



**HAL**  
open science

# Caractérisation de nouveaux variants des fimbriae F17 et association à la virulence chez des souches pathogènes d'*Escherichia coli* isolées chez le veau

Morgan Bihannic

► **To cite this version:**

Morgan Bihannic. Caractérisation de nouveaux variants des fimbriae F17 et association à la virulence chez des souches pathogènes d'*Escherichia coli* isolées chez le veau. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10316 . tel-02434379

**HAL Id: tel-02434379**

**<https://theses.hal.science/tel-02434379>**

Submitted on 10 Jan 2020

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

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



N° d'ordre

Année 2015

THESE  
présentée devant  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
pour l'obtention du  
DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

ECOLE DOCTORALE 205 - EDISS  
École Interdisciplinaire Sciences-Santé

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2015  
par Morgan Bihannic

TITRE :

Caractérisation de nouveaux variants des fimbriae F17 et association à la virulence chez des souches pathogènes d'*Escherichia coli* isolées chez le veau

Directeurs de thèse : Jean-Yves MADEC et Eric OSWALD

JURY : Pr Patricia DOUBLET, examinatrice  
Dr Jean-Yves MADEC, examinateur et encadrant  
Pr Eric Oswald, examinateur et encadrant  
Dr Catherine SCHOULER, rapporteure  
Pr Christiane FORESTIER, rapporteure  
Pr Jacques MAINIL, rapporteur



**Résumé :** La bactérie *Escherichia coli*, habituelle commensale de la microflore intestinale des mammifères, peut être responsable de diarrhées chez les veaux nouveaux-nés. Parmi les *E. coli* pathogènes chez le veau, les souches nécrotoxigènes de type NTEC2 produisent des adhésines de la famille des fimbriae F17. Ces fimbriae sont caractérisés par un polymorphisme de leur piline F17A et de leur adhésine F17G, qui se traduit par l'expression de variants dont plusieurs n'ont pas encore été décrits. Cette thèse rapporte la caractérisation de deux nouveaux variants F17e-A et F17f-A de la piline et d'un nouveau variant F17-G3 de l'adhésine. Le variant F17f-A, qui correspond à une combinaison des variants F17c-A et F17d-A, a été identifié sur le plasmide Vir d'une souche NTEC2 isolée d'un veau diarrhéique. Identifiés respectivement chez des souches d'*E. coli* isolées de veaux diarrhéiques en Iran et une souche commensale bovine d'*E. coli*, les variant F17e-A et F17-G3 ont été recherchés et leurs supports génétiques caractérisés au sein de souches d'*E. coli* isolées de veaux sains et diarrhéiques, afin de déterminer leur association à la virulence. Alors que le gène codant le variant F17-G3 est exclusivement chromosomique – détecté notamment au niveau d'un probable îlot de pathogénicité, le gène codant le variant F17e-A est chromosomique ou associé aux gènes codant les toxines CNF2 et CDT-III – caractéristiques des souches NTEC2 – sur des plasmides IncF appartenant à une même lignée. Ces résultats confirment le lien entre fimbriae F17 et NTEC2 et mettent en évidence le rôle évolutif de supports plasmidiques dans l'émergence de ce pathovar.

**Mots-clés :** *Escherichia coli*, veau, diarrhée, fimbriae F17, variants, virulence, NTEC2

**Abstract :** The bacterium *Escherichia coli* is commonly found in the normal intestinal microflora in mammals but may be responsible for diarrhea outbreaks in newborn calves. Among pathogenic *E. coli* in calves, necrotoxigenic strains of NTEC2 type produce adhesins of the F17 fimbriae family. These fimbriae are composed of the polymorphic pilin F17A and adhesin F17G, for which several variants are unknown. In this thesis, the two new pilin variants F17e-A and F17f-A and the new adhesin variant F17-G3 were reported. F17f-A is a mix of the pilin variants F17c-A and F17d-A and was identified on a Vir plasmid in a NTEC2 strain isolated from a diarrheic calf. F17e-A and F17-G3 were identified in *E. coli* strains isolated from diarrheic calves in Iran and from a bovine commensal *E. coli* strain respectively. To determine their association to virulence, a screening of these variants was performed on *E. coli* strains isolated from healthy and diarrheic calves. The genetic carriage of these variants was also determined. The F17-G3 encoding gene was exclusively carried by bacterial chromosome, notably on a pathogenicity island. The F17e-A encoding gene was chromosomally located or in association with the encoding genes of the NTEC2 typical toxins CNF2 and CDT-III on IncF plasmids that belong to a same plasmidic family. These results confirm the link between F17 fimbriae and NTEC2 strains and underline the role of plasmids in NTEC2 pathovar evolution and appearance.

**Keywords :** *Escherichia coli*, calf, diarrhea, fimbriae F17, variants, virulence, NTEC2



# Table des matières

<b>Chapitre 1 - Cadre conceptuel et objectifs .....</b>	<b>7</b>
Introduction .....	7
I. <i>Escherichia coli</i> , une bactérie ubiquiste et versatile.....	8
II. <i>Escherichia coli</i> et pathologie bovine .....	12
II.1. Les <i>E. coli</i> entérotoxigènes (ETEC).....	12
II.2. Les <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC) .....	12
II.3. Les <i>E. coli</i> nécrotoxigènes (NTEC).....	13
II.4. Cas des <i>E. coli</i> responsables de mammites.....	15
III. Les facteurs de la virulence des <i>Escherichia coli</i> pathogènes chez les bovins .....	15
III.1. Les facteurs d'adhésion .....	16
III.1.1. Les adhésines fimbriaires .....	16
III.1.2. Les adhésines afimbriaires.....	19
III.1.3. Les protéines de la membrane externe de type intimine .....	21
III.2. Les toxines.....	22
III.2.1. Les entérotoxines .....	22
III.2.2. Les shiga-toxines.....	23
III.2.3. Les nécrotoxines.....	24
IV. Support génétique et association des facteurs de la virulence des <i>Escherichia coli</i> pathogènes chez les bovins .....	26
IV.1. Les éléments génétiques mobiles chez <i>E. coli</i> .....	26
IV.2. Portage et association de la virulence .....	30
Objectifs .....	33
<b>Chapitre 2 - Identification de trois nouveaux variants des fimbriae F17 chez <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>35</b>
Article 1 : Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in <i>Escherichia coli</i> strains isolated from cattle.....	37
<b>Chapitre 3 - Support génétique et association à la virulence de nouveaux variants des fimbriae F17 chez <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>57</b>
Article 2 : Divergent evolutions of repFII replicon of IncF plasmids carrying the Cytotoxic Necrotizing Factor <i>cnf2</i> , Cytolethal Distending Toxin <i>cdt III</i> and <i>fl7e-A</i> fimbriae variant genes in necrotoxigenic NTEC2 <i>Escherichia coli</i> from calves.....	59

Article 3 : Detection of related F-type plasmids carrying the Cytotoxic Necrotizing Factor <i>cnf2</i> , Cytolethal Distending Toxin <i>cdtIII</i> and <i>f17Ae</i> fimbriae variant genes in necrotoxicogenic NTEC2 <i>Escherichia coli</i> from healthy and diarrheic calves in France .....	75
<b>Chapitre 4 - Discussion et perspectives.....</b>	<b>87</b>
I. Synthèse des résultats .....	87
II. Discussion.....	88
II.1. Rôle biologique de la variation des fimbriae F17 .....	88
II.2. Lien des nouveaux variants identifiés avec la virulence des <i>E. coli</i> pathogènes chez le veau .....	89
II.3. Les souches NTEC2, des <i>E. coli</i> pathogènes "accidentels" du veau ?.....	92
III. Perspectives .....	94
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>97</b>

# Chapitre 1 - Cadre conceptuel et objectifs

---

## Introduction

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ce projet de thèse s'inscrit dans un contexte scientifique à l'interface entre médecine vétérinaire et microbiologie. La problématique en lien avec ce contexte est définie par l'identification des agents causatifs responsables de troubles cliniques digestifs – caractérisés essentiellement par la manifestation de diarrhées, chez le jeune bovin.

Les diarrhées du veau représentent une pathologie importante au sein des élevages bovins en raison de la fréquence élevée à laquelle elles se déclarent, ainsi que des pertes économiques conséquentes qu'elles engendrent (Holland, 1990; Millemann, 2009). Les diarrhées sont notamment responsables de plus de la moitié des cas de mortalité chez les veaux laitiers non sevrés, loin devant les troubles respiratoires et la dystocie (difficultés liées à la mise bas) (Cho and Yoon, 2014; USDA, 2010). Elles sont également responsables de retards de croissance chez les animaux qui survivent, d'une augmentation des coûts des traitements curatifs et préventifs et d'une réallocation du temps de travail des éleveurs, au détriment d'autres tâches indispensables au bon fonctionnement de leur exploitation agricole.

De façon générale, les diarrhées se déclarent chez le veau dans les quatre premières semaines après la naissance. Elles sont dues à l'action combinée de plusieurs facteurs tels que les agents infectieux – qui sont de nature virale, bactérienne ou parasitaire, les défauts de transfert de l'immunité passive via le colostrum maternel, l'environnement d'élevage (bâtiments), l'alimentation et la gestion du troupeau (concentration des animaux) (Schelcher, 2008). Les agents infectieux constituent dans la plupart des cas le facteur dominant.

Les agents pathogènes impliqués dans le déclenchement des diarrhées du veau sont identifiés dans 70 à 80% des cas. Lorsque l'agent infectieux est identifié, il s'agit principalement de rotavirus (40% à 50% des cas), voire de coronavirus (10% à 20% des cas), de cryptosporidies (15% à 25% des cas) ou de souches d'*Escherichia coli* entérotoxigènes (moins de 10% des cas) (Bendali et al., 1999; Reynolds et al., 1986; Snodgrass et al., 1986).

Les diarrhées infectieuses du veau se manifestent au sein des élevages bovins suivant un schéma épidémique général, qui est largement répandu. Au cours d'une saison de vêlage, l'apparition de diarrhées est observée après vingt à quarante naissances chez des veaux de moins de 10 jours, avec un accroissement du nombre de cas au fil de la saison de vêlage jusqu'au retour aux prés, où, à partir de ce moment, une diminution du nombre de cas est observée jusqu'à disparition complète de l'épidémie.

La bactérie *Escherichia coli* constitue un des agents infectieux impliqué dans le déclenchement de diarrhées chez le veau, représentée essentiellement par des souches entérotoxigènes, d'impact certes mineur. En réalité, ces souches ne sont pas les seules impliquées dans ce type de pathologies. La bactérie *E. coli* est en effet caractérisée par une

grande diversité de souches, dont certaines sont également responsables de pathologies chez la vache adulte. L'ensemble de ces souches, leur implication ainsi que les fonctions biologiques à l'origine de leur pouvoir pathogène, sont décrits tout au long de ce premier chapitre.

