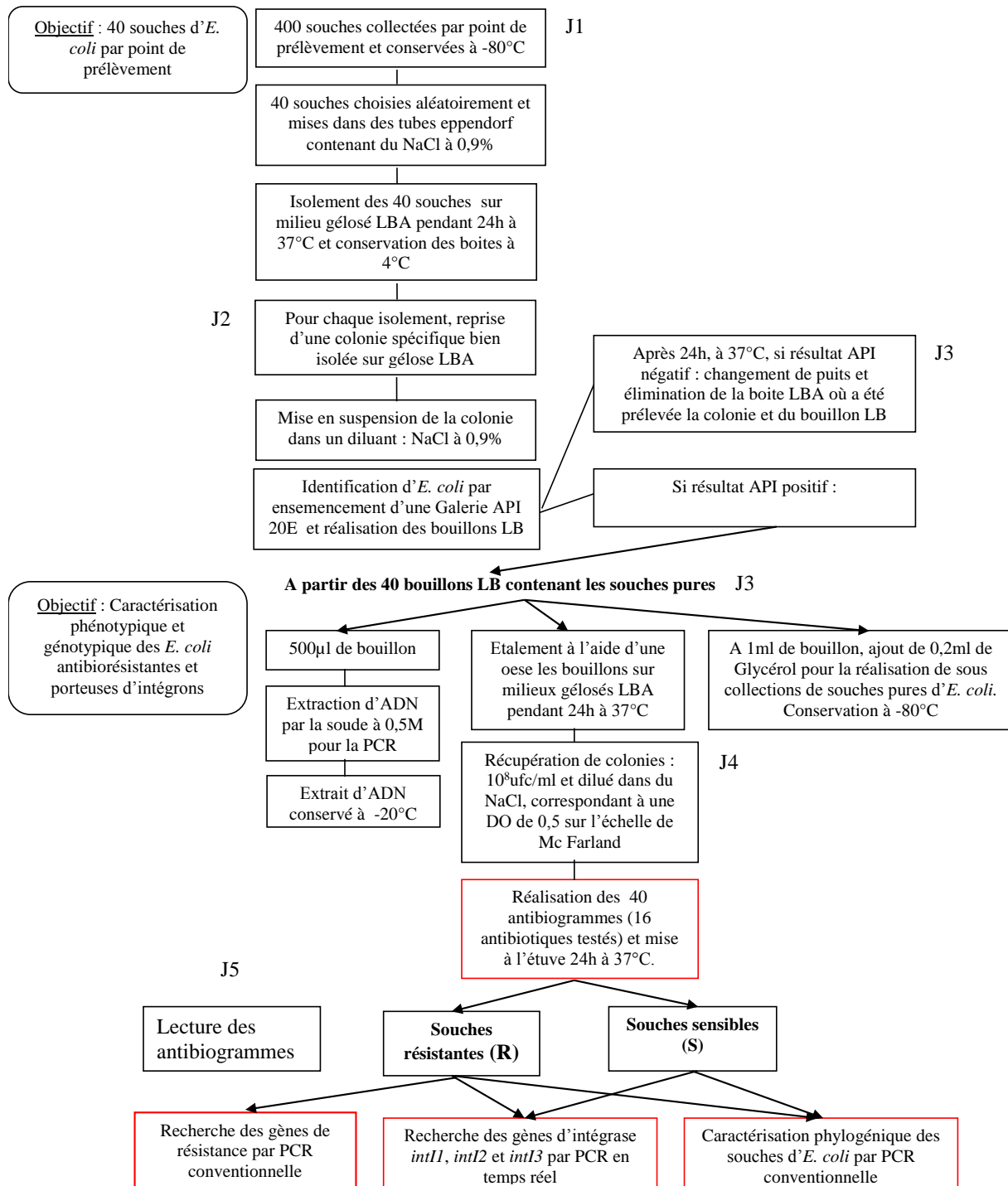
Capacité de conjugaison du plasmide multirésistant des EHEC

Il est important de noter que le plasmide de virulence de l'EHEC O157:H7 décrit par Makino et ses collaborateurs (voir chapitre 1), possédait une région quasiment homologue à la séquence du plasmide de résistance transmissible R100 (Makino et al., 1998). Cette région code et contrôle le transfert de l'ADN plasmidique par conjugaison. Elle a été bien décrite pour le système de conjugaison du plasmide F et contient 40 gènes arrangés en file. Kim et ses collaborateurs ont montré que les gènes *traB* et *traC* étaient des composants essentiels de cette région pour le transfert par conjugaison dans le plasmide IncII R64drd-11, au sein de milieux liquide et sur une surface solide (Kim et al., 1993). Par ailleurs, le gène *traC* était également présent au niveau du plasmide de virulence pO26-CRL₁₁₁ multirésistant de la souche EHEC O26:H- clinique décrite par Venturini et ses collaborateurs. L'insertion du transposon *Tn21* sur le pO26-CRL₁₁₁ à l'intérieur du gène *traC* l'avait rendu non-transférable, mais la transférabilité du pO26-CRL₁₁₁ avait été rétablie après complémentation avec un plasmide contenant des gènes *tra* fonctionnels (« *conjugative helper* ») (Venturini et al., 2010).

Par conséquent, pour préciser le risque pour la santé publique lié à la dissémination des plasmides de virulence des EHEC multirésistants au sein de la population d'*E. coli*, il serait intéressant d'étudier les possibilités de conjugaison de ces plasmides en utilisant une souche réceptrice, un transformant TOP 10 comme souche donneuse, et si nécessaire (au cas où la région de transfert serait tronquée), une souche contenant un plasmide avec des gènes *tra* fonctionnels.

Au début de cette thèse, dans le cadre de l'analyse des impacts environnementaux des effluents de la filière viande, nous voulions préciser la contamination des effluents d'origine bovine par des souches d'E. coli entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes. Le travail de ces 3 années de thèse est une première contribution à cette problématique ; il indique que les effluents d'origine bovine, semblent être des contributeurs potentiels de dissémination environnementale d'E. coli entérohémorragiques et/ou antibiorésistantes. Plus précisément, les effluents et boues de station d'épuration d'abattoirs de bovins adultes d'une part et de veaux d'autre part contiennent des souches STEC hautement pathogènes pour l'homme et des E. coli antibiorésistantes à la fin des traitements épuratoires. Néanmoins, les risques pour la santé publique sont différents selon la catégorie de bovins abattus. Il apparaît aussi que les fèces de bovins adultes soient une source de STEC du top 5 multirésistantes. Les perspectives d'études proposées ci-dessus pourraient permettre d'apporter des données complémentaires à l'analyse des impacts environnementaux des effluents de la filière viande bovine en terme de santé publique.

ANNEXE DE LA PARTIE 7.1 Démarche expérimentale pour la caractérisation phénotypique et génotypique des *E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de résistance



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (Total de références=446)

- Aarestrup, F.M. (2006). The origin, evolution, and local and global dissemination of antimicrobial resistance. In: *Aarestrup FM (ed) Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Washington, DC: ASM Press, pp. 339–359.*
- ADEME (2012). (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) Méthanisation à la ferme. *Disponible sur* : http://www.ademe.fr/bretagne/actions_phares/dechets_agriculture/media/methanisation/laferme_plaquette.pdf (consulté le 20/12/2012).
- AFSSA (2008). (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). Avis du 15 Juillet 2008 relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme.
- Agerso, Y., and Sandvang, D. (2005). Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in alcaligenes, arthrobacter, and Pseudomonas spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl Environ Microbiol* 71(12), 7941-7947. doi: 10.1128/AEM.71.12.7941-7947.2005.
- Agger, M., Scheutz, F., Villumsen, S., Molbak, K., and Petersen, A.M. (2015). Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: a systematic review and a proposal. *J Antimicrob Chemother* 70(9), 2440-2446. doi: 10.1093/jac/dkv162.
- Ahmed, A.M., Nakano, H., and Shimamoto, T. (2005). Molecular characterization of integrons in non-typhoid Salmonella serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J Antimicrob Chemother* 55(3), 371-374. doi: 10.1093/jac/dkh534.
- Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S., and Fukushima, T. (1960). On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Jpn J Microbiol* 4, 219-227.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59(1), 143-169.
- Aminov, R.I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* 2, 158. doi: 10.3389/fmicb.2011.00158.
- Amorosi, E.L., and Uhlmann, J.E. (1966). Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Medicine* 45, 139-159.
- Amos, G.C., Gozzard, E., Carter, C.E., Mead, A., Bowes, M.J., Hawkey, P.M., et al. (2015). Validated predictive modelling of the environmental resistome. *ISME J*. doi: 10.1038/ismej.2014.237.
- Anastasi, E.M., Wohlsen, T.D., Stratton, H.M., and Katouli, M. (2013). Survival of *Escherichia coli* in two sewage treatment plants using UV irradiation and chlorination for disinfection. *Water Res* 47(17), 6670-6679. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.008.
- Andersson, D.I., and Hughes, D. (1996). Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2), 906-907.
- Andreoli, S.P., Trachtman, H., Acheson, D.W., Siegler, R.L., and Obrig, T.G. (2002). Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol* 17(4), 293-298. doi: 10.1007/s00467-001-0783-0.
- ANSES (2010). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety. Opinion of the French Food Safety Agency on the advisability of revising the definition of pathogenic STEC, specified in AFSSA's Opinion of 15 July 2008. Anses. Maisons-Alfort. France.
- ANSES (2013). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety. Sales Survey of Veterinary Medicinal Products Containing Antimicrobials in France. *Maisons-Alfort. France.*
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., et al. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob Agents Chemother* 39(7), 1612-1615.
- Arvand, M., Bettge-Weller, G., Fruth, A., Uphoff, H., and Pfeifer, Y. (2015). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (*stxI*)-positive *Escherichia coli* O91:H14 carrying *bla_{CTX-M-15}* on an IncII-ST31 plasmid isolated from a human patient in Germany. *Int J Med Microbiol* 305(3), 404-407. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.03.003.
- Ashbolt, N.J., Amezcua, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K.K., Collignon, P., et al. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect* 121(9), 993-1001. doi: 10.1289/ehp.1206316.