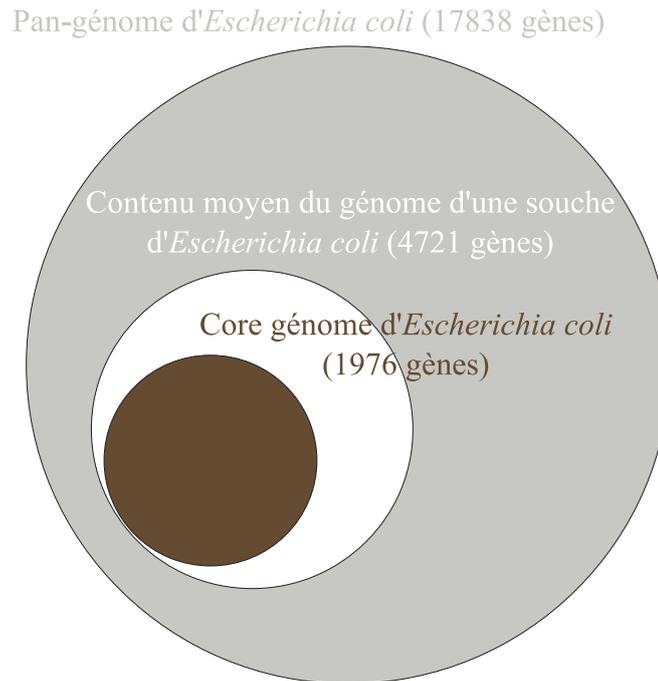
## **I. *Escherichia coli*, une bactérie ubiquiste et versatile**

En 1885, le pédiatre allemand Theodor Escherich, s'intéressant au rôle des microbes intestinaux dans la digestion et l'apparition de pathologies chez l'enfant, décrit la morphologie et les propriétés d'un bacille Gram négatif non sporulant qu'il isole fréquemment des selles de nourrissons (Escherich, 1885). Il nomme cette bactérie *Bacterium coli commune*. Renommée en hommage au pédiatre par Castellani et Chalmers en 1919, et de façon officielle à partir de 1958 (Shulman et al., 2007), la bactérie *Escherichia coli* est aujourd'hui l'un des micro-organismes les plus étudiés en biologie. Robuste, de croissance rapide, et facilement disponible, *E. coli* a été choisie dès le début du XXème siècle comme organisme modèle dans des études portant sur la physiologie bactérienne et les bactériophages (Bronfenbrenner, 1932; Werkman, 1927) et, par la suite, dans les premières études de Biologie moléculaire. Ainsi, c'est au sein de la bactérie *E. coli* que des mécanismes biologiques fondamentaux tels que le code génétique, la transcription, la traduction et la réplication ont été élucidés (Crick et al., 1961; Lehman et al., 1958; Stevens, 1960).

Au-delà de son utilisation comme organisme modèle en laboratoire, la bactérie *E. coli*, qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, est avant tout connue comme étant une bactérie colonisant le tractus intestinal des animaux à sang chaud et des reptiles, au sein duquel elle joue le rôle de bactérie commensale (Berg, 1996; Gordon and Cowling, 2003). Elle constitue d'ailleurs l'espèce bactérienne prédominante de la microflore normale anaérobie facultative de l'intestin chez la plupart des animaux à sang chaud, et notamment chez l'homme, dont la colonisation du tractus intestinal par *E. coli* démarre quelques heures après la naissance (Leimbach et al., 2013). *E. coli* fait ainsi partie du microbiote intestinal, véritable écosystème constitué de plus de 500 espèces bactériennes (Tenaillon et al., 2010), qui assure, en échange de conditions optimales de développement (substrat en abondance, environnement stable) offertes par l'hôte, des fonctions indispensables à ce dernier, telles que la modulation permanente du système immunitaire, la régulation de la prise de poids, la dégradation des aliments non digestibles, la synthèse de certaines vitamines et la protection contre la plupart des infections pathogènes (Neish, 2009).

La bactérie *E. coli* est par ailleurs capable de coloniser différentes niches écologiques. Ainsi, bien que sa principale niche écologique connue soit la surface luminale du colon des animaux à sang chaud, *E. coli* est capable de survivre dans les sols, l'eau, les sédiments ou la nourriture en attendant de coloniser un nouvel hôte (Savageau, 1983; van Elsas et al., 2011). Cette capacité à s'adapter à différentes niches écologiques est associée aux grandes capacités métaboliques d'*E. coli* ainsi qu'à l'acquisition par transfert horizontal de gènes spécifiques, portés par des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, des bactériophages, des

transposons ou encore des îlots génomiques (Frost et al., 2005; Wiedenbeck and Cohan, 2011). L'acquisition de ces gènes est à l'origine de l'importante plasticité du génome d'*E. coli*, caractérisée par la grande différence de taille entre son core génome et son pan-génome (Figure 1) : le core génome d'*E. coli*, c'est-à-dire l'ensemble des gènes communs à toutes les souches de l'espèce, n'est composé que d'environ 2000 gènes (représentant environ 40% du génome moyen d'une souche) sur un total de 18000 gènes identifiés au sein de l'espèce, qui constituent le pan-génome d'*E. coli* (Touchon et al., 2009).



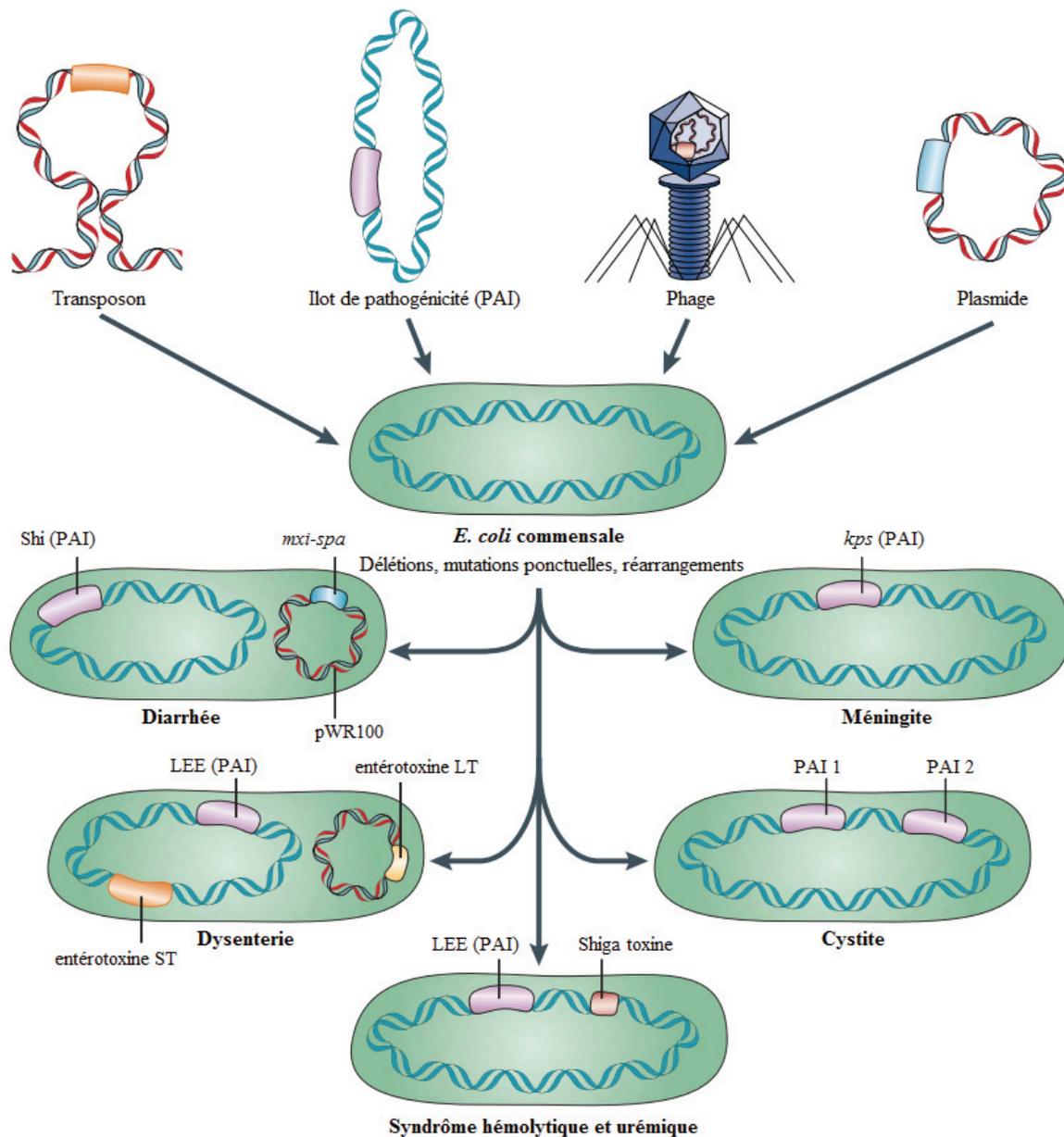
**Figure 1 : Etendue du potentiel génomique de la bactérie *Escherichia coli*.** Ce diagramme représente les proportions du pan-génome (gris), du contenu moyen du génome d'une souche (blanc) et du core génome (marron), établies pour un ensemble de souches d'*E. coli* séquencées (Touchon et al., 2009). D'après Hendrickson, 2009.

Dans certains cas, les gènes acquis par transfert horizontal par *E. coli* sont des gènes dits "de virulence" et la bactérie *E. coli*, habituelle commensale du tractus intestinal de son hôte, peut alors devenir pathogène pour ce dernier (Figure 2). Les souches pathogènes d'*E. coli* sont responsables d'infections intestinales – caractérisées par des diarrhées, ou extra-intestinales, telles que des cystites, des septicémies ou encore des méningites. Elles sont regroupées en pathovars (ou pathotypes), en fonction des symptômes qu'elles provoquent et des facteurs de virulence qu'elles produisent. Chez l'Homme, 6 principaux pathovars intestinaux ont été identifiés (Kaper et al., 2004) :

- les *E. coli* entéropathogènes ou EPEC (pour "Enteropathogenic *E. coli*"), qui provoquent des diarrhées aqueuses intenses ou persistantes, avec une forte incidence chez les jeunes enfants dans les pays en voie de développement,
- les *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC (pour "Enterohaemorrhagic *E. coli*"), qui sont responsables de diarrhées et de colites hémorragiques avec de graves complications pouvant déboucher sur un syndrome hémolytique et urémique ou SHU (insuffisance rénale sévère),
- les *E. coli* entérotoxigènes ou ETEC (pour "Enterotoxigenic *E. coli*"), qui sont à l'origine de diarrhées aqueuses aiguës chez les jeunes enfants dans les pays en voie de développement et responsables de la diarrhée du voyageur ou "turista",
- les *E. coli* entéro-agrégatives ou EAEC (pour "Enteraggregative *E. coli*"), qui sont associées à des diarrhées persistantes,
- les *E. coli* entéro-invasives ou EIEC (pour "Enteroinvasive *E. coli*"), qui sont responsables de diarrhées aqueuses associées à un syndrome dysentérique (forte fièvre, nausées, douleurs abdominales, diarrhées avec sang et mucus),
- les *E. coli* à adhésion diffuse ou DAEC (pour "Diffusely adherent *E. coli*"), qui sont responsables de diarrhées aqueuses intenses ou persistantes.

Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux humains sont quant à eux regroupés en 2 principaux pathovars, à savoir les *E. coli* uropathogènes ou UPEC (pour "Uropathogenic *E. coli*"), responsables de cystites, et les *E. coli* associées à des méningites ou MNEC (pour "Meningitis-associated *E. coli*"), qui sont à l'origine de méningites néonatales (Kaper et al., 2004). Suivant une convention différente, ces *E. coli* pathogènes sont regroupés sous un même pathovar : les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux ou ExPEC (pour "Extraintestinal pathogenic *E. coli*") (Russo and Johnson, 2000).

Certains des pathovars énoncés ci-dessus sont également impliqués en pathologie animale. Les souches pathogènes animales d'*E. coli* qui sont regroupées au sein de ces mêmes pathovars produisent des facteurs de virulence qui sont, pour la plupart, identiques, avec toutefois des facteurs de colonisation qui leur sont propres et ne sont pas retrouvés chez les souches pathogènes humaines d'*E. coli* (Kaper et al., 2004). Il existe également des pathovars d'*E. coli* qui sont spécifiques à certains animaux. Il s'agit par exemple des *E. coli* pathogènes aviaires ou APEC (pour "Avian pathogenic *E. coli*"), qui sont responsables chez les volailles d'infections extra-intestinales, telles que des infections respiratoires (aérosacculites), des septicémies, ou des dermatites (aussi appelées cellulites) (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999).



**Figure 2 : Contribution des éléments génétiques mobiles à l'évolution des *E. coli* pathogènes.** Les gènes codant les facteurs de virulence des *E. coli* pathogènes peuvent être portés par des éléments génétiques mobiles, tels que des transposons (entérotoxine ST) ; des plasmides (entérotoxine LT), des bactériophages (Shiga toxine) ou des îlots de pathogénicité (PAI, pour "pathogenicity island") comme le locus d'effacement des entérocytes (LEE). D'après Kaper et al., 2004.

Chez l'hôte bovin, à l'instar de ce qui est connu chez de nombreuses espèces animales et chez l'Homme, les souches pathogènes d'*E. coli* sont regroupées au sein de pathovars bien définis. Leurs caractéristiques et les facteurs à l'origine de leur pouvoir pathogène spécifique ont fait l'objet de nombreuses études et sont bien documentés.

## **II. *Escherichia coli* et pathologie bovine**

Chez les bovins, la bactérie *E. coli* est responsable d'un certain nombre de pathologies intestinales et extra-intestinales, telles que des mammites et des septicémies. La plupart des souches qui sont à l'origine de ces pathologies sont regroupées au sein de trois pathovars principaux : les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et les *E. coli* nécrotoxigènes (NTEC pour "Necrotoxicogenic *E. coli*") (Figure 3).

### **II.1. Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)**

Les *E. coli* entérotoxigènes ou ETEC sont essentiellement responsables de diarrhées aqueuses aiguës et sont fréquemment identifiées chez les animaux de rente (Nagy and Fekete, 2005). Elles sont notamment la principale cause de diarrhées néonatales et des diarrhées se déclarant dans les premiers jours suivant la naissance chez les bovins (Acres, 1985). Elles provoquent en revanche rarement des diarrhées chez les veaux plus âgés et les bovins adultes (Foster and Smith, 2009). La forte déshydratation engendrée par ce type de diarrhée entraîne, chez le veau nouveau-né, une perte importante de poids 6 à 8h après le début des symptômes et, en l'absence d'un traitement rapide avec des antibiotiques et un apport d'eau et d'électrolytes, elle peut provoquer la mort de l'animal (Gyles and Fairbrother, 2010).

Le pouvoir pathogène des ETEC repose en premier lieu sur la production d'adhésines qui vont permettre l'adhésion au niveau des cellules épithéliales de la partie iléale de l'intestin grêle de l'hôte. Parmi ces facteurs d'adhésion, on compte principalement les fimbriæ F5 (anciennement K99) et F41. Ce pouvoir pathogène repose par ailleurs sur la production d'entérotoxines qui stimulent la sécrétion d'électrolytes par les entérocytes et déclenchent par conséquent une diarrhée et une déshydratation. Ces entérotoxines sont de 2 types : les entérotoxines thermostables ou HT (pour "heat-stable") et les entérotoxines thermolabiles ou LT (pour "heat-labile") (Nagy and Fekete, 1999).

### **II.2. Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)**

Les *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC sont associées à des diarrhées mucoïdes, parfois hémorragiques, qui diffèrent des diarrhées aqueuses provoquées par les ETEC. Ces diarrhées sont observées chez des veaux nouveaux-nés et jusqu'à 8 semaines après la naissance (Kang et al., 2004; Lee et al., 2008; Wieler et al., 2007), avec un pic du nombre de cas chez des veaux âgés de 4 à 5 semaines (China et al., 1998). Rarement fatales mais souvent récurrentes, elles sont à l'origine d'une déshydratation importante et d'une diminution du taux de croissance du veau (DebRoy and Maddox, 2001). Chez le bovin adulte, le portage des EHEC est asymptomatique et les bovins adultes constituent d'ailleurs un réservoir connu d'EHEC humaines, notamment les redoutables souches de sérotype O157:H7 (Caprioli et al., 2005; Mainil, 1999).

Les EHEC sont définies par la capacité à induire des lésions intestinales caractéristiques appelées "lésions d'attachement et d'effacement" ou "A/E", et la production de Shiga toxines (Nataro and Kaper, 1998). Les lésions A/E se caractérisent par une adhésion bactérienne à la membrane des entérocytes ("attachement" aux entérocytes) et par une destruction des microvillosités ("effacement" de la bordure en brosse), ce qui a pour conséquence une inhibition de la capacité d'absorption par les entérocytes. Elles sont également définies par la production de Shiga toxines (ou Stx) dont l'action repose sur l'altération des ribosomes des cellules de l'hôte infectées après internalisation dans ces cellules, entraînant l'inhibition de la synthèse protéique et, par conséquent, la mort cellulaire.

Le rôle des EHEC dans le déclenchement de diarrhées chez le veau a longtemps été controversé. Plusieurs études d'infections expérimentales ont toutefois démontré leur implication (Dorn et al., 1993; Moxley and Francis, 1986; Stordeur et al., 2000; Wray et al., 1989). De la même manière, le rôle exact joué par les Shiga toxines dans le déclenchement des diarrhées est actuellement sujet à controverse. L'absence de récepteurs spécifiques des Shiga toxines observée au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de la muqueuse intestinale chez les bovins (Pruimboom-Brees et al., 2000), ainsi que la localisation lysosomale des Shiga toxines observée au niveau des entérocytes bovins – ayant pour conséquence leur inactivation (Hoey et al., 2003), suscitent de vives interrogations quant au rôle de ces toxines, bien qu'elles apportent dans le même temps un début d'explication à l'absence de signes cliniques systémiques observés chez le veau, en comparaison de ceux observés chez l'Homme (SHU). Par ailleurs, le rôle des lésions A/E, souvent considérées comme étant à l'origine du déclenchement des diarrhées à EHEC, est lui aussi discuté (Mainil and Daube, 2005). Les EHEC partagent en effet la capacité à former ce type de lésions avec les EPEC, dont elles sont considérées avoir dérivé sur un plan évolutif, au travers de l'acquisition de gènes codant l'expression de Shiga toxines (Reid et al., 2000; Wick et al., 2005). Les EPEC ne constituent cependant pas un pathovar majeur en pathologie bovine, leur importance n'ayant pas été démontrée (Foster and Smith, 2009). Aussi, comme pour les Shiga toxines, le rôle des lésions A/E dans le pouvoir pathogène des EHEC bovines n'est pas clairement établi, et il est probable que d'autres facteurs de virulence soient également impliqués dans le pouvoir pathogène de ces EHEC.

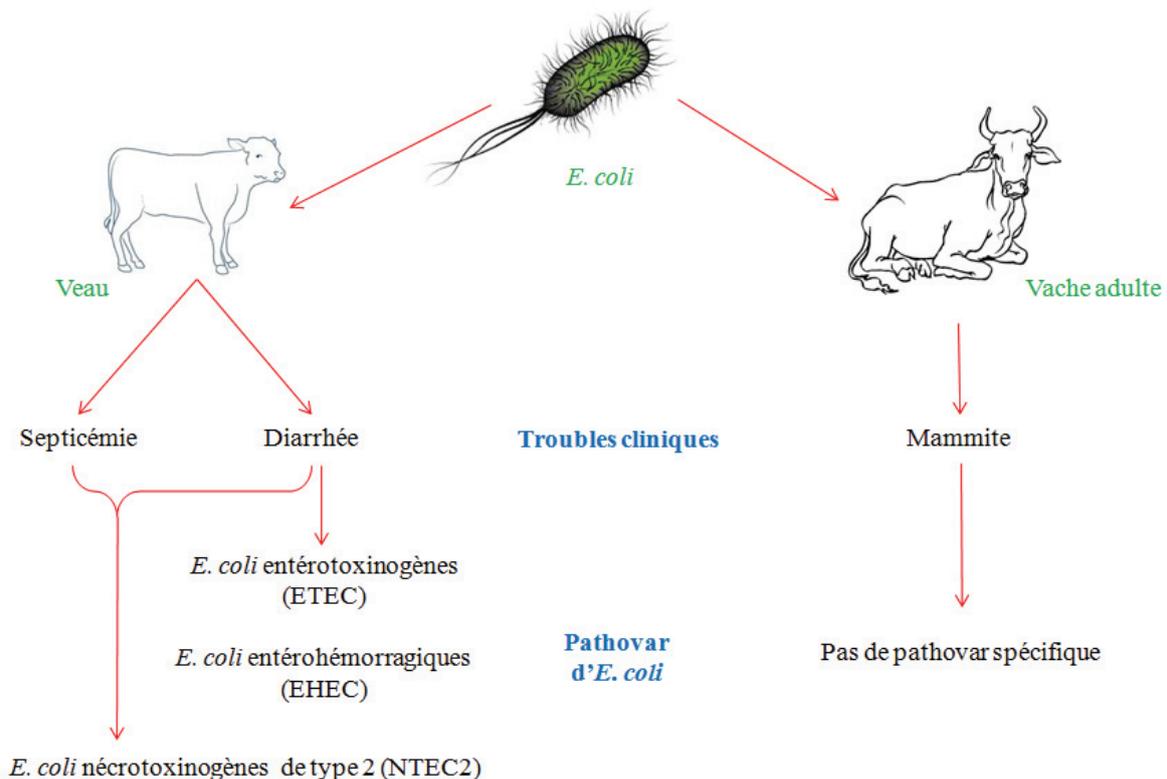
### **II.3. Les *E. coli* nécrotoxigènes (NTEC)**

Les *E. coli* nécrotoxigènes ou NTEC sont un groupe de souches pathogènes défini par la production de facteurs cytotoxiques nécrosants (ou CNF pour "cytotoxic necrotizing factor"), parmi lesquels 3 variants sont connus : CNF1, CNF2 et CNF3 (Caprioli et al., 1983; De Rycke et al., 1990; Orden et al., 2007). Les souches constituant ce pathovar sont à l'origine de diarrhées et diverses maladies extra-intestinales (cystites, méningites, septicémies) chez l'Homme et de nombreux animaux (De Rycke et al., 1999).