- Auvray, F., Lecureuil, C., Tache, J., Leclerc, V., Deperrois, V., and Lombard, B. (2007). Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Lett Appl Microbiol* 45(6), 646-651. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02239.x.
- Ayaz, N.D., Gencay, Y.E., and Erol, I. (2014). Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7(+)/H7(-) isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. *Int J Food Microbiol* 174, 31-38. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.002.
- Ayaz, N.D., Gencay, Y.E., and Erol, I. (2015). Phenotypic and genotypic antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* O157 from cattle and slaughterhouse wastewater isolates. *Annals of Microbiology* 65(2), 1137-1144. doi: 10.1007/s13213-014-0961-5.
- Bai, L., Xia, S., Lan, R., Liu, L., Ye, C., Wang, Y., et al. (2012). Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. *PLoS One* 7(3), e33054. doi: 10.1371/journal.pone.0033054.
- Baldy-Chudzick, K., Mackiewicz, P., and Stosik, M. (2008). Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Vet Microbiol* 131(1-2), 173-184. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.019.
- Balestracci, A., Martin, S.M., Toledo, I., Alvarado, C., and Wainsztein, R.E. (2012). Dehydration at admission increased the need for dialysis in hemolytic uremic syndrome children. *Pediatr Nephrol* 27(8), 1407-1410. doi: 10.1007/s00467-012-2158-0.
- Barlow, R.S., Fegan, N., and Gobius, K.S. (2009). Integron-containing bacteria in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 107(2), 540-545. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04240.x.
- Barlow, R.S., and Gobius, K.S. (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J Antimicrob Chemother* 58(6), 1133-1138. doi: 10.1093/jac/dkl423.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., and Ploy, M.C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother* 65(8), 1642-1645. doi: 10.1093/jac/dkq167.
- Barraud, O., and Ploy, M.C. (2011). Antibiotic resistant integrons: State of the art. *Journal Des Anti-Infectieux* 13(3), 133-144. doi: 10.1016/j.antinf.2011.03.001.
- Bauer, M.E., and Welch, R.A. (1996). Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 64(1), 167-175.
- Beceiro, A., Tomas, M., and Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* 26(2), 185-230. doi: 10.1128/CMR.00059-12.
- Beier, R.C., Poole, T.L., Brichta-Harhay, D.M., Anderson, R.C., Bischoff, K.M., Hernandez, C.A., et al. (2013). Disinfectant and antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* O157:H7 strains from cattle carcasses, feces, and hides and ground beef from the United States. *J Food Prot* 76(1), 6-17. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-253.
- Bell, R.B. (1978). Antibiotic resistance patterns of fecal coliforms isolated from domestic sewage before and after treatment in an aerobic lagoon. *Can J Microbiol* 24(7), 886-888.
- Bennani, M., Badri, S., Baibai, T., Oubrim, N., Hassar, M., Cohen, N., et al. (2011). First detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and coastal environments of Morocco. *Appl Biochem Biotechnol* 165(1), 290-299. doi: 10.1007/s12010-011-9251-x.
- Bennett, P.M. (2005). Genome plasticity. . In: Woodford N, Johnson A (eds). *Methods in Molecular Biology, Vol 266, Genomics, Proteomics and Clinical Bacteriology*. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, pp 71-113.
- Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S347-357. doi: 10.1038/sj.bjp.0707607.
- Bertin, Y., Boukhors, K., Livrelli, V., and Martin, C. (2004). Localization of the insertion site and pathotype determination of the locus of enterocyte effacement of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 70(1), 61-68.

- Bettelheim, K.A. (1998a). Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. *J Appl Microbiol* 85(3), 425-428.
- Bettelheim, K.A. (1998b). Studies of *Escherichia coli* cultured on Rainbow Agar O157 with particular reference to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Microbiol Immunol* 42(4), 265-269.
- Bettelheim, K.A. (2005). Reliability of O157:H7 ID agar (O157 H7 ID-F) for the detection and isolation of verocytotoxigenic strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157. *J Appl Microbiol* 99(2), 408-410. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02603.x.
- Bettelheim, K.A., Hornitzky, M.A., Djordjevic, S.P., and Kuzevski, A. (2003). Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. *J Med Microbiol* 52(Pt 2), 155-162. doi: 10.1099/jmm.0.04903-0.
- Betteridge, T., Partridge, S.R., Iredell, J.R., and Stokes, H.W. (2011). Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother* 55(8), 3939-3943. doi: 10.1128/AAC.01831-10.
- Beutin, L., Aleksic, S., Zimmermann, S., and Gleier, K. (1994). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med Microbiol Immunol* 183(1), 13-21.
- Bezanson, G.S., MacInnis, R., Potter, G., and Hughes, T. (2008). Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *Int J Food Microbiol* 127(1-2), 37-42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.008.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Prere, M.F., Toutain, P.L., and Bousquet-Melou, A. (2009a). Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Appl Environ Microbiol* 75(10), 2999-3006.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Prère, M.F., Toutain, P.L., and Bousquet-Mélou, A. (2009b). Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10), 2999-3006.
- Bibbal, D., Kerouredan, M., Loukiadis, E., Scheutz, F., Oswald, E., and Brugere, H. (2014a). Slaughterhouse effluent discharges into rivers not responsible for environmental occurrence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 168(2-4), 451-454.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kerouredan, M., Ferre, F., Dilasser, F., Peytavin de Garam, C., et al. (2015). Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol* 81(4), 1397-1405. doi: 10.1128/AEM.03315-14.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kerouredan, M., Peytavin de Garam, C., Ferre, F., Cartier, P., et al. (2014b). Intimin gene (*eae*) subtype-based real-time PCR strategy for specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in cattle feces. *Appl Environ Microbiol* 80(3), 1177-1184. doi: 10.1128/AEM.03161-13.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R., and Karch, H. (2006). Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* 43(9), 1160-1167. doi: 10.1086/508195.
- Bielaszewska, M., Prager, R., Kock, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschape, H., et al. (2007). Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* 73(10), 3144-3150. doi: 10.1128/AEM.02937-06.
- Biskri, L., and Mazel, D. (2003). Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 47(10), 3326-3331.
- Biswal, B.K., Mazza, A., Masson, L., Gehr, R., and Frigon, D. (2014). Impact of wastewater treatment processes on antimicrobial resistance genes and their co-occurrence with virulence genes in *Escherichia coli*. *Water Res* 50, 245-253. doi: 10.1016/j.watres.2013.11.047.
- Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J.E., Dahbi, G., 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, 23. doi: 10.1186/1471-2180-5-23.
- Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R., and Witte, W. (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Mol Nutr Food Res* 48(7), 522-531. doi: 10.1002/mnfr.200400030.

- Boerlin, P., and Reid-Smith, R.J. (2008). Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Anim Health Res Rev* 9(2), 115-126. doi: 10.1017/S146625230800159X.
- Bosman, A.B., Wagenaar, J.A., Stegeman, J.A., Vernooij, J.C., and Mevius, D.J. (2014). Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* in veal calves is associated with antimicrobial drug use. *Epidemiol Infect* 142(9), 1893-1904. doi: 10.1017/S0950268813002665.
- Bottger, E.C., Springer, B., Pletschette, M., and Sander, P. (1998). Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. *Nat Med* 4(12), 1343-1344. doi: 10.1038/3906.
- Bouchardon, A., Brisabois, A., Chaslus-Dancla, E., Colin, P., Dabernat, H., Guillemot, D., et al. (2006). Section III. Diffusion de la résistance à l'Homme et conséquences pour la santé publique. In *Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine*, AFSSA, 2006.
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E., and Stokes, H.W. (2007). Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in Microbiology* 15(7), 301-309. doi: 10.1016/j.tim.2007.05.004.
- Bouki, C., Venieri, D., and Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 91, 1-9.
- Boumghar-Bourtchai, L., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E., Filliol, I., Dhalluin, A., Ifrane, S.A., et al. (2008). Macrolide-resistant *Shigella sonnei*. *Emerg Infect Dis* 14(8), 1297-1299. doi: 10.3201/eid1408.080147.
- Bouvet, J., Livrelli, V., Mariani-Kurkdjian, P., and Oswald, E. (2003). Pathologie humaine et animale liée aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) In AFSSA (ed.), *Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC)*. AFSSA:29-39.
- Brandt, J.R., Fouser, L.S., Watkins, S.L., Zelikovic, I., Tarr, P.I., Nazar-Stewart, V., et al. (1994). *Escherichia coli* O 157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. *J Pediatr* 125(4), 519-526.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., Garcia, M., et al. (2003). Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 47(6), 2056-2058.
- Brophy, P.O., Caffrey, P.J., and Collins, J.D. (1977). Sensitivity patterns of *Escherichia coli* isolated from calves during and following prophylactic chlortetracycline therapy. *Br Vet J* 133(4), 340-345.
- Brugère, H., Auvray, F., Mariani-Kurkdjian, P., King, L.A., and Loukiadis, E. (2012). *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC): définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *BEH Hors-série : Numéro thématique – Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale: surveillance et évaluation*. InVS, 9 Mai 2012, 52p.
- Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., and Karch, H. (1999). The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 145 (Pt 5), 1005-1014. doi: 10.1099/13500872-145-5-1005.
- Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H. (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142 (Pt 11), 3305-3315. doi: 10.1099/13500872-142-11-3305.
- Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H. (1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24(4), 767-778.
- Bugarel, M., Beutin, L., and Fach, P. (2010). Low-density microarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (nle genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): a new approach for molecular risk assessment of STEC isolates. *Appl Environ Microbiol* 76(1), 203-211. doi: 10.1128/AEM.01921-09.
- Burk, C., Dietrich, R., Acar, G., Moravek, M., Bulte, M., and Martlbauer, E. (2003). Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* 41(5), 2106-2112.