Au sein de ce pathovar, les souches appartenant au type NTEC2, défini par l'expression de CNF2, sont responsables de diarrhées et de septicémies chez le veau dans les premiers jours suivant la naissance (Fecteau et al., 2009; Orden et al., 1999). Chez les animaux plus

âgés, les NTEC2 sont couramment détectées au sein de la microflore intestinale sans toutefois être à l'origine de pathologies, avec une prévalence observée d'environ 50% chez les veaux sains et 20% chez les bovins adultes (Blanco et al., 1998a, 1998b; Burns et al., 1996).

Le pouvoir pathogène des NTEC2 repose principalement sur la production de la toxine CNF2, dont plusieurs modèles d'infection chez le veau nouveau-né ont mis en évidence l'implication dans le déclenchement de diarrhées et de septicémies (Van Bost et al., 2003, 2001b; Van Bost and Mainil, 1999). Le variant CDT-III de la toxine cytolétale distendante (ou CDT pour "cytolethal distending factor") est par ailleurs souvent retrouvé associé à CNF2 au sein des NTEC2 (Mainil et al., 2003; Pérès et al., 1997; Van Bost et al., 2001a). Egalement, plusieurs facteurs d'adhésion sont exprimés par les NTEC2, tels que les adhésines fimbriaires de la famille des fimbriae F17 (el Mazouari et al., 1994; Lintermans et al., 1988b), ou les adhésines afimbriaires AfaE-VIII (Girardeau et al., 2003), conférant aux NTEC la capacité à adhérer aux entérocytes et ainsi coloniser la muqueuse intestinale de l'hôte.



**Figure 3 : Schéma récapitulatif de l'implication des *E. coli* pathogènes chez les bovins.** Les pathovars ETEC, EHEC et NTEC2 d'*E. coli* sont impliqués dans le déclenchement de diarrhées chez le veau, ainsi que de septicémies dans le cas des NTEC2. A contrario, les *E. coli* impliqués dans l'apparition de mammites chez la vache adulte n'appartiennent à aucun pathovar spécifique.

## II.4. Cas des *E. coli* responsables de mammites

La bactérie *E. coli* est couramment identifiée comme l'agent responsable de mammites chez les vaches adultes (Zadoks et al., 2011), en particulier les vaches laitières en élevage intensif, dans les deux premières semaines suivant un vêlage. Ces mammites, parfois aiguës, sont associées à une inflammation légère à intense, avec des signes cliniques pouvant être sévères ou chroniques. Les souches à l'origine de ces mammites se caractérisent par une grande hétérogénéité (Lam et al., 1996; Lipman et al., 1995; Nemeth et al., 1994) et n'expriment pas de facteur de virulence spécifique (Bean et al., 2004; Suojala et al., 2011; Wenz et al., 2006). De fait, elles ne sont pas regroupées au sein d'un pathovar bien défini. Elles jouent en réalité le rôle de pathogènes opportunistes issus de l'environnement de l'hôte bovin, et leurs caractéristiques physiologiques ne forment pas le facteur déterminant dans le déclenchement de mammites.

Les facteurs liés à l'hôte bovin jouent un rôle bien plus important dans l'apparition de ce type de pathologie (Burvenich et al., 2003). Parmi ces facteurs, le statut physiologique de l'animal est déterminant puisque c'est lorsque l'animal est en période de péripartum que le risque de développer une mammite est le plus élevé. Cette période est en effet caractérisée par une relative immunosuppression, avec une captation plus faible du fer liée à une concentration plus faible en lactoferrine et une réponse retardée et plus faible des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles.

Dans la situation où l'hôte bovin est susceptible, du fait de son statut physiologique, de contracter une mammite, la réponse inflammatoire est induite par le lipopolysaccharide (ou LPS) d'*E. coli*, qui constitue le facteur bactérien majeur impliqué dans le déclenchement de mammites (Eberhart, 1977).

Les souches pathogènes bovines d'*E. coli* sont donc principalement responsables de diarrhées et de mammites, dont le déclenchement est grandement conditionné par le statut physiologique de l'hôte (âge, péripartum, etc.). Le portage fréquent des pathovars intestinaux chez les animaux adultes, ainsi que la variété des souches d'*E. coli* responsables de mammites en sont des indices évidents. Les souches pathogènes bovines d'*E. coli* à l'origine des ces infections sont regroupées au sein de pathovars aux caractéristiques variables, reflétant une diversité des profils de virulence. Cette diversité est directement liée à la variété de facteurs de virulence exprimés par ces souches.

## III. Les facteurs de la virulence des *Escherichia coli* pathogènes chez les bovins

La virulence des souches pathogènes d'*E. coli* chez les bovins repose sur l'expression de deux types de facteurs de virulence : les facteurs d'adhésion, qui confèrent à la bactérie

pathogène une capacité à adhérer aux cellules de l'hôte – étape préalable indispensable à la colonisation de l'hôte, et les toxines, qui sont à l'origine du pouvoir pathogène de la bactérie.

### **III.1. Les facteurs d'adhésion**

Les facteurs d'adhésion produits par les souches pathogènes bovines d'*E. coli* peuvent être regroupés en trois catégories distinctes : les adhésines fimbriaires, correspondant pour l'essentiel à des fimbriae, les adhésines afimbriaires et les protéines de la membrane externe de type intimine (Mainil, 2013).

#### **III.1.1. Les adhésines fimbriaires**

Les adhésines fimbriaires, ou fimbriae, correspondent à des appendices protéiques, rigides ou souples, ancrés à la membrane externe des cellules bactériennes. Elles sont en général constituées d'une sous-unité majeure (ou piline), qui constitue le corps de l'appendice, et d'une sous-unité mineure, située la plupart du temps à l'extrémité du fimbriae et qui joue le rôle d'adhésine. Ces 2 sous-unités présentent communément un poids moléculaire variant entre 15 et 30 kDa.

Historiquement, les fimbriae ont été classés suivant leur capacité à agglutiner aux érythrocytes de différentes espèces en présence de 0,5% de D-mannose, constituant 3 groupes : les fimbriae hémagglutinant sensibles au D-mannose, les fimbriae hémagglutinant résistants au D-mannose et les fimbriae non-hémagglutinant résistants au D-mannose (Duguid et al., 1955). Ce système de nomenclature est aujourd'hui obsolète et, même si aucun des systèmes concurrents n'est pleinement satisfaisant, il n'est plus utilisé. Le système proposé par Orskov (Orskov and Orskov, 1990), plus récent, tend à s'imposer au sein de la communauté scientifique.

Au sein de la catégorie des fimbriae hémagglutinant résistants au D-mannose, on compte principalement deux fimbriae associés aux *E. coli* pathogènes bovines, que sont les fimbriae F5 et F41. Egalement impliqués dans les pathologies à *E. coli* chez les bovins, les fimbriae F17 constituent une classe d'adhésines fimbriaires à part.

- Fimbriae F5 et F41

Les fimbriae F5 et F41 sont essentiellement produites par les ETEC responsables de diarrhées chez les veaux nouveau-nés. La découverte de ces fimbriae et de leur association aux ETEC est relativement ancienne (Braaten and Myers, 1977; de Graaf and Roorda, 1982). Considéré au départ comme des antigènes capsulaires, les fimbriae F5 ont initialement été nommés K99 avant d'être renommés suite à la démonstration du caractère fimbriaire de ces structures.

Les fimbriae F5 et F41 se présentent sous la forme de structures filamenteuses d'un diamètre d'environ 5 nm pour F5 (Nagy and Fekete, 1999) et 3 nm pour F41 (de Graaf and Roorda, 1982), et sont constituées principalement par l'assemblage d'une sous-unité majeure

de structure présentant un poids moléculaire de 18 et 29 kDa respectivement. Leur expression est dépendante de la température, notamment pour les fimbriae F5 dont la synthèse est inhibée dès lors que la température est inférieure à 30°C (van der Woude et al., 1990). Aucun récepteur des fimbriae F41 n'a été identifié jusqu'à aujourd'hui. En revanche, les structures reconnues par les fimbriae F5 sont connues : ces fimbriae reconnaissent spécifiquement des motifs N-glycolylneuraminique présents au niveau de la muqueuse intestinale chez le veau (Teneberg et al., 1993).

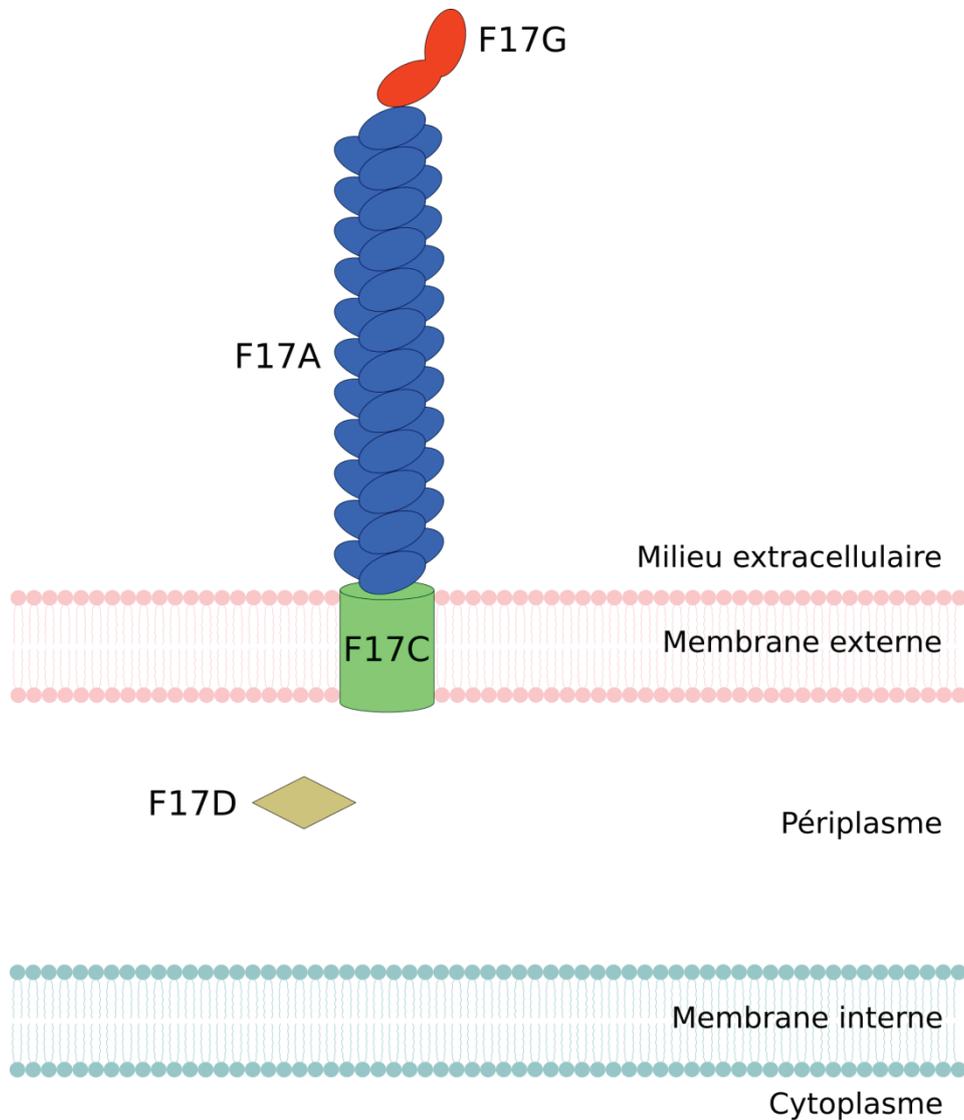
Sur le plan génétique, les fimbriae F5 sont codés par un ensemble de 8 gènes (*fanABCDEFGH*) regroupés au sein d'un cluster de gènes (de Graaf et al., 1984). Les gènes *fanA* et *fanB* codent pour des protéines régulatrices, qui contrôlent l'expression des fimbriae F5 (Roosendaal et al., 1987), *fanC* pour la sous-unité de structure des fimbriae F5 (Roosendaal et al., 1984), *fanD* pour une protéine d'ancrage (Roosendaal and de Graaf, 1989), et *fanE* pour une chaperonne périplasmique (Bakker et al., 1991). Les gènes *fanF*, *fanG*, *fanH* codent quant à eux pour de probables facteurs d'élongation (Simons et al., 1990, 1991). Aucune adhésine n'a cependant été clairement identifiée, et certaines hypothèses suggèrent que, comme pour les fimbriae F4 (anciennement K88), la piline FanC pourrait jouer le rôle d'adhésine, permettant aux fimbriae F5 de se fixer latéralement plutôt que par son extrémité (Gyles and Fairbrother, 2010). Contrairement aux fimbriae F5, la structure génétique des fimbriae F41 n'est pas bien définie. Seule la séquence codant la piline de F41 est connue (Fidock et al., 1989) et quelques gènes putatifs ont été identifiés sur un même locus, avec une organisation similaire à celle des gènes codant les fimbriae F5 (Anderson and Moseley, 1988).

- Fimbriae F17

Les fimbriae F17 sont détectés principalement chez des souches d'*E. coli* isolées de fèces de ruminants, et notamment des souches impliquées dans l'apparition de troubles cliniques intestinaux et/ou septicémiques chez les veaux nouveau-nés (Mainil, 2003). Ils sont en particulier retrouvés chez les souches d'*E. coli* appartenant au pathovar NTEC2 (Mainil et al., 1999; Van Bost et al., 2001a), chez lesquelles une forte association entre les fimbriae F17 et la toxine CNF2 est décrite (Orden et al., 1999).

Les fimbriae F17 correspondent à des filaments protéiques fins et flexibles de 3 à 4 nm de diamètre dont la structure est composée de deux sous-unités principales : une sous-unité majeure de structure, de type piline, appelée F17A, et une sous-unité mineure jouant le rôle d'adhésine, appelée F17G (Figure 4). Ces deux sous-unités présentent un poids moléculaire de 20 et 36 kDa respectivement (Lintermans et al., 1991, 1988b). La piline F17A joue un rôle structural important puisque le corps des fimbriae F17 est constitué par l'assemblage de centaines de copies de cette sous-unité (Le Bouguéneq and Bertin, 1999). L'adhésine F17G constitue une protéine bi-fonctionnelle avec une partie NH<sub>2</sub>-terminale impliquée dans ses propriétés d'adhésion et une partie COOH-terminale, très conservée, impliquée dans la biogenèse du fimbriae ou son intégration au fimbriae (Saarela et al., 1995). Cette caractéristique suggère que l'adhésine F17G pourrait être présente en plusieurs exemplaires, non seulement à l'extrémité des fimbriae mais également le long du corps du fimbriae, jouant

ainsi le rôle des sous-unités mineures de structure identifiées chez d'autres fimbriae (Girardeau and Bertin, 1995; Mainil, 2003). Sur le plan fonctionnel, les récepteurs des fimbriae F17 correspondent à des molécules contenant des motifs N-acétyl-D-glucosamine (Buts et al., 2003; Lintermans et al., 1988a).



**Figure 4 : Représentation schématique de la structure des fimbriae F17.** Les fimbriae F17 sont des hétéropolymères filamenteux, dont le corps est caractérisé par l'assemblage de copies de la piline F17A et la présence, au moins à leur extrémité, de l'adhésine F17G. L'assemblage des copies de la piline F17A est assuré par la chaperonne périplasmique F17D et les fimbriae F17 constitués sont insérés au niveau de la membrane externe de la bactérie par l'intermédiaire de la protéine d'ancrage F17C.

Les fimbriae F17 sont caractérisés par un certain degré de polymorphisme qui se traduit par l'existence de variants chez les deux sous-unités principales qui les composent. Ce

polymorphisme serait à l'origine de variations dans la spécificité des fimbriae F17 à leurs récepteurs ainsi que dans l'association à des facteurs de virulence et à l'apparition de troubles cliniques (Le Bouguéneq and Bertin, 1999; Mainil, 2003). Chez la piline F17-A, quatre variants antigéniques et génétiques (Tableau 1), présentant des séquences génétiques avec entre 73 et 93% de similitudes, sont actuellement connus :

- F17a-A, appelé en premier lieu antigène FY, identifié chez des ETEC bovines (Girardeau et al., 1979),
- F17b-A, anciennement connu sous le nom d'antigène Vir, identifié au sein d'une probable NTEC2 isolée chez un agneau atteint de septicémie (Morris et al., 1982),
- F17c-A, nommé initialement 20K, détecté la première fois chez des souches d'E. coli isolées de diarrhées de veaux (Bertin et al., 1996a),
- F17d-A, anciennement appelé fimbriae F111, caractérisé chez une ETEC bovine (Bertels et al., 1989).

Chez l'adhésine F17-G, deux variants génétiques F17-G1 et F17-G2 ont été décrits (Bertin et al., 1996b), qui sont associés de façon aléatoire aux quatre variants connus de la piline F17-A (Cid et al., 1999). Ces deux variants présentent 99% de similitudes au niveau de leurs séquences génétiques. Cependant, l'absence de détection par PCR de ces différents variants chez des souches pour lesquelles une production de fimbriae F17 est avérée suggère l'existence probable de variants qui n'ont pas encore été identifiés (Bertin et al., 1996b; Mainil et al., 2000).

La structure génétique qui code les fimbriae F17 est composée de quatre gènes, regroupés au sein du cluster de gènes *f17ADCG* (Figure 5) codant pour la piline (*f17A*), pour une chaperonne périplasmique (*f17D*), pour une protéine d'ancrage (*f17C*), et l'adhésine (*f17G*) (Bertin et al., 1996b; Lintermans et al., 1991). Aucun gène impliqué dans des fonctions de régulation de l'expression de ces quatre gènes n'a été identifié à ce jour.

Il est à noter que ces fimbriae exprimés par les souches pathogènes bovines d'*E. coli* constituent des candidats idéaux pour la confection de vaccins, de par leurs propriétés antigéniques (Moon and Bunn, 1993). Plusieurs formules développées les utilisent d'ailleurs comme valences vaccinales (Trivacton 6, Imocolibov), cherchant à induire une immunité passive des veaux nouveau-nés. Suivant ce principe de vaccination, les veaux sont immunisés par ingestion de colostrum contenant des anticorps spécifiques, du fait de la vaccination des mères avant mise bas (Contrepois, 1996; Contrepois and Girardeau, 1985).

### **III.1.2. Les adhésines afimbriaires**

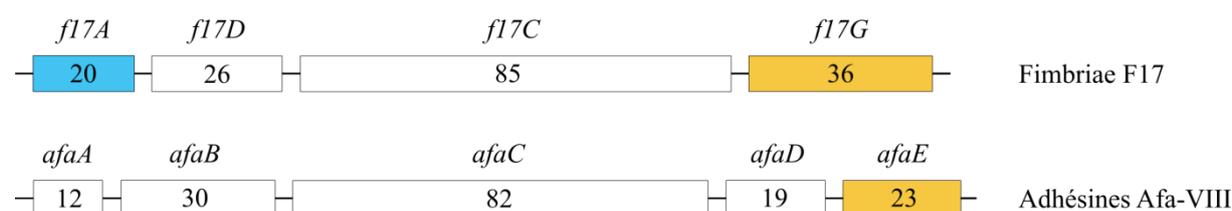
Les adhésines afimbriaires des *E. coli* pathogènes bovines sont regroupées pour la plupart au sein d'une même famille d'adhésines dénommée Afa. Ces adhésines, contrairement aux adhésines fimbriaires présentées précédemment, ne présentent pas de structure bien définie.

- Adhésines de la famille Afa

Les adhésines Afa sont retrouvées chez les souches NTEC2 isolées chez les bovins (Mainil et al., 1999, 1997), et en particulier les adhésines Afa appartenant au variant Afa-VIII (Gérardin et al., 2000; Girardeau et al., 2003; Lalioui et al., 1999). La détection de ces adhésines afimbriaires au sein des souches NTEC2 est d'ailleurs relativement ancienne (Van Bost et al., 2001a).