- Burland, V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Sofia, H.J., and Blattner, F.R. (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26(18), 4196-4204.
- Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Zhang, L., Kay, P., Boxall, A., Hawkey, P.M., et al. (2011). Integron prevalence and diversity in manured soil. *Appl Environ Microbiol* 77(2), 684-687. doi: 10.1128/AEM.01425-10.
- CA-SFM/EUCAST (2014). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2014. V.2.0 Décembre 2014, Paris, France.
- Cabal, A., Gomez-Barrero, S., Porrero, C., Barcena, C., Lopez, G., Canton, R., et al. (2013). Assessment of virulence factors characteristic of human *Escherichia coli* pathotypes and antimicrobial resistance in O157:H7 and non-O157:H7 isolates from livestock in Spain. *Appl Environ Microbiol* 79(13), 4170-4172. doi: 10.1128/AEM.00537-13.
- Cambray, G., Guerout, A.M., and Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu Rev Genet* 44, 141-166. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163504.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., and Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 36(3), 289-311. doi: 10.1051/vetres:2005002.
- Caprioli, A., Scavia, G., and Morabito, S. (2014). Public Health Microbiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0014-2013.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53(6), 2227-2238. doi: 10.1128/AAC.01707-08.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., and Threlfall, E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63(3), 219-228. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- Carattoli, A., Miriagou, V., Bertini, A., Loli, A., Colinon, C., Villa, L., et al. (2006). Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis* 12(7), 1145-1148. doi: 10.3201/eid1207.051555.
- Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C., Hachich, E.M., Sato, M.I., Gomes, T.A., et al. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol* 10, 161. doi: 10.1186/1471-2180-10-161.
- Casadewall, B., and Courvalin, P. (1999). Characterization of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J Bacteriol* 181(12), 3644-3648.
- CDC (1999). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair-New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48(36), 803-805.
- Cergole-Novella, M.C., Pignatari, A.C., Castanheira, M., and Guth, B.E. (2011). Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Res Microbiol* 162(2), 117-123. doi: 10.1016/j.resmic.2010.09.022.
- Chalmers, R.M., Salmon, R.L., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Looker, N., Davies, I., et al. (1997). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. *Lancet* 349(9068), 1816.
- Chapman, P.A., and Siddons, C.A. (1996). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from cases of bloody diarrhoea, non-bloody diarrhoea and asymptomatic contacts. *J Med Microbiol* 44(4), 267-271. doi: 10.1099/00222615-44-4-267.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Zadik, P.M., and Jewes, L. (1991). An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 35(2), 107-110. doi: 10.1099/00222615-35-2-107.
- Chapman, P.A., Wright, D.J., and Siddons, C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J Med Microbiol* 40(6), 424-427. doi: 10.1099/00222615-40-6-424.
- Chaslus-Dancla, E., Martel, J.L., Carlier, C., Lafont, J.P., and Courvalin, P. (1986). Emergence of aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France. *Antimicrob Agents Chemother* 29(2), 239-243.

- Chaslus-Dancla, E., Pohl, P., Meurisse, M., Marin, M., and Lafont, J.P. (1991). High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 35(3), 590-593.
- Chekabab, S.M., Paquin-Veillette, J., Dozois, C.M., and Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 341(1), 1-12. doi: 10.1111/1574-6968.12078.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M. (2012). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep* 5(1), 58-65.
- CLSI (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals-third edition. Document M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
- CLSI (2009a). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-tenth edition. CLSI document M02-A10. CLSI, Wayne, PA.
- CLSI (2009b). Performance standards for antimicrobial testing ; 19th informational supplement. Document M100-S19. CLSI, Wayne, PA.
- Coia, J.E., Sharp, J.C., Campbell, D.M., Curnow, J., and Ramsay, C.N. (1998). Environmental risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157 infection in Scotland: results of a descriptive epidemiology study. *J Infect* 36(3), 317-321.
- Collis, C.M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H.W., and Hall, R.M. (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* 9(1), 41-52.
- Collis, C.M., and Hall, R.M. (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* 6(19), 2875-2885.
- Collis, C.M., and Hall, R.M. (2004). Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. *Microbiology* 150(Pt 5), 1591-1601. doi: 10.1099/mic.0.26596-0.
- Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., and Karmali, M.A. (2008). Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 74(7), 2153-2160. doi: 10.1128/AEM.02566-07.
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., et al. (2003). Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(9), 2838-2843.
- Craig, N.L. (1997). Target site selection in transposition. *Annu Rev Biochem* 66, 437-474. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.437.
- da Costa, P.M., Vaz-Pires, P., and Bernardo, F. (2008). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated in wastewater and sludge from poultry slaughterhouse wastewater plants. *J Environ Health* 70(7), 40-45, 51, 53.
- Da Silva, G.J., and Mendonca, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* 3(1), 18-28. doi: 10.4161/viru.3.1.18382.
- Daikos, G.L., Kosmidis, C., Tassios, P.T., Petrikkos, G., Vasilakopoulou, A., Psychogiou, M., et al. (2007). *Enterobacteriaceae* bloodstream infections: presence of integrons, risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 51(7), 2366-2372. doi: 10.1128/AAC.00044-07.
- Davies, J. (2007). Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep* 8(7), 616-621. doi: 10.1038/sj.embor.7401022.
- Davies, J. (2012). Sanitation: Sewage recycles antibiotic resistance. *Nature* 487(7407), 302. doi: 10.1038/487302e.
- Davis, T.K., Van De Kar, N.C., and Tarr, P.I. (2014). Shiga Toxin/Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections: Practical Clinical Perspectives. *Microbiol Spectr* 2(4), EHEC-0025-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0025-2014.
- Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B., et al. (2000). Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. The Societe de Nephrologie Pediatrique. *Epidemiol Infect* 124(2), 215-220.

- DeFrancesco, K.A., Cobbold, R.N., Rice, D.H., Besser, T.E., and Hancock, D.D. (2004). Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Vet Microbiol* 98(1), 55-61.
- Delahay, R.M., Frankel, G., and Knutton, S. (2001). Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Curr Opin Infect Dis* 14(5), 559-565.
- DeNap, J.C., and Hergenrother, P.J. (2005). Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Org Biomol Chem* 3(6), 959-966. doi: 10.1039/b500182j.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vazquez, A., et al. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10), 3597-3602. doi: 10.1073/pnas.0400326101.
- Denno, D.M., Shaikh, N., Stapp, J.R., Qin, X., Hutter, C.M., Hoffman, V., et al. (2012). Diarrhea etiology in a pediatric emergency department: a case control study. *Clin Infect Dis* 55(7), 897-904. doi: 10.1093/cid/cis553.
- Di Labio, E., Regula, G., Steiner, A., Miserez, R., Thomann, A., and Ledergerber, U. (2007). Antimicrobial resistance in bacteria from Swiss veal calves at slaughter. *Zoonoses Public Health* 54(9-10), 344-352.
- Djordjevic, S.P., Stokes, H.W., and Roy Chowdhury, P. (2013). Mobile elements, zoonotic pathogens and commensal bacteria: conduits for the delivery of resistance genes into humans, production animals and soil microbiota. *Front Microbiol* 4, 86. doi: 10.3389/fmicb.2013.00086.
- Doane, C.A., Pangloli, P., Richards, H.A., Mount, J.R., Golden, D.A., and Draughon, F.A. (2007). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse farm environments. *J Food Prot* 70(1), 6-10.
- Dolislager, D., and Tune, B. (1978). The hemolytic-uremic syndrome: spectrum of severity and significance of prodrome. *Am J Dis Child* 132(1), 55-58.
- Du, X., Shen, Z., Wu, B., Xia, S., and Shen, J. (2005). Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 245(2), 295-298. doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.021.
- Durso, L.M., and Keen, J.E. (2007). Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 and non-Shiga-toxigenic *E. coli* O157 respond differently to culture and isolation from naturally contaminated bovine faeces. *J Appl Microbiol* 103(6), 2457-2464. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03473.x.
- Ebner, P., Garner, K., and Mathew, A. (2004). Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SGII in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. *J Antimicrob Chemother* 53(6), 1004-1009. doi: 10.1093/jac/dkh192.
- Eckert, C., Gautier, V., Saladin-Allard, M., Hidri, N., Verdet, C., Ould-Hocine, Z., et al. (2004). Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 48(4), 1249-1255.
- EFSA (2009). (European Food Safety Authority). Scientific Report of EFSA on technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). *EFSA Journal* 2009;7(11):1366, 43 pp. doi:10.2903/j.efsa.2009.1366.
- EFSA (2015). EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(2):4036.
- EFSA, and ECDC (2013). (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013;11(4):3129, 250 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- EFSA, and ECDC (2015). (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015; 13(1):3991.
- EFSA, and ECDC (2016). (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in

- zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal* 2016;14(2):4380.
- Eklund, M., Leino, K., and Siitonen, A. (2002). Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *J Clin Microbiol* 40(12), 4585-4593.
- Ennis, C., McDowell, D., and Bolton, D.J. (2012). The prevalence, distribution and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes and virulotypes from a cluster of bovine farms. *J Appl Microbiol* 113(5), 1238-1248. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05421.x.
- Farmer, J.J., 3rd, Fanning, G.R., Davis, B.R., O'Hara, C.M., Riddle, C., Hickman-Brenner, F.W., et al. (1985). *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 21(1), 77-81.
- Ferens, W.A., and Hovde, C.J. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis* 8(4), 465-487.
- Ferreira da Silva, M., Tiago, I., Verissimo, A., Boaventura, R.A., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2006). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 55(2), 322-329.
- Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2007). Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 60(1), 166-176.
- Figueira, V., Serra, E., and Manaia, C.M. (2011). Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci Total Environ* 409(6), 1017-1023.
- Fitzhenry, R.J., Pickard, D.J., Hartland, E.L., Reece, S., Dougan, G., Phillips, A.D., et al. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut* 50(2), 180-185.
- Fluit, A.C., and Schmitz, F.J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10(4), 272-288. doi: 10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x.
- Fong, J.S., de Chadarevian, J.P., and Kaplan, B.S. (1982). Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. *Pediatr Clin North Am* 29(4), 835-856.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., et al. (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* 365(19), 1771-1780. doi: 10.1056/NEJMoa1106483.
- Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L.H., Baljer, G., et al. (1994). Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol* 32(10), 2460-2463.
- Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B., and Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30(5), 911-921.
- Franz, E., van Hoek, A.H., Bouw, E., and Aarts, H.J. (2011). Variability of *Escherichia coli* O157 strain survival in manure-amended soil in relation to strain origin, virulence profile, and carbon nutrition profile. *Appl Environ Microbiol* 77(22), 8088-8096. doi: 10.1128/AEM.00745-11.
- Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., et al. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185(1), 74-84. doi: 10.1086/338115.
- Friedrich, A.W., Borell, J., Bielaszewska, M., Fruth, A., Tschape, H., and Karch, H. (2003). Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microbiol* 41(6), 2448-2453.
- Fuller, C.A., Pellino, C.A., Flagler, M.J., Strasser, J.E., and Weiss, A.A. (2011). Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun* 79(3), 1329-1337. doi: 10.1128/IAI.01182-10.
- Garcia-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., and Blanch, A.R. (2004). Prevalence of the stx2 gene in coliform populations from aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 70(6), 3535-3540. doi: 10.1128/AEM.70.6.3535-3540.2004.