Sur le plan structural, les adhésines Afa peuvent être considérées comme des fimbriae tronqués dont la sous-unité majeure de structure aurait totalement disparu et dont les sous-unités mineures, situées à l'extrémité des fimbriae "normalement" constitués, se retrouvent au contact direct de la protéine d'ancrage située dans la membrane externe (Mainil, 2003). L'une de ces sous-unités mineures, la protéine AfaE, joue un rôle déterminant dans les propriétés d'adhésion des adhésines Afa et est appelée, en conséquence, adhésine. Cette adhésine AfaE se caractérise par l'existence de 8 variants, numérotés de I à VIII, présentant moins de 50% de similitudes entre leurs séquences génétiques respectives. L'adhésine AfaE-VIII, associée aux NTEC2, présente de fortes similitudes de séquences avec l'agglutinine M (97% d'identité), une adhésine afimbriaire décrite chez des souches uropathogènes humaines (Rhen et al., 1986). Ces similitudes suggère que le récepteur de l'agglutinine M, à savoir la glycophorine A<sup>M</sup> (Jokinen et al., 1985), pourrait également être un récepteur de l'adhésine AfaE-VIII. Le récepteur spécifique de l'adhésine AfaE-VIII exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales n'est toutefois toujours pas identifié.

Les adhésines Afa-VIII sont codées par un ensemble de 5 gènes regroupés en cluster (Figure 5). Ces gènes codent pour des fonctions de régulation (*afaA*), une chaperonne périplasmique (*afaB*), une protéine d'ancrage (*afaC*), une invasine potentielle (*afaD*), et l'adhésine (*afaE*).



**Figure 5 : Comparaison des clusters de gènes codant les fimbriae F17 et l'adhésine Afa-VIII.** Les clusters de gènes des fimbriae F17 et de l'adhésine Afa-VIII présentent une organisation similaire, avec la présence en position centrale des gènes codant leurs protéines d'ancrage et chaperonnes périplasmiques respectives (*f17C/f17D* et *afaB/afaC*). Les gènes codant leurs adhésines (en orange) sont situés en fin de cluster (*f17G*, *afaE*) et le gène codant la piline des fimbriae F17 (en bleu), est situé en début de cluster (*f17A*). Les nombres correspondent au poids moléculaire des protéines codés par chaque gène.

- Adhésine CS31A

L'adhésine CS31A constitue un autre type d'adhésine afimbriaire identifié chez des souches d'*E. coli* isolées de veaux atteints de diarrhées et de septicémies (Girardeau et al., 1988). L'association de cette adhésine avec les souches ETEC bovines ou NTEC2 n'est toutefois pas établi avec certitude, contrairement aux fimbriae F5, F41 et F17 et aux adhésines afimbriaires Afa-VIII (Kolenda et al., 2015).

L'adhésine CS31A forme autour de la cellule bactérienne, chez les souches qui la produisent, une structure de type capsulaire et reconnaît des récepteurs contenant des motifs N-acétylneuramidique (Le Bouguéneq and Bertin, 1999).

Génétiquement, la synthèse de cette adhésine est codée par un ensemble de gènes regroupés au sein d'un opéron appelé *clp*. Trois des gènes inclus dans cet opéron codent pour des fonction connues, à savoir la synthèse d'une adhésine (*clpG*) (Girardeau et al., 1991), la synthèse d'une chaperonne périplasmique (*clpE*) (Bertin et al., 1993), et des fonctions de régulation de l'expression de l'opéron *clp* (*clpB*) (Martin, 1996).

### **III.1.3. Les protéines de la membrane externe de type intimine**

L'intimine constitue l'adhésine principale des EHEC bovines. Elle est responsable de l'adhésion aux entérocytes de l'hôte au cours de la formation des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) (Nataro and Kaper, 1998). Ces lésions se caractérisent par l'effacement des microvillosités et un phénotype d'adhésion aux entérocytes impliquant l'accumulation de fibres d'actine à l'interface bactérie/entérocyte. Cette accumulation se traduit par la formation d'une structure en piédestal de la membrane des entérocytes au niveau du site d'adhésion de la bactérie (McDaniel et al., 1995). Il a notamment été démontré que l'expression de l'intimine est indispensable à la virulence des EHEC O157:H7 chez les veaux (Dean-Nystrom et al., 1998). On notera toutefois que l'identité de l'ensemble des facteurs d'adhésion exprimés par les EHEC bovines n'est pas encore aujourd'hui connue et qu'il est donc probable que d'autres adhésines soient impliquées dans l'adhésion de ces EHEC aux entérocytes chez le veau.

L'intimine est une protéine monomérique d'un poids moléculaire compris entre 94 et 97 kDa (Jerse and Kaper, 1991), située au niveau de la membrane externe de la cellule bactérienne. Elle est constituée d'une première région NH<sub>2</sub>-terminale très conservée de 700 acides aminés qui contient un domaine autotransporteur en tonneau β, permettant son ancrage à la membrane externe de la cellule bactérienne, et d'une seconde région COOH-terminale variable de 280 acides aminés, qui est exposée à la surface de la membrane externe de la cellule bactérienne (Frankel et al., 1995). Plus de vingt types d'intimines sont aujourd'hui connus (Lacher et al., 2006). Le principal récepteur de l'intimine est un récepteur spécifique appelé Tir (pour "Translocated intimin receptor") qui est injecté par le système de sécrétion de type III (ou SST3) au sein d'un entérocyte de l'hôte et réapparaît à la surface de cette cellule pour jouer son rôle de récepteur de l'intimine (Clements et al., 2012). Deux récepteurs alternatifs de l'intimine ont également été identifiés : il s'agit de la nucléoline et de l'intégrine

$\beta$ 1, deux protéines exprimées à la surface des cellules épithéliales de l'hôte (Frankel et al., 1996; Sinclair and O'Brien, 2004).

L'intimine et son récepteur spécifique Tir sont codés par les deux gènes *eae* et *tir* respectivement. Ces deux gènes sont portés par un îlot de pathogénicité de 35 à 45 kb appelé locus d'effacement des entérocytes (ou LEE). Cet îlot génomique code, en plus de l'intimine et de son récepteur Tir, pour les composants de structure du système de sécrétion de type III, des chaperonnes, des fonctions régulatrices, ainsi que des effecteurs protéiques sécrétés par le SST3, qui sont impliqués dans la transduction du signal dans les cellules épithéliales de l'hôte infectées (Dean and Kenny, 2009; Lai et al., 2013). Le locus LEE contient jusqu'à 50 gènes répartis dans 5 opérons (LEE 1 à LEE 5).

## **III.2. Les toxines**

Les toxines produites par les souches pathogènes bovines d'*E. coli* constituent les facteurs responsables de leur pouvoir pathogène. Elles sont de fait directement associées aux pathovars identifiés chez les bovins. Il en existe trois types : les entérotoxines, les shiga-toxines, et les nécrotoxines.

### **III.2.1. Les entérotoxines**

Les entérotoxines correspondent aux toxines produites par les ETEC. Elles sont réparties en deux classes, composées par les entérotoxines thermostables (ST), de faible poids moléculaire et résistantes à un traitement à 100°C pendant 15 minutes, et les entérotoxines thermolabiles (LT), de haut poids moléculaire (88 kDa) et inactivées par un traitement à 60°C pendant 15 minutes (Nagy and Fekete, 1999). Ces toxines provoquent des perturbations du métabolisme des fluides intestinaux sans toutefois produire de lésions ou de changements morphologiques de la muqueuse intestinale.

Parmi les entérotoxines thermostables, deux classes ont été définies, nommées STa et STb (Burgess et al., 1978). Chez les ETEC impliquées dans le déclenchement de diarrhées chez le veau, seule l'entérotoxine STa a été identifiée. Deux variants de cette toxine STa sont aujourd'hui connus : la toxine STaP, présente chez les ETEC bovines, porcines et humaines, et STaH, qui est spécifique des ETEC humaines. Ces 2 variants présentent peu de différences sur le plan génétique et fonctionnel, avec une partie COOH-terminale comportant 13 acides aminés très conservés (Nagy and Fekete, 2005).

L'entérotoxine STa, codée par le gène *estA* (So and McCarthy, 1980), correspond à un peptide de 18 à 19 acides aminés d'un poids moléculaire d'environ 2 kDa (Dreyfus et al., 1983), qui est synthétisé à l'état de pré-pro-peptide avec une taille de 72 acides aminés, avant d'être transporté à travers la membrane interne de la cellule bactérienne, replié dans le périplasma et sécrété à travers la membrane externe de la cellule bactérienne par la protéine de transport TolC (Nair and Takeda, 1998). Le récepteur de l'entérotoxine STa est constitué par une glycoprotéine appelée guanylyl cyclase C (GC-C), exprimée à la surface des cellules épithéliales intestinales situées au niveau des cryptes ou des villosités de la bordure en brosse

(Giannella and Mann, 2003; Schulz et al., 1990). De récentes études suggèrent toutefois l'existence probable d'autres récepteurs sur lesquels l'entérotoxine STa pourrait se fixer (Sellers et al., 2008).

Lorsque STa se fixe à son récepteur, elle provoque l'activation de la guanylate cyclase et par conséquent une stimulation de la production de GMP cyclique (GMPC) (Vaandrager, 2002). L'augmentation de la concentration en GMPC dans la cellule de l'hôte active alors la protéine kinase II GMPC-dépendante, entraînant la phosphorylation du canal chlore CFTR (pour "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator") et ainsi la sécrétion d'ions chlorures  $\text{Cl}^-$  et d'ions hydrogénocarbonates  $\text{HCO}_3^-$  et l'inhibition de l'absorption d'ions sodium  $\text{Na}^+$  par la cellule de l'hôte (Giannella and Mann, 2003; Turner et al., 2006). Cette sécrétion d'ions se caractérise par une sécrétion de fluides qui est à l'origine, à l'échelle de l'animal, de la manifestation de diarrhées aqueuses.

### III.2.2. Les shiga-toxines

Les shiga-toxines (Stx) tiennent leur nom de la bactérie *Shigella dysenteriae*, chez laquelle elles ont été décrites (Kaper et al., 2004). Bien que leur rôle exact dans le déclenchement de diarrhées chez le veau soit inconnu et même controversé, elles représentent le facteur de virulence critique de l'ensemble des EHEC (Caprioli et al., 2005).

Les toxines Stx sont constituées de deux sous-unités A et B et sont de type A-B<sub>5</sub>, la sous-unité B étant associée à la sous-unité A sous la forme d'un pentamère (cinq copies). La sous-unité A, d'un poids moléculaire d'environ 32 kDa, constitue la partie biologiquement active, et la sous-unité B, d'un poids moléculaire d'environ 7,5 kDa, se lie à un récepteur spécifique des cellules de l'hôte (Tesh and O'Brien, 1991). Les globotriaosylceramide ou Gb<sub>3</sub>, qui sont des glycolipides exprimés à la surface des cellules épithéliales et endothéliales de l'hôte, constituent les récepteurs des toxines Stx, sur lesquels elles se fixent avec une forte affinité (Lingwood et al., 1987).