- Garcia, S., Wade, B., Bauer, C., Craig, C., Nakaoka, K., and Lorowitz, W. (2007). The effect of wastewater treatment on antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. *Water Environ Res* 79(12), 2387-2395.
- Gassama Sow, A., Aidara-Kane, A., Barraud, O., Gatet, M., Denis, F., and Ploy, M.C. (2010). High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. *J Infect Dev Ctries* 4(4), 207-212.
- Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., Siebenmann, R.E., and Oechslin, R. (1955). [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr* 85(38-39), 905-909.
- Gaze, W.H., Krone, S.M., Larsson, D.G., Li, X.Z., Robinson, J.A., Simonet, P., et al. (2013). Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerg Infect Dis* 19(7).
- Gaze, W.H., Zhang, L., Abdousslam, N.A., Hawkey, P.M., Calvo-Bado, L., Royle, J., et al. (2011). Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *Isme J* 5(8), 1253-1261.
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., et al. (2008a). The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol* 190(14), 5095-5100. doi: 10.1128/JB.00152-08.
- Gillings, M.R., Holley, M.P., Stokes, H.W., and Holmes, A.J. (2005). Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(12), 4419-4424. doi: 10.1073/pnas.0406620102.
- Gillings, M.R., Krishnan, S., Worden, P.J., and Hardwick, S.A. (2008b). Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS Microbiol Lett* 287(1), 56-62. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01291.x.
- Gillings, M.R., Xuejun, D., Hardwick, S.A., Holley, M.P., and Stokes, H.W. (2009). Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J* 3(2), 209-215. doi: 10.1038/ismej.2008.98.
- Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., et al. (2001). Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3), 723-726. doi: 10.1128/AAC.45.3.723-726.2001.
- Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63(5), 1767-1776.
- Gourmelon, M., Montet, M.P., Lozach, S., Le Menec, C., Pommepuy, M., Beutin, L., et al. (2006). First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J Appl Microbiol* 100(1), 85-97. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02753.x.
- Gow, S.P., and Waldner, C.L. (2009). Antimicrobial resistance and virulence factors *stx1*, *stx2*, and *eae* in generic *Escherichia coli* isolates from calves in western Canadian cow-calf herds. *Microb Drug Resist* 15(1), 61-67. doi: 10.1089/mdr.2009.0860.
- Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Tauxe, R.V., Greene, K.D., Wells, J.G., Lewis, J.H., et al. (1988). Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann Intern Med* 109(9), 705-712.
- Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13, 60-98.
- Guardabassi, L., and Dalsgaard, A. (2002). Occurrence and Fate of Antibiotic Resistant Bacteria in Sewage. *Danish EPA Environmental Project Report* 722.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., and Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J Antimicrob Chemother* 52(3), 489-492. doi: 10.1093/jac/dkg362.

- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., and Riley, L.W. (1995). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* 33(5), 1375-1377.
- Gyles, C. (1994). *Escherichia coli* in domestic animals. Wallingford, UK: CAB International.
- Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 85(13 Suppl), E45-62. doi: 10.2527/jas.2006-508.
- Haenni, M., Chatre, P., Metayer, V., Bour, M., Signol, E., Madec, J.Y., et al. (2014). Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet Microbiol* 171(3-4), 321-327. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.023.
- Hales, B.A., Hart, C.A., Batt, R.M., and Saunders, J.R. (1992). The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. *Plasmid* 28(3), 183-193.
- Hall, R.M., and Collis, C.M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15(4), 593-600.
- Hammerum, A.M., and Heuer, O.E. (2009). Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin Infect Dis* 48(7), 916-921.
- Hansson, K., Sundstrom, L., Pelletier, A., and Roy, P.H. (2002). IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* 184(6), 1712-1721.
- Hardwick, S.A., Stokes, H.W., Findlay, S., Taylor, M., and Gillings, M.R. (2008). Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett* 278(2), 207-212. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00992.x.
- Hassan, S.A., Altalhi, A.D., Gherbawy, Y.A., and El-Deeb, B.A. (2011). Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia. *Foodborne Pathog Dis* 8(9), 1011-1018. doi: 10.1089/fpd.2010.0805.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., et al. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8(1), 11-22.
- Herold, S., Karch, H., and Schmidt, H. (2004). Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 294(2-3), 115-121. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.023.
- Higgins, L.M., Frankel, G., Connerton, I., Goncalves, N.S., Dougan, G., and MacDonald, T.T. (1999). Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science* 285(5427), 588-591.
- Hijnen, W.A., Beerendonk, E.F., and Medema, G.J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res* 40(1), 3-22. doi: 10.1016/j.watres.2005.10.030.
- Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., and Miyazaki, Y. (2002). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J Clin Microbiol* 40(3), 922-925.
- Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S.M., Woodgate, R., and Waldor, M.K. (2001). Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in vibrio cholerae O139 and O1 SXT constains. *Antimicrob Agents Chemother* 45(11), 2991-3000. doi: 10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001.
- Hofmann, S.L. (1993). Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci* 306(6), 398-406.
- Hogg, R.A., Holmes, J.P., Ghebrehewet, S., Elders, K., Hart, J., Whiteside, C., et al. (2009). Probable zoonotic transmission of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O 157 by dogs. *Vet Rec* 164(10), 304-305.
- Hollenbeck, B.L., and Rice, L.B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 3(5), 421-433. doi: 10.4161/viru.21282.
- Holmes, A.J., Holley, M.P., Mahon, A., Nield, B., Gillings, M., and Stokes, H.W. (2003). Recombination activity of a distinctive integron-gene cassette system associated with *Pseudomonas stutzeri* populations in soil. *J Bacteriol* 185(3), 918-928.
- Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 2, S24-28. doi: 10.1086/314056.
- Hopkins, K.L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E.J., and Carattoli, A. (2006). Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella*

- and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 50(9), 3203-3206. doi: 10.1128/AAC.00149-06.
- Hoyle, D.V., Davison, H.C., Knight, H.I., Yates, C.M., Dobay, O., Gunn, G.J., et al. (2006). Molecular characterisation of bovine faecal *Escherichia coli* shows persistence of defined ampicillin resistant strains and the presence of class 1 integrons on an organic beef farm. *Vet Microbiol* 115(1-3), 250-257.
- Huovinen, P., Sundstrom, L., Swedberg, G., and Skold, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39(2), 279-289.
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., and Muniesa, M. (2009). Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* 75(6), 1764-1768. doi: 10.1128/AEM.02273-08.
- ISO (2001). (International Organization for Standardization). ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
- ISO (2012). ISO 13136:2012: Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*
- Jarvis, K.G., Giron, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17), 7996-8000.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., and Kaper, J.B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20), 7839-7843.
- Johnson, A.P., Malde, M., Woodford, N., Cunney, R.J., and Smyth, E.G. (1995). Urinary isolates of apramycin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Dublin. *Epidemiol Infect* 114(1), 105-112.
- Jost, C., Bidet, P., Carrere, T., Mariani-Kurkdjian, P., and Bonacorsi, S. (2016). Susceptibility of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to azithromycin in France and analysis of resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 71(5), 1183-1187. doi: 10.1093/jac/dkv477.
- Jove, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., and Ploy, M.C. (2010). Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *Plos Genetics* 6(1). doi: ARTN e1000793
10.1371/journal.pgen.1000793.
- Kado, C.I., and Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 145(3), 1365-1373.
- Kaniuk, N.A., Vinogradov, E., Li, J., Monteiro, M.A., and Whitfield, C. (2004). Chromosomal and plasmid-encoded enzymes are required for assembly of the R3-type core oligosaccharide in the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279(30), 31237-31250. doi: 10.1074/jbc.M401879200.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2), 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818.
- Kaplan, B.S., and Proesmans, W. (1987). The hemolytic uremic syndrome of childhood and its variants. *Semin Hematol* 24(3), 148-160.
- Karama, M., Johnson, R.P., Holtslander, R., and Gyles, C.L. (2008). Phenotypic and genotypic characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 isolates from cattle and humans. *J Clin Microbiol* 46(11), 3569-3575. doi: 10.1128/JCM.01095-08.
- Karch, H., and Bielaszewska, M. (2001). Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol* 39(6), 2043-2049. doi: 10.1128/JCM.39.6.2043-2049.2001.
- Karczmarczyk, M., Walsh, C., Slowey, R., Leonard, N., and Fanning, S. (2011). Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Appl Environ Microbiol* 77(20), 7121-7127. doi: 10.1128/AEM.00601-11.

- Karmali, M.A., Gannon, V., and Sargeant, J.M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140(3-4), 360-370. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.011.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., et al. (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* 41(11), 4930-4940.
- Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., and Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1(8325), 619-620.
- Kawano, K., Okada, M., Haga, T., Maeda, K., and Goto, Y. (2008). Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27(3), 227-232. doi: 10.1007/s10096-007-0420-3.
- Kim, S., Jensen, J.N., Aga, D.S., and Weber, A.S. (2007). Fate of tetracycline resistant bacteria as a function of activated sludge process organic loading and growth rate. *Water Sci Technol* 55(1-2), 291-297.
- Kim, S.H., Jia, W., Bishop, R.E., and Gyles, C. (2004). An *msbB* homologue carried in plasmid pO157 encodes an acyltransferase involved in lipid A biosynthesis in *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 72(2), 1174-1180.
- Kim, S.R., Funayama, N., and Komano, T. (1993). Nucleotide sequence and characterization of the *traABCD* region of IncII plasmid R64. *J Bacteriol* 175(16), 5035-5042.
- Klapproth, J.M., Scaletsky, I.C., McNamara, B.P., Lai, L.C., Malstrom, C., James, S.P., et al. (2000). A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun* 68(4), 2148-2155.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., and McNeish, A.S. (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), 1290-1298.
- Koch, C., Hertwig, S., Lurz, R., Appel, B., and Beutin, L. (2001). Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx1(OX3)* gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J Clin Microbiol* 39(11), 3992-3998. doi: 10.1128/JCM.39.11.3992-3998.2001.
- Koivunen, J., and Heinonen-Tanski, H. (2005). Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Res* 39(8), 1519-1526. doi: 10.1016/j.watres.2005.01.021.
- Kokai-Kun, J.F., Melton-Celsa, A.R., and O'Brien, A.D. (2000). Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J Biol Chem* 275(5), 3713-3721.
- Kovacs, M.J., Roddy, J., Gregoire, S., Cameron, W., Eidus, L., and Drouin, J. (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* 88(2), 177-179.
- Kozub-Witkowski, E., Krause, G., Frankel, G., Kramer, D., Appel, B., and Beutin, L. (2008). Serotypes and virotypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J Appl Microbiol* 104(2), 403-410. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03545.x.
- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegard, B., et al. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One* 6(2), e17038. doi: 10.1371/journal.pone.0017038.
- Kruse, H., and Sorum, H. (1994). Transfer of Multiple-Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11), 4015-4021.
- Kumar, A., Taneja, N., Kumar, Y., and Sharma, M. (2012). Detection of Shiga toxin variants among Shiga toxin-forming *Escherichia coli* isolates from animal stool, meat and human stool samples in India. *J Appl Microbiol* 113(5), 1208-1216. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05415.x.
- Labbate, M., Case, R.J., and Stokes, H.W. (2009). The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol Biol* 532, 103-125. doi: 10.1007/978-1-60327-853-9_6.
- Lacher, D.W., Steinsland, H., Blank, T.E., Donnenberg, M.S., and Whittam, T.S. (2007). Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence

- typing and virulence gene allelic profiling. *J Bacteriol* 189(2), 342-350. doi: 10.1128/JB.01472-06.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., and Petit, F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 68(1), 118-130. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00655.x.
- Larsen, H.E., and Larsen, J.L. (1975). [Persistence of resistant *Escherichia coli* in a calf herd]. *Nord Vet Med* 27(2), 65-76.
- Lathem, W.W., Grys, T.E., Witowski, S.E., Torres, A.G., Kaper, J.B., Tarr, P.I., et al. (2002). StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* 45(2), 277-288.
- Lazarova, V., Savoye, P., Janex, M.L., Blatchley, E.R., and Pommepuy, M. (1999). Advanced wastewater disinfection technologies: State of the art and perspectives. *Water Science and Technology* 40(4-5), 203-213. doi: 10.1016/S0273-1223(99)00502-8.
- Leclercq, R., Canton, R., Brown, D.F., Giske, C.G., Heisig, P., MacGowan, A.P., et al. (2013a). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 19(2), 141-160. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
- Leclercq, R., Oberle, K., Galopin, S., Cattoir, V., Budzinski, H., and Petit, F. (2013b). Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river continuum. *Appl Environ Microbiol* 79(7), 2428-2434. doi: 10.1128/AEM.03586-12.
- Lee, J.H. (2009). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26 and O111 isolates from cattle and their characteristics. *Vet Microbiol* 135(3-4), 401-405. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.076.
- Lee, M.D., Sanchez, S., Zimmer, M., Idris, U., Berrang, M.E., and McDermott, P.F. (2002). Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob Agents Chemother* 46(11), 3660-3664.
- Lengacher, B., Kline, T.R., Harpster, L., Williams, M.L., and Lejeune, J.T. (2010). Low prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in horses in Ohio, USA. *J Food Prot* 73(11), 2089-2092.
- Lenski, R.E. (1997). The cost of antibiotic resistance--from the perspective of a bacterium. *Ciba Found Symp* 207, 131-140; discussion 141-151.
- Leung, P.H., Peiris, J.S., Ng, W.W., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A., and Yam, W.C. (2003). A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69(12), 7549-7553.
- Leverstein-van Hall, M.A., HE, M.B., AR, T.D., Paauw, A., Fluit, A.C., and Verhoef, J. (2003). Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis* 187(2), 251-259. doi: 10.1086/345880.
- Levin, B.R., Perrot, V., and Walker, N. (2000). Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154(3), 985-997.
- Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., et al. (1985). The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* 152(3), 550-559.
- Levine, M.M., Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., et al. (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 156(1), 175-182.
- Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K.L., Clifton-Hadley, F.A., Teale, C.J., Foster, A., et al. (2006). Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* 44(5), 1630-1634. doi: 10.1128/JCM.44.5.1630-1634.2006.
- Liebana, E., Gibbs, M., Clouting, C., Barker, L., Clifton-Hadley, F.A., Pleydell, E., et al. (2004). Characterization of beta-lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb Drug Resist* 10(1), 1-9. doi: 10.1089/107662904323047745.
- Liebert, C.A., Hall, R.M., and Summers, A.O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3), 507-522.

- Lim, J.Y., Yoon, J., and Hovde, C.J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* 20(1), 5-14.
- Lindgren, S.W., Samuel, J.E., Schmitt, C.K., and O'Brien, A.D. (1994). The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect Immun* 62(2), 623-631.
- Lopez, E.L., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B.E., et al. (1989). Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis* 160(3), 469-475.
- Losada, L., DebRoy, C., Radune, D., Kim, M., Sanka, R., Brinkac, L., et al. (2016). Whole genome sequencing of diverse Shiga toxin-producing and non-producing *Escherichia coli* strains reveals a variety of virulence and novel antibiotic resistance plasmids. *Plasmid* 83, 8-11. doi: 10.1016/j.plasmid.2015.12.001.
- Loukiadis, E., Kerouredan, M., Beutin, L., Oswald, E., and Brugere, H. (2006). Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Appl Environ Microbiol* 72(5), 3245-3251. doi: 10.1128/AEM.72.5.3245-3251.2006.
- Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., and Olanczuk-Neyman, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res* 44(17), 5089-5097.
- Luna-Gierke, R.E., Griffin, P.M., Gould, L.H., Herman, K., Bopp, C.A., Strockbine, N., et al. (2014). Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect* 142(11), 2270-2280. doi: 10.1017/S0950268813003233.
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., et al. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ Sci Technol* 44(19), 7220-7225. doi: 10.1021/es100233w.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H., and Hearst, J.E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16(1), 45-55.
- MacFaddin, J.F. (1985). Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria. *Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London.*
- Mach, P.A., and Grimes, D.J. (1982). R-Plasmid Transfer in a Wastewater Treatment-Plant. *Applied and Environmental Microbiology* 44(6), 1395-1403.
- Madec, J.Y., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., et al. (2012). Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*_(CTX-M-15)-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* 67(3), 578-581. doi: 10.1093/jac/dkr542.
- Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., et al. (2010). Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *J Appl Microbiol* 109(5), 1696-1705. doi: JAM4798 [pii]
- 10.1111/j.1365-2672.2010.04798.x.
- Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C.P., Marault, M., Scheutz, F., Brugere, H., et al. (2011). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 77(6), 2035-2041. doi: 10.1128/AEM.02089-10.
- Maiden, M.C. (1998). Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1, S12-20.
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C.H., et al. (1998). Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res* 5(1), 1-9.
- Makino, S., Asakura, H., Obayashi, T., Shirahata, T., Ikeda, T., and Takeshi, K. (1999). Molecular epidemiological study on tetracycline resistance R plasmids in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 123(1), 25-30.

- Marcade, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., et al. (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 63(1), 67-71. doi: 10.1093/jac/dkn428.
- March, S.B., and Ratnam, S. (1986). Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 23(5), 869-872.
- Marquez, C., Labbate, M., Ingold, A.J., Roy Chowdhury, P., Ramirez, M.S., Centron, D., et al. (2008). Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother* 52(11), 4153-4154. doi: 10.1128/AAC.00710-08.
- Marshall, R.T. (1993). Standard methods for the examination of dairy products. 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Marti, E., Variatza, E., and Balcazar, J.L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol* 22(1), 36-41. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.001.
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., et al. (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Appl Environ Microbiol* 79(18), 5701-5709. doi: 10.1128/AEM.01682-13.
- Martin, D.L., MacDonald, K.L., White, K.E., Soler, J.T., and Osterholm, M.T. (1990). The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. *N Engl J Med* 323(17), 1161-1167. doi: 10.1056/NEJM199010253231703.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Grek, V.S., Verhoef, J., and Jones, M.E. (1998). Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 42(6), 689-696.
- Martinez, J.L., and Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15(4), 647-679.
- Martins da Costa, P.M., Vaz-Pires, P.M., and Bernardo, F.M. (2006). Antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. *J Environ Sci Health B* 41(8), 1393-1403. doi: 10.1080/03601230600964258.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4(8), 608-620. doi: 10.1038/nrmicro1462.
- McCarthy, T.A., Barrett, N.L., Hadler, J.L., Salsbury, B., Howard, R.T., Dingman, D.W., et al. (2001). Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics* 108(4). doi: ARTN e59
- DOI 10.1542/peds.108.4.e59.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5), 1664-1668.
- McDermott, P.F., Walker, R.D., and White, D.G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 22(2), 135-143.
- McDowell, D.A., and Sheridan, J.J. (2001). Survival and growth of Vero cytotoxin-producing *E. coli* in the environment. in: Duffy G., Garvey P., McDowell D. (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, 2001, pp. 279-304.
- McGannon, C.M., Fuller, C.A., and Weiss, A.A. (2010). Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production. *Antimicrob Agents Chemother* 54(9), 3790-3798. doi: 10.1128/AAC.01783-09.
- McWilliams, B.D., and Torres, A.G. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. *Microbiol Spectr* 2(3). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013.
- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico, A., et al. (2011). Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6(7), e22751. doi: 10.1371/journal.pone.0022751.
- Melton-Celsa, A.R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr* 2(4), EHEC-0024-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.