Après fixation à leurs récepteurs, les toxines Stx sont internalisées dans les cellules de l'hôte par endocytose et transportées dans le réticulum endoplasmique après migration par l'appareil de Golgi. La sous-unité A des Stx est alors libérée dans le cytoplasme des cellules et est activée après le clivage d'un peptide COOH-terminal de 4 kDa appelé A<sub>2</sub>. La sous-unité active résultant de cette modification, appelée A<sub>1</sub>, peut alors cliver, de par son activité N-glycosidase, un résidu purine situé sur l'ARNr 28S et ainsi provoquer l'altération de la fonction des ribosomes. Cette altération provoque l'inhibition de la synthèse protéique au sein des cellules ciblées, qui vont finalement mourir (Gyles, 2007).

Les toxines Stx sont réparties en deux groupes, appelés Stx1 et Stx2 (Strockbine et al., 1986). Les toxines Stx1 sont identiques aux toxines Stx sécrétées par *Shigella dysenteriae* et les toxines Stx2 ne présentent que 56% de similitudes de séquence avec ces dernières (Takao et al., 1988). Ces deux classes de Stx sont par ailleurs polymorphiques et plusieurs variants ont été décrits : Stx1, Stx1c et Stx1d pour les toxines Stx1 et Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f et Stx2g pour les toxines Stx2. La majorité des EHEC bovines (plus de 85% d'entre elles)

sont porteuses de toxines Stx1 seulement. Lorsqu'elles sont porteuses de toxines Stx2, les seuls variants détectés sont Stx2 et Stx2c (Mainil and Daube, 2005).

Les sous-unités A et B des toxines Stx sont codées par deux gènes *stxA* et *stxB* rassemblés au sein d'une seule unité transcriptionnelle formant l'opéron *stxAB* (Mainil, 1999).

### III.2.3. Les nécrotoxines

Les nécrotoxines sont les principaux facteurs de virulence des NTEC. Chez les NTEC2, qui sont impliquées dans l'apparition de diarrhées et de septicémies chez les veaux nouveau-nés, le variant CNF2 du facteur cytotoxique nécrosant (CNF) et la variante CDT-III de la toxine cytolétale distendante (CDT) constituent les deux nécrotoxines impliquées dans leur pouvoir pathogène (De Rycke et al., 1999).

- Nécrotoxine CNF2

La nécrotoxine CNF2 constitue un des trois variants du facteur cytotoxique nécrosant (CNF) (cf. partie II.3). Il est le principal facteur de virulence des souches du pathovar NTEC2 dont il participe à la définition. Plusieurs modèles d'infection expérimentaux ont montré l'implication des souches rattachées à ce pathovar dans le déclenchement de diarrhées et de septicémies chez les veaux nouveau-nés (Van Bost et al., 2001b; Van Bost and Mainil, 1999). De la même manière, un modèle d'infection expérimental équivalent a démontré le rôle joué par la toxine CNF2 dans la manifestation de ces symptômes (Van Bost et al., 2003).

La toxine CNF2, qui est caractérisée par une activité nécrosante chez l'hôte (De Rycke et al., 1990), induit des effets de multinucléation sur des lignées cellulaires en culture (De Rycke et al., 1990; Oswald et al., 1989). Son activité *in vitro* sur des cellules en culture montre qu'elle active, par déamidation d'un résidu glutamine, des GTPases de la famille Rho qui régissent la physiologie du cytosquelette (Oswald et al., 1994; Sugai et al., 1999). Cette activation a pour conséquence une réorganisation des fibres d'actine en longs et épais filaments appelés fibres de stress, accompagnée de l'apparition de replis membranaires, d'une activation de la synthèse d'ADN et d'une stimulation des cellules en repos pour entrer en phase S du cycle cellulaire de la mitose, qui entraîne la mort des cellules par apoptose (De Rycke et al., 1999). L'entrée de la toxine CNF2 dans les cellules de l'hôte s'effectue par endocytose, après liaison à un récepteur non identifié et probablement ubiquiste, eu égard au large spectre de cellules sur lesquelles CNF2 présente une activité toxique. Une fois dans le cytoplasme des cellules hôte, le domaine catalytique de CNF2 est libéré et peut induire l'activité cytotoxique (Horiguchi, 2001).

Sur le plan moléculaire, la toxine CNF2 correspond à une protéine monomérique d'un poids moléculaire de 110 kDa, qui est codée par un gène unique nommé *cnf2* (Oswald and De Rycke, 1990). Elle peut être divisée en trois domaines : le premier, situé en partie NH<sub>2</sub>-terminale, constitue le domaine de liaison à la cellule de l'hôte, le second, en partie centrale, correspond à des régions de forte hydrophobicité qui pourrait représenter un domaine pour le franchissement de la membrane d'endocytose, et le troisième, en partie COOH-terminale, qui

est responsable des fonctions catalytiques, et donc cytotoxiques, de la toxine CNF2 (Van Bost and Mainil, 2003).

- Nécrotoxine CDT-III

La nécrotoxine CDT-III est détectée chez les souches du pathovar NTEC2, chez lesquelles elle est systématiquement retrouvée en association avec la nécrotoxine CNF2 (Mainil et al., 2003; Pérès et al., 1997; Van Bost et al., 2001a). Elle appartient à une famille de toxines composée, chez la bactérie *E. coli*, de cinq variants nommés de CDT-I à CDT-V (Bielaszewska et al., 2004; De Rycke et al., 1999; Tóth et al., 2003). Cette famille de toxines comprend également les variants CDT-s, identifié chez la bactérie *Shigella dysenteriae* (Okuda et al., 1995), CDT-c, identifié chez la bactérie *Campylobacter jejunii* (Pickett et al., 1996), et CDT-h, identifié chez la bactérie *Haemophilus ducreyi* (Cope et al., 1997). Le rôle de la toxine CDT-III reste encore aujourd'hui mal connu et son implication dans le déclenchement de diarrhées et de septicémies chez le veau n'a pu être démontrée (Van Bost et al., 2003).

L'étude *in vitro* de l'activité de la toxine CDT-III montre qu'elle induit le blocage du cycle cellulaire entre la phase G2 et la phase M de la mitose, provoquant la formation de cellules géantes mononucléées qui meurent ensuite par apoptose (Frisan et al., 2002; Pérès et al., 1997). Cette modification du phénotype cellulaire est liée à l'accumulation de la forme phosphorylée, et inactive, du régulateur du cycle cellulaire cdc2, qui est induite par l'activité désoxyribonucléasique, semblable à celle de la DNase I, de CDT-III. Cette activité de CDT-III suggère qu'elle pourrait avoir une action synergique potentielle avec CNF2 : CNF2, de par son activité mitogène, réactive le cycle des cellules de l'hôte au repos et les font entrer en phase S du cycle cellulaire puis CDT-III les bloque ensuite à la transition entre les phases G2 et M, ce qui se traduirait *in vivo* par une inhibition du cycle de renouvellement cellulaire et des altérations fonctionnelles au niveau des épithéliums, notamment celui de l'intestin. Une possible conséquence d'une telle action synergique serait un franchissement facilité des muqueuses ainsi affaiblies, favorisant le développement d'une septicémie (De Rycke et al., 1999; Mainil, 2003; Pickett and Whitehouse, 1999).

Sur le plan moléculaire, la toxine CDT-III est composée de trois sous-unités CdtA, CdtB et CdtC d'un poids moléculaire de 27, 29 et 19 kDa respectivement (De Rycke and Oswald, 2001). Elle peut être considérée comme un hétérotrimère de type A-B<sub>2</sub> au sein duquel CdtA et CdtC semblent se lier à la membrane des cellules de l'hôte et CdtB joue le rôle d'une génotoxine, du fait de son activité nucléasique semblable à celle de la DNase I. CdtB est internalisée par endocytose clathrine-dépendante après fixation de la toxine sur ses récepteurs cellulaires, probablement via CdtA et CdtC, et est transportée jusqu'au noyau de la cellule de l'hôte où elle va provoquer des lésions sur ses ADNs nucléaires (Guerra et al., 2011; Lara-Tejero and Galán, 2001; Nesić et al., 2004).

Les trois sous-unités composant la toxine CDT-III sont codées par trois gènes adjacents, nommés *cdtA*, *cdtB* et *cdtC*, qui sont rassemblés au sein d'un opéron *cdtABC* (De Rycke and Oswald, 2001; Nesić et al., 2004).

La virulence des *E. coli* pathogènes bovines repose pour l'essentiel sur l'expression d'un nombre limité de facteurs d'adhésions et de toxines. Ces facteurs sont associés de façon assez spécifique aux trois pathovars d'*E. coli* impliqués en pathologie bovine. Cette association résulte de processus évolutifs impliquant la mobilisation de structures génétiques variables qui sont porteuses des gènes codant ces facteurs virulence.

## **IV. Support génétique et association des facteurs de la virulence des *Escherichia coli* pathogènes chez les bovins**

Les capacités d'adaptation à différentes niches écologiques ou l'adoption de différents modes de vie et d'interaction avec l'environnement bactérien reposent essentiellement sur la modification de l'information génétique présente au sein de la cellule bactérienne. Cette modification résulte de trois processus majeurs qui consistent en (i) la modification de gènes déjà présents dans le génome bactérien, (ii) la perte de certains de ces gènes ou encore (iii) le gain de gènes étrangers à la bactérie (Cohan and Koeppel, 2008).

Le processus correspondant à la modification, voire l'inactivation ou le changement dans la régulation de gènes déjà existants dans le génome bactérien repose essentiellement sur l'apparition de mutations ponctuelles. Principal mécanisme évolutif chez les eucaryotes, il ne peut cependant pas expliquer à lui seul les capacités d'adaptation à différents environnements chez les bactéries (Ochman and Davalos, 2006). Par exemple, aucun des traits phénotypiques utilisés habituellement pour distinguer l'espèce bactérienne *E. coli* de l'espèce *Salmonella enterica* – bactérie pathogène qui lui est fortement apparentée, ne peut être attribué à des mutations ponctuelles au sein des gènes communs à ces deux espèces (Lawrence and Ochman, 1998).

En parallèle, un nombre croissant de preuves indiquent que l'acquisition de gènes étrangers via des transferts horizontaux joue un rôle important dans les capacités d'adaptation à différentes niches écologiques des bactéries (Gogarten et al., 2002). Ces transferts horizontaux tiennent notamment un rôle primordial dans l'acquisition de la virulence (Ochman et al., 2000). Ils impliquent des éléments génétiques mobiles qui sont porteurs des gènes codant pour les fonctions de virulence (Ziebuhr et al., 1999).

### **IV.1. Les éléments génétiques mobiles chez *E. coli***

Plusieurs types d'éléments génétiques mobiles ont été décrits chez *E. coli*. Quatre types d'éléments, transférés entre bactéries de différentes façons, sont régulièrement retrouvés (Figure 6) : les plasmides, les bactériophages, les transposons et les îlots de pathogénicité.