- Mezrioui, N., and Baleux, B. (1994). Resistance Patterns of Escherichia-Coli Strains Isolated from Domestic Sewage before and after Treatment in Both Aerobic Lagoon and Activated-Sludge. *Water Research* 28(11), 2399-2406. doi: Doi 10.1016/0043-1354(94)90056-6.
- Miceli, S., Jure, M.A., de Saab, O.A., de Castillo, M.C., Rojas, S., de Holgado, A.P., et al. (1999). A clinical and bacteriological study of children suffering from haemolytic uraemic syndrome in Tucuman, Argentina. *Jpn J Infect Dis* 52(2), 33-37.
- Miko, A., Lindstedt, B.A., Brandal, L.T., Lobersli, I., and Beutin, L. (2010). Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. *FEMS Microbiol Lett* 303(2), 137-146. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01874.x.
- Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Hare, R.S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., et al. (1997). The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1, S46-62.
- Moellering, R.C., Jr., and Weinberg, A.N. (1971). Studies on antibiotic synerism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of 14 C-labeled streptomycin by enterococci. *J Clin Invest* 50(12), 2580-2584. doi: 10.1172/JCI106758.
- Moore, S.C.P., S.; McMillan, K.E.; Mellor, G.E.; Barlow, R.S.; Fegan, N. (2015). Characterization of *E. coli* O103 isolates from Australian ruminants. *Boston, MA: VTEC; 2015*.
- Mora, A., Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Dhahi, G., Echeita, A., 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* 156(7), 793-806. doi: 10.1016/j.resmic.2005.03.006.
- Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., et al. (1998). Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 36(3), 840-842.
- Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., and Caprioli, A. (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), 3343-3348.
- Moschcowitz, E. (1925). An acute febrile pleochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries. *Arch Intern Med* 36(89).
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., and Correia, A. (2007). Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother* 60(6), 1243-1250. doi: 10.1093/jac/dkm340.
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., and Correia, A. (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol* 161(1), 58-66. doi: 10.1016/j.resmic.2009.11.004.
- Mulvey, M.R., Susky, E., McCracken, M., Morck, D.W., and Read, R.R. (2009). Similar cefoxitin-resistance plasmids circulating in *Escherichia coli* from human and animal sources. *Vet Microbiol* 134(3-4), 279-287. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.08.018.
- Nair, J., Rouse, D.A., Bai, G.H., and Morris, S.L. (1993). The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 10(3), 521-527.
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., and Summers, A.O. (2004). Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18), 7118-7122. doi: 10.1073/pnas.0306466101.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1), 142-201.
- Nathanson, S., Kwon, T., Elmaleh, M., Charbit, M., Launay, E.A., Harambat, J., et al. (2010). Acute neurological involvement in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 5(7), 1218-1228. doi: 10.2215/CJN.08921209.
- Navarro, F., Mesa, R.J., Miro, E., Gomez, L., Mirelis, B., and Coll, P. (2007). Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett* 273(1), 120-123. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00791.x.

- Naylor, S.W., Gally, D.L., and Low, J.C. (2005). Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295(6-7), 419-441.
- NHMRC, and NRMCC (2004). National Health and Medical Research Council & Natural Resource Management Ministerial Council. Australian Drinking Water Guidelines, Canberra. Available on <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/eh19syn.htm>.
- Nicholls, L., Grant, T.H., and Robins-Browne, R.M. (2000). Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* 35(2), 275-288.
- Nielsen, E.M., and Andersen, M.T. (2003). Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol* 41(7), 2884-2893.
- Nitschke, M., Sayk, F., Hartel, C., Roseland, R.T., Hauswaldt, S., Steinhoff, J., et al. (2012). Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA* 307(10), 1046-1052. doi: 10.1001/jama.2012.264.
- Novick, R.P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 51(4), 381-395.
- O'Loughlin, E.V., and Robins-Browne, R.M. (2001). Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect* 3(6), 493-507.
- Oakes, R.S., Kirkham, J.K., Nelson, R.D., and Siegler, R.L. (2008). Duration of oliguria and anuria as predictors of chronic renal-related sequelae in post-diarrheal hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 23(8), 1303-1308. doi: 10.1007/s00467-008-0799-9.
- Oberle, K., Capdeville, M.J., Berthe, T., Budzinski, H., and Petit, F. (2012). Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ Sci Technol* 46(3), 1859-1868.
- Obrig, T.G., Moran, T.P., and Brown, J.E. (1987). The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem J* 244(2), 287-294.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405(6784), 299-304. doi: 10.1038/35012500.
- Ohara, T., Kojio, S., Taneike, I., Nakagawa, S., Gondaira, F., Tamura, Y., et al. (2002). Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. *Antimicrob Agents Chemother* 46(11), 3478-3483.
- Okoh, A.I., Odjajare, E.E., Igbinsosa, E.O., and Osode, A.N. (2007). Wastewater treatment plants as a source of microbial pathogens in receiving watersheds. *African Journal of Biotechnology* 6(25), 2932-2944.
- Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43 Spec No, 93-100.
- Olsen, S.J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., et al. (2002). A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infections and hemolytic uremic syndrome: Implications for rural water systems. *Emerging Infectious Diseases* 8(4), 370-375.
- Orth, D., Grif, K., Khan, A.B., Naim, A., Dierich, M.P., and Wurzner, R. (2007). The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59(3), 235-242. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.013.
- Ostroff, S.M., Kobayashi, J.M., and Lewis, J.H. (1989). Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. *JAMA* 262(3), 355-359.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., and Caprioli, A. (2000). Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* 68(1), 64-71.
- Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W.M., Sims, H.V., and Woods, D.E. (1988). Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. *J Infect Dis* 157(5), 1054-1057.
- Pallecchi, L., Lucchetti, C., Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Gamboa, H., et al. (2007). Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 51(4), 1179-1184. doi: 10.1128/AAC.01101-06.

- Pallen, M.J., Beatson, S.A., and Bailey, C.M. (2005). Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* 5, 9. doi: 10.1186/1471-2180-5-9.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., and Iredell, J.R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33(4), 757-784.
- Paton, A.W., Beutin, L., and Paton, J.C. (1995). Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. *Gene* 153(1), 71-74.
- Paton, A.W., and Paton, J.C. (1998a). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. *J Clin Microbiol* 36(2), 598-602.
- Paton, A.W., Paton, J.C., and Manning, P.A. (1993). Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons. *Microb Pathog* 15(1), 77-82. doi: 10.1006/mpat.1993.1058.
- Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., and Paton, J.C. (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. doi: 10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001.
- Paton, J.C., and Paton, A.W. (1998b). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11(3), 450-479.
- Paulsen, I.T., Littlejohn, T.G., Radstrom, P., Sundstrom, L., Skold, O., Swedberg, G., et al. (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 37(4), 761-768.
- Pedersen, M.G., Hansen, C., Riise, E., Persson, S., and Olsen, K.E. (2008). Subtype-specific suppression of Shiga toxin 2 released from *Escherichia coli* upon exposure to protein synthesis inhibitors. *J Clin Microbiol* 46(9), 2987-2991. doi: 10.1128/JCM.00871-08.
- Perelle, S., Dilasser, F., Gروت, J., and Fach, P. (2004). Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* 18(3), 185-192. doi: 10.1016/j.mcp.2003.12.004.
- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., et al. (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 66(8), 3810-3817.
- Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., et al. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409(6819), 529-533. doi: 10.1038/35054089.
- Persad, A.K., and LeJeune, J.T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2(4), EHEC-0027-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014.
- Persson, S., Olsen, K.E., Ethelberg, S., and Scheutz, F. (2007). Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 45(6), 2020-2024. doi: 10.1128/JCM.02591-06.
- Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby, G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46(1), 1-11.
- Phuc Nguyen, M.C., Woerther, P.L., Bouvet, M., Andremont, A., Leclercq, R., and Canu, A. (2009). *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. *Emerg Infect Dis* 15(10), 1648-1650. doi: 10.3201/eid1510.090696.
- Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., and Lauwers, S. (1998). Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 36(11), 3317-3322.
- Pignato, S., Coniglio, M.A., Faro, G., Lefevre, M., Weill, F.X., and Giammanco, G. (2010). Molecular epidemiology of ampicillin resistance in *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* from wastewater and clinical specimens. *Foodborne Pathog Dis* 7(8), 945-951. doi: 10.1089/fpd.2009.0504.
- Posse, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., and Herman, L. (2008a). Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiol Lett* 282(1), 124-131. doi: FML1121 [pii]

10.1111/j.1574-6968.2008.01121.x.

- Posse, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., and Herman, L. (2008b). Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes from artificially contaminated food and cattle faeces samples using a new isolation protocol. *J Appl Microbiol* 105(1), 227-235. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03739.x.
- Pote, J., Ceccherini, M.T., Van, V.T., Rosselli, W., Wildi, W., Simonet, P., et al. (2003). Fate and transport of antibiotic resistance genes in saturated soil columns. *European Journal of Soil Biology* 39(2), 65-71. doi: 10.1016/S1164-5563(03)00003-7.
- Pruden, A., Larsson, D.G., Amezcua, A., Collignon, P., Brandt, K.K., Graham, D.W., et al. (2013). Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect* 121(8), 878-885. doi: 10.1289/ehp.1206446.
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., and Carlson, K.H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol* 40(23), 7445-7450.
- Pruimboom-Brees, I.M., Morgan, T.W., Ackermann, M.R., Nystrom, E.D., Samuel, J.E., Cornick, N.A., et al. (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19), 10325-10329. doi: 10.1073/pnas.190329997.
- Rahn, K., Wilson, J.B., McFadden, K.A., Read, S.C., Ellis, A.G., Renwick, S.A., et al. (1996). Comparison of Vero cell assay and PCR as indicators of the presence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in bovine and human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 62(12), 4314-4317.
- Ramirez, M.S., Quiroga, C., and Centron, D. (2005). Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(12), 5179-5181. doi: 10.1128/AAC.49.12.5179-5181.2005.
- Ramos, S., Silva, N., Canica, M., Capelo-Martinez, J.L., Brito, F., Igrejas, G., et al. (2013). High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. *J Sci Food Agric* 93(3), 517-526. doi: 10.1002/jsfa.5814.
- Rao, S., Maddox, C.W., Hoiem-Dalen, P., Lanka, S., and Weigel, R.M. (2008). Diagnostic accuracy of class 1 integron PCR method in detection of antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from swine production systems. *J Clin Microbiol* 46(3), 916-920. doi: 10.1128/JCM.01597-07.
- Raphael, E., Wong, L.K., and Riley, L.W. (2011). Extended-Spectrum Beta-Lactamase Gene Sequences in Gram-Negative Saprophytes on Retail Organic and Nonorganic Spinach. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5), 1601-1607. doi: 10.1128/Aem.02506-10.
- Raska, K., Raskova, H., Urbanova, Z., Matejovska, D., Matejovska, V., Palounek, V., et al. (1979). Resistance of gram-negative bacteria to antibiotics in large calf agglomerations. *Acta Trop* 36(2), 163-170.
- Recchia, G.D., and Hall, R.M. (1995). Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the *incQ* plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 15(1), 179-187.
- Reinthal, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckebauer, G., et al. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res* 37(8), 1685-1690.
- Remuzzi, G. (1987). HUS and TTP: variable expression of a single entity. *Kidney Int* 32(2), 292-308.
- Rijal, G.K., Zmuda, J.T., Gore, R., Abedin, Z., Granato, T., Kollias, L., et al. (2009). Antibiotic resistant bacteria in wastewater processed by the Metropolitan Water Reclamation District of Greater Chicago system. *Water Sci Technol* 59(12), 2297-2304. doi: 10.2166/wst.2009.270.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., et al. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308(12), 681-685. doi: 10.1056/NEJM198303243081203.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., et al. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ* 447, 345-360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
- Roberts, M.C. (2002). Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol Biotechnol* 20(3), 261-283. doi: 10.1385/MB:20:3:261.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., et al. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 6, 22-29. doi: 10.1016/j.nmni.2015.02.007.

- Rodriguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendorf, K., Garcia, F., and Lipski, A. (2006). Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline- and gentamicin-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72(9), 5870-5876. doi: 10.1128/AEM.00963-06.
- Roe, M.T., Byrd, J.A., Smith, D.P., and Pillai, S.D. (2003). Class 1 and class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. *J Food Prot* 66(8), 1426-1431.
- Rosengren, L.B., Waldner, C.L., and Reid-Smith, R.J. (2009). Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. *Appl Environ Microbiol* 75(5), 1373-1380. doi: 10.1128/AEM.01253-08.
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., and Mazel, D. (2002). Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol Microbiol* 43(6), 1657-1669.
- Rowe, P.C., Orrbine, E., Wells, G.A., and McLaine, P.N. (1991). Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. The Canadian Pediatric Kidney Disease Reference Centre. *J Pediatr* 119(2), 218-224.
- Ruimy, R., Brisabois, A., Bernede, C., Skurnik, D., Barnat, S., Arlet, G., et al. (2010). Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environ Microbiol* 12(3), 608-615. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02100.x.
- Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 51(5), 1109-1117. doi: 10.1093/jac/dkg222.
- Rysz, M., and Alvarez, P.J. (2004). Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments. *Water Res* 38(17), 3705-3712. doi: 10.1016/j.watres.2004.06.015.
- Sabate, M., Prats, G., Moreno, E., Balleste, E., Blanch, A.R., and Andreu, A. (2008). Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res Microbiol* 159(4), 288-293. doi: 10.1016/j.resmic.2008.02.001.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A.B., Skotland, T., and Torgersen, M.L. (2010). Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* 56(7), 1181-1185. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.021.
- Saridakis, H.O. (1994). Non production of shiga-like toxins by *Escherichia coli* serogroup O26. *Rev. Microbiol.* 25, 154-155.
- Sasaki, Y., Usui, M., Murakami, M., Haruna, M., Kojima, A., Asai, T., et al. (2012). Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 isolates from beef cattle. *Jpn J Infect Dis* 65(2), 117-121.
- Scheutz, F. (2014). Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2(3). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., et al. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50(9), 2951-2963. doi: 10.1128/JCM.00860-12.
- Schmidt, H. (2001). Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* 152(8), 687-695.
- Schmidt, H., Beutin, L., and Karch, H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63(3), 1055-1061.
- Schmidt, H., Bitzan, M., and Karch, H. (2001). Pathogenic aspects of Shiga toxin-producing *E. coli* infections in humans. in: Duffy G., Garvey P., McDowell D. (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, 2001, pp. 241-262.
- Schmidt, H., Henkel, B., and Karch, H. (1997). A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* 148(2), 265-272.
- Schmidt, H., and Karch, H. (1996). Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 34(10), 2364-2367.

- Schmidt, H., Karch, H., and Beutin, L. (1994). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 117(2), 189-196.
- Schmidt, H., Kernbach, C., and Karch, H. (1996). Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:h7. *Microbiology* 142 (Pt 4), 907-914. doi: 10.1099/00221287-142-4-907.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., and Karch, H. (2000). A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* 66(3), 1205-1208.
- Schmitt, C.K., McKee, M.L., and O'Brien, A.D. (1991). Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* 59(3), 1065-1073.
- Schroeder, C.M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D.G., et al. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol* 68(2), 576-581.
- Schwaiger, K., Helmke, K., Holzel, C.S., and Bauer, J. (2011). Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *Int J Food Microbiol* 148(3), 191-196. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001.
- Schwarz, S., Cloeckart, A., and Roberts, M.C. (2006). Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Aarestrup FM (ed) *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington, DC: ASM Press. pp. 73-98.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., et al. (2010). Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* 65(4), 601-604. doi: dkq037 [pii]
- 10.1093/jac/dkq037.
- Scott, L., McGee, P., Walsh, C., Fanning, S., Sweeney, T., Blanco, J., et al. (2009). Detection of numerous verotoxigenic *E. coli* serotypes, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. *Vet Microbiol* 134(3-4), 288-293. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.08.008.
- Sekse, C., Sunde, M., Hopp, P., Bruheim, T., Cudjoe, K.S., Kvitle, B., et al. (2013). Occurrence of potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O103 in Norwegian sheep. *Appl Environ Microbiol* 79(23), 7502-7509. doi: 10.1128/AEM.01825-13.
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., and Muniesa, M. (2007). Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J Bacteriol* 189(18), 6645-6654. doi: 10.1128/JB.00466-07.
- Shen, S., Mascarenhas, M., Morgan, R., Rahn, K., and Karmali, M.A. (2005). Identification of four fimbria-encoding genomic islands that are highly specific for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157 strains. *J Clin Microbiol* 43(8), 3840-3850. doi: 10.1128/JCM.43.8.3840-3850.2005.
- Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y., and Arakawa, Y. (2004). *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis* 10(1), 69-75.
- Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., et al. (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7), 3062-3065. doi: 10.1128/AAC.49.7.3062-3065.2005.
- Smith, D.R. (2014). Vaccination of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol Spectr* 2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0006-2013.
- Snedeker, K.G., Shaw, D.J., Locking, M.E., and Prescott, R.J. (2009). Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC Infect Dis* 9, 144. doi: 10.1186/1471-2334-9-144.
- Soborg, B., Lassen, S.G., Muller, L., Jensen, T., Ethelberg, S., Molbak, K., et al. (2013). A verocytotoxin-producing *E. coli* outbreak with a surprisingly high risk of haemolytic uraemic syndrome, Denmark, September-October 2012. *Euro Surveill* 18(2).

- Soller, J., Embrey, M., Tuhela, L., Ichida, A., and Rosen, J. (2010). Risk-based evaluation of *Escherichia coli* monitoring data from undisinfected drinking water. *J Environ Manage* 91(11), 2329-2335. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.06.017.
- Solomakos, N., Govaris, A., Angelidis, A.S., Pournaras, S., Burriel, A.R., Kritas, S.K., et al. (2009). Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiol* 26(8), 865-871. doi: 10.1016/j.fm.2009.06.002.
- Spellman, F.R. (2008). Handbook of Water and Wastewater Treatment Plant Operations. (second ed.) CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Spooner, R.A., and Lord, J.M. (2012). How ricin and Shiga toxin reach the cytosol of target cells: retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Curr Top Microbiol Immunol* 357, 19-40. doi: 10.1007/82_2011_154.
- Spratt, B.G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264(5157), 388-393.
- Srinivasan, V., Nam, H.M., Sawant, A.A., Headrick, S.I., Nguyen, L.T., and Oliver, S.P. (2008). Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. *Microb Ecol* 55(2), 184-193.
- Srinivasan, V., Nguyen, L.T., Headrick, S.I., Murinda, S.E., and Oliver, S.P. (2007). Antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H7- from different origins. *Microb Drug Resist* 13(1), 44-51. doi: 10.1089/mdr.2006.9996.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., and Ploy, M.C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 3, 119.
- Steinborn, M., Leiz, S., Rudisser, K., Griebel, M., Harder, T., and Hahn, H. (2004). CT and MRI in haemolytic uraemic syndrome with central nervous system involvement: distribution of lesions and prognostic value of imaging findings. *Pediatr Radiol* 34(10), 805-810. doi: 10.1007/s00247-004-1289-2.
- Stephan, R., and Hoelzle, L.E. (2000). Characterization of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. *Lett Appl Microbiol* 31(2), 139-142.
- Stephan, R., and Untermann, F. (1999). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol* 37(5), 1570-1572.
- Stevens, M.P., and Frankel, G.M. (2014). The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2(4), EHEC-0007-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013.
- Stevens, M.P., Marches, O., Campbell, J., Huter, V., Frankel, G., Phillips, A.D., et al. (2002). Intimin, tir, and shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops. *Infect Immun* 70(2), 945-952.
- Stokes, H.W., and Hall, R.M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3(12), 1669-1683.
- Stokes, H.W., O'Gorman, D.B., Recchia, G.D., Parsekhian, M., and Hall, R.M. (1997). Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 26(4), 731-745.
- Sunde, M., and Sorum, H. (1999). Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 5(4), 279-287. doi: 10.1089/mdr.1999.5.279.
- Szu, S.C., and Ahmed, A. (2014). Clinical Studies of *Escherichia coli* O157:H7 Conjugate Vaccines in Adults and Young Children. *Microbiol Spectr* 2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0016-2013.
- Tarr, C.L., and Whittam, T.S. (2002). Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184(2), 479-487.
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., et al. (2001). *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69(11), 6660-6669. doi: 10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001.
- Tauxe, R.V. (1998). Public health perspective on immunoprophylactic strategies for *Escherichia coli* O157:H7: who or what would we immunize. In: Kaper, J.B.; O'Brien, A.D., editors. *Escherichia*

- coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. ASM Press; Washington, DC: 1998. p. 445-452.
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Puhler, A., and Schluter, A. (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 45(3), 239-252.
- Thompson, J.S., Hodge, D.S., and Borczyk, A.A. (1990). Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* 28(10), 2165-2168.
- Tobe, T., Beatson, S.A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C.M., Fivian, A., et al. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdaoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40), 14941-14946. doi: 10.1073/pnas.0604891103.
- Torres, A.G., Zhou, X., and Kaper, J.B. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73(1), 18-29. doi: 10.1128/IAI.73.1.18-29.2005.
- Toussaint, B., and Dehareng, D. (1996). La gestion des effluents d'élevage. *Les livrets de l'agriculture N°2. Ministère de l'Agriculture et des Ressources naturelles Wallone. Collection de la Direction générale de l'agriculture. Disponible sur : http://agriculture.wallonie.be/apps/spip_wolwin/IMG/pdf/livret2F.pdf (consulté le 08 Janvier 2012).*
- Tozzi, A.E., Goriotti, S., and Caprioli, A. (2001). Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*. in: Duffy G., Garvey P., McDowell D. (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, 2001, pp. 161-179.*
- Trabulsi, L.R., Keller, R., and Tardelli Gomes, T.A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8(5), 508-513. doi: 10.3201/eid0805.010385.
- Trotz-Williams, L.A., Mercer, N.J., Walters, J.M., Maki, A.M., and Johnson, R.P. (2012). Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. *Can J Public Health* 103(5), e322-326.
- Tschape, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., and Bohme, G. (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), 441-450.
- Um, M.M., Barraud, O., Kerouredan, M., Gaschet, M., Stalder, T., Oswald, E., et al. (2016). Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health. *Water Res* 88, 30-38. doi: 10.1016/j.watres.2015.09.029.
- USDA (2012). (U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service). Risk Profile for Pathogenic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC). 2012. Available from http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-065c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May2012.pdf?MOD=AJPERES.
- van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K., and Mevius, D. (2007). Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 59(4), 746-750. doi: 10.1093/jac/dkl549.
- van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., and Aarts, H.J. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2, 203. doi: 10.3389/fmicb.2011.00203.
- Venturini, C., Beatson, S.A., Djordjevic, S.P., and Walker, M.J. (2010). Multiple antibiotic resistance gene recruitment onto the enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence plasmid. *FASEB J* 24(4), 1160-1166. doi: 10.1096/fj.09-144972.
- Venturini, C., Hassan, K.A., Roy Chowdhury, P., Paulsen, I.T., Walker, M.J., and Djordjevic, S.P. (2013). Sequences of two related multiple antibiotic resistance virulence plasmids sharing a unique IS26-related molecular signature isolated from different *Escherichia coli* pathotypes from different hosts. *PLoS One* 8(11), e78862. doi: 10.1371/journal.pone.0078862.
- Verstraete, K., De Zutter, L., Messens, W., Herman, L., Heyndrickx, M., and De Reu, K. (2010). Effect of the enrichment time and immunomagnetic separation on the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and sorbitol positive O157 from artificially inoculated cattle faeces. *Vet Microbiol* 145(1-2), 106-112. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.004.

- Vidovic, S., Tsoi, S., Medihala, P., Liu, J., Wylie, J.L., Levett, P.N., et al. (2013). Molecular and antimicrobial susceptibility analyses distinguish clinical from bovine *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol* 51(7), 2082-2088. doi: 10.1128/JCM.00307-13.
- Walia, S., Rana, S.W., Maue, D., Rana, J., Kumar, A., and Walia, S.K. (2013). Prevalence of multiple antibiotic-resistant Gram-negative bacteria on bagged, ready-to-eat baby spinach. *Int J Environ Health Res* 23(2), 108-118. doi: 10.1080/09603123.2012.708916.
- Warnier, M., Romer, W., Geelen, J., Lesieur, J., Amessou, M., van den Heuvel, L., et al. (2006). Trafficking of Shiga toxin/Shiga-like toxin-1 in human glomerular microvascular endothelial cells and human mesangial cells. *Kidney Int* 70(12), 2085-2091. doi: 10.1038/sj.ki.5001989.
- Weinstein, D.L., Jackson, M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D. (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), 4223-4230.
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 39(3), 577-585.
- Weissenborn, K., Donnerstag, F., Kielstein, J.T., Heeren, M., Worthmann, H., Hecker, H., et al. (2012). Neurologic manifestations of E coli infection-induced hemolytic-uremic syndrome in adults. *Neurology* 79(14), 1466-1473. doi: 10.1212/WNL.0b013e31826d5f26.
- Wellington, E.M., Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis* 13(2), 155-165. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70317-1.
- Willshaw, G.A., Scotland, S.M., Smith, H.R., and Rowe, B. (1992). Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. *J Infect Dis* 166(4), 797-802.
- Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., and Tarr, P.I. (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 342(26), 1930-1936. doi: 10.1056/NEJM200006293422601.
- Woodford, N., Carattoli, A., Karisik, E., Underwood, A., Ellington, M.J., and Livermore, D.M. (2009). Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 53(10), 4472-4482. doi: 10.1128/AAC.00688-09.
- Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., and McArthur, J.V. (2008). Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J* 2(4), 417-428. doi: 10.1038/ismej.2008.8.
- Wyrsh, E.R., Roy Chowdhury, P., Chapman, T.A., Charles, I.G., Hammond, J.M., and Djordjevic, S.P. (2016). Genomic Microbial Epidemiology Is Needed to Comprehend the Global Problem of Antibiotic Resistance and to Improve Pathogen Diagnosis. *Front Microbiol* 7, 843. doi: 10.3389/fmicb.2016.00843.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Sanchez Chacon, E., Saldana, Z., Freer, E., and Giron, J.A. (2009). Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *J Food Prot* 72(7), 1531-1537.
- Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., et al. (2004). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol* 42(8), 3483-3489. doi: 10.1128/JCM.42.8.3483-3489.2004.
- Zadik, P.M., Chapman, P.A., and Siddons, C.A. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 39(2), 155-158. doi: 10.1099/00222615-39-2-155.
- Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (1999). AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J Mol Biol* 285(1), 409-420. doi: 10.1006/jmbi.1998.2313.
- Zhang, L., Levy, K., Trueba, G., Cevallos, W., Trostle, J., Foxman, B., et al. (2015). Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 59(11), 6733-6740. doi: 10.1128/AAC.01094-15.

- Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T., and Karch, H. (2002a). Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 40(4), 1441-1446.
- Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., et al. (2002b). Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 40(12), 4486-4492.
- Zhang, X.X., Zhang, T., and Fang, H.H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 82(3), 397-414. doi: 10.1007/s00253-008-1829-z.
- Zimmermann, R.A., Moellering, R.C., Jr., and Weinberg, A.N. (1971). Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *J Bacteriol* 105(3), 873-879.
- Zong, Z., Partridge, S.R., Thomas, L., and Iredell, J.R. (2008). Dominance of *bla*_{CTX-M} within an Australian extended-spectrum beta-lactamase gene pool. *Antimicrob Agents Chemother* 52(11), 4198-4202. doi: 10.1128/AAC.00107-08.

RESUME

Titre : *Escherichia coli* entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques : contamination des effluents d'origine bovine

Les bovins sont porteurs de souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), pathogènes pour l'homme et également de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques. Dans un premier temps, nous avons évalué la fréquence de ces souches dans les effluents de station d'épuration des eaux usées de deux abattoirs, l'un de bovins adultes et l'autre de veaux de boucherie. Les pourcentages d'*E. coli* antibiorésistantes et porteuses d'intégrons de résistance de classe 1 étaient significativement plus élevés dans les effluents et boues d'abattoirs de veaux (87,5%, 56,2%) par rapport aux bovins adultes (5,0%, 0%). Ces pourcentages n'étaient pas modifiés par le traitement épuratoire. Le traitement épuratoire n'a également eu aucun impact sur les pourcentages de souches d'*E. coli* productrices de shigatoxines (STEC). Une souche STEC O157:H7 hautement pathogène a été isolée des boues destinées à l'épandage agricole dans la station d'épuration d'abattoir de bovins adultes. Ces résultats ont confirmé qu'il existe des risques de dissémination environnementale d'*E. coli* antibiorésistantes et/ou pathogènes *via* les effluents d'abattoir de bovins et ont mis en évidence que ce risque était différent selon la catégorie de bovins abattus. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la résistance de souches STEC du top 5 (O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7) isolées de fèces de bovins adultes. Sept des 39 souches STEC testées étaient résistantes, dont 6 à au moins 3 classes d'antibiotiques. Les souches non-STEC et aEPEC du top 5 d'*E. coli* de la flore fécale de ces mêmes bovins étaient toutes sensibles, indiquant un possible lien génétique entre gènes de résistance et virulence. Nous avons mis en évidence que le gène *ehxA*, marqueur fiable du plasmide de virulence des EHEC, et les gènes de résistance *bla*_{TEM}, *strA-strB*, *tet(A)*, *sulIII* étaient localisés sur un même plasmide de grande taille pour 4 souches STEC (1 O26:H11, 1 O103:H2 et 2 O111:H8). Cette association génétique soulève la problématique de la sélection clonale de ces souches pathogènes lors du traitement des bovins porteurs avec des antibiotiques.

Mots clés: *Escherichia coli*, EHEC, antibiorésistance, bovin adulte, veau de boucherie, effluents d'abattoirs

SUMMARY

Title: Enterohemorrhagic and/or antibiotic resistant *Escherichia coli*: contamination of bovine effluents

Cattle are known to be reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), pathogenic for humans and antibiotic resistant *E. coli* as well. In a first stage, we assessed frequencies of these strains in two bovine slaughterhouse wastewater treatment plants, one slaughtered only adult cattle and the other only veal calves. Percentages of resistant and class 1 integron-bearing *E. coli* were significantly higher in veal calves effluents and thickened sludges (87.5%, 56.2%) compared to those of adult cattle (5.0%, 0%). These percentages were not impacted by treatment process. The treatment had no impact on percentages of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) either. A STEC O157:H7 highly pathogenic for humans was isolated from the thickened sludge of the adult cattle slaughterhouse, intended to be spread on agricultural lands. These results confirmed that bovine slaughterhouse effluents might contribute to the environmental dissemination of antibiotic resistant and/or pathogenic *E. coli* and underlined that the risks of dissemination differ according to slaughtered bovine category. In a second stage, we assessed the antibiotic resistance of top 5 STEC (O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7) isolated from adult cattle fecal samples. Seven of the 39 top 5 STEC were resistant, of which 6 resistant to at least 3 classes of tested antibiotics. Non-top 5 STEC and aEPEC *E. coli* strains from fecal flora of the same bovine carriers were all susceptible to the tested antibiotics, indicating a possible link between EHEC-associated virulence genes and antibiotic resistance genes. We showed that *ehxA* gene, which is a reliable marker of the EHEC virulence plasmid, and antibiotic-resistance genes *bla*_{TEM}, *strA-strB*, *tet(A)*, *sulIII* were located on a same large plasmid in 4 antibiotic-resistant top 5 STEC strains (1 O26:H11, 1 O103:H2 and 2 O111:H8). This genetic association raises the concern about the clonal selection of such pathogenic strains by antibiotic use in bovine carriers.

Keywords: *Escherichia coli*, EHEC, antibiotic resistance, adult cattle, veal calf, slaughterhouse effluents