- Plasmides

Les plasmides correspondent à des molécules d'ADN extrachromosomiques, habituellement circulaires et de taille inférieure à celle du chromosome bactérien. Ils ne font pas partie du core génome des bactéries chez lesquelles ils sont présents. Ils sont capables d'autoréplication et sont distribuées aux cellules filles lors de la division cellulaire bactérienne (Frost et al., 2005; Sengupta and Austin, 2011). Certains plasmides, dits conjugatifs, sont porteurs de gènes qui permettent leur transfert par conjugaison, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'un système de sécrétion de type IV associé à l'expression, chez la bactérie *E. coli* et les bactéries Gram négatif en général, d'un pilus sexuel au travers duquel le plasmide est transféré à d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse (Bhatty et al., 2013). Les plasmides qui ne disposent pas des gènes codant les fonctions de transfert par conjugaison, utilisent ces fonctions codées par d'autres plasmides pour pouvoir être transférés. Pour ces plasmides, on parle de transfert par mobilisation.

Les plasmides sont porteurs de gènes qui codent pour une large variété de fonctions non essentielles à la bactérie, telles que la résistance aux antibiotiques, la virulence ou l'adaptation à différents environnements (Frost et al., 2005). Les fonctions de résistance aux antibiotiques sont d'ailleurs associées de longue date aux plasmides, qui sont fortement impliqués dans leur dissémination au sein des entérobactéries (Davies and Davies, 2010). L'ensemble des gènes qui codent pour ces fonctions sont greffés sur une ossature de gènes caractéristique qui code pour les fonctions de réplication du plasmide.

Les plasmides sont caractérisés par l'existence de groupes d'incompatibilité (ou Inc). Deux plasmides appartenant à un même groupe d'incompatibilité, c'est-à-dire qui partagent les mêmes mécanismes de réplication, ne peuvent coexister au sein d'une même cellule bactérienne. Chez *E. coli*, 26 groupes d'incompatibilité sont aujourd'hui connus (Johnson and Nolan, 2009).

- Bactériophages

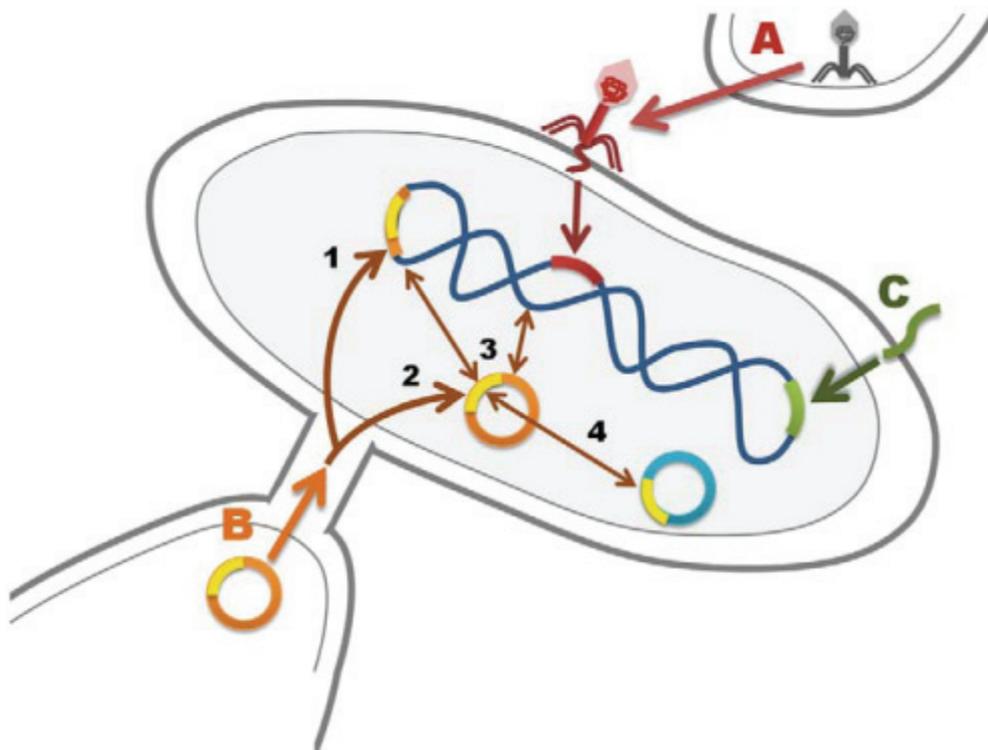
Les bactériophages sont des virus bactériens à réplication indépendante, composé d'ARN ou d'ADN. Les gènes caractéristiques essentiels des phages codent pour une réplicase spécifique, des composants phagiques qui détournent la machinerie répliquative de la bactérie infectée, et des protéines qui ont pour rôle d'empaqueter leur matériel génétique dans une capsid.

De façon générale, les bactériophages infectent une bactérie, lysent le chromosome bactérien et utilisent la machinerie cellulaire de la bactérie infectée pour répliquer leur matériel génétique. Après encapsidation des ADNs ou ARNs phagiques répliqués, de nouveaux phages sont libérés par lyse de la bactérie infectée. Ce schéma d'infection classique est appelé cycle lytique.

Les bactériophages peuvent toutefois constituer un vecteur de transfert d'ADN bactérien par un processus de transfert appelé transduction. On distingue deux types de transduction (Weinbauer, 2004) :

- une transduction dite généralisée, qui implique des phages en cycle lytique, et au cours de laquelle des fragments aléatoires d'ADN du chromosome bactérien lysé sont incorporés accidentellement au sein d'un phage qui, après lyse bactérienne, va infecter une nouvelle bactérie et ainsi les transférer,
- une transduction dite spécialisée, qui fait intervenir des phages en cycle lysogénique, c'est-à-dire internalisés dans le chromosome bactérien. Ces phages sont dits tempérés ou lysogènes, ou encore appelés prophages. Au cours de ce type de transduction, les prophages sortent de leur état de dormance sous l'effet de stimuli environnementaux et repassent en cycle lytique, et une excision imparfaite de l'ADN phagique permet à une région du chromosome bactérien adjacente au site d'insertion du prophage d'être transférée.

Au cours des processus de transfert de gènes par transduction, certains des phages formés peuvent être porteurs de gènes codant pour des facteurs de virulence (Brüssow et al., 2004). Les bactériophages sont notamment connus pour être porteurs de gènes codant des toxines chez de nombreuses espèces bactériennes (Boerlin, 2010; Croxen and Finlay, 2010).



**Figure 6 : Mécanismes de transfert d'ADN entre et au sein de bactéries.** La transduction (A) correspond à l'injection d'ADN dans une bactérie par un phage. La conjugaison (B) implique le transfert d'un plasmide d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse au travers d'un pilus sexuel. Une fois transféré, un plasmide peut s'intégrer au chromosome bactérien (1) ou rester dans le cytoplasme (2). Il peut par la suite être mobilisé à nouveau (3) et peut échanger des transposons avec d'autres plasmides ou le le chromosome bactérien (4). La transformation (C) se caractérise par l'assimilation d'ADN étranger issu de l'environnement. D'après Gyles et al., 2014.

- Transposons

Parmi les différents types de transposons, les transposons composites sont les principaux impliqués dans les transferts horizontaux de gènes.

Les transposons composites constituent une région d'ADN encadrée par 2 séquences d'insertion identiques. Les séquences d'insertion (ou IS pour "insertion sequences") sont de petits fragments d'ADN de taille inférieure à 2,5 kb, au sein desquels des gènes codant qui correspondent à un gène codant pour une transposase encadré à chaque extrémité par des séquences inversées répétées de 10 à 40 pb. La transposase codée coupe l'ADN cible et y insère les séquences d'insertion (Mahillon and Chandler, 1998).

Au niveau de ces transposons, les gènes présents entre les deux séquences d'insertion peuvent être mobilisés par les transposases codées par les séquences d'insertion. Ces gènes peuvent être impliqués dans la résistance aux antibiotiques, des fonctions de virulence ou l'adaptation à différents environnements (Frost et al., 2005). Des séquences d'insertion sont par ailleurs présentes au niveau de plasmides, suggérant qu'elles peuvent jouer un rôle dans l'insertion et l'excision de plasmides dans et depuis le chromosome bactérien (Gyles and Boerlin, 2014). Les transposons composites sont impliqués dans les mouvements des séquences d'ADN au sein de la bactérie mais peuvent également être transportés dans d'autres bactéries via le transfert de plasmides ou d'ADN chromosomiques dans lesquels les transposons se seraient insérés.

- Îlots de pathogénicité

Les îlots de pathogénicité constituent un sous-groupe des îlots génomiques, qui correspondent à des fragments larges (100 à 200 kb) d'ADN étranger insérés généralement dans le chromosome bactérien, souvent encadrés par des séquences répétées directes ou des séquences d'insertion. Ils présentent habituellement des gènes de mobilité en leur sein codant pour une intégrase ou une transposase et sont souvent insérés dans ou près de la séquence d'un gène codant un ARNt (Gal-Mor and Finlay, 2006). Les îlots génomiques sont en général insérés dans le chromosome bactérien mais ils sont parfois retrouvés au sein de plasmides (Gyles and Boerlin, 2014). Lorsque ces îlots sont porteurs de gènes de virulence, ils sont appelés îlots de pathogénicité (Ochman et al., 2000).

Les mécanismes de mobilisation des îlots de pathogénicité sont multiples. Ils incluent la conjugaison, la transduction ou encore la transformation (Juhas et al., 2009), qui correspond à l'assimilation par une bactérie compétente d'ADN étranger qui, après avoir traversé la paroi et la membrane bactériennes, est intégré essentiellement par recombinaison homologue (Johnsborg et al., 2007).

## IV.2. Portage et association de la virulence

Les gènes qui codent les facteurs de virulence des *E. coli* impliquées en pathologie bovine sont portés par différents types de structures génétiques. Ces portages sont à l'origine de divers profils d'association observés au sein des pathovars bovins d'*E. coli*.

- Portage et association de la virulence chez les ETEC bovines

Les principaux facteurs de virulence associés aux ETEC bovines, à savoir les fimbriae F5 et F41 et l'entérotoxine STa, présentent des profils de portage génétique variables. En effet le gène codant la piline des fimbriae F41 est détecté au niveau du chromosome bactérien (Gyles and Fairbrother, 2010) alors que les gènes codant les fimbriae F5 et l'entérotoxine STa sont localisés de façon prédominante sur des plasmides (Nagy and Fekete, 2005; Nataro and Kaper, 1998). Une forte association des gènes codant les fimbriae F5 et l'entérotoxine STa sur des plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité IncF est d'ailleurs observé chez de nombreuses ETEC bovines (DebRoy and Maddox, 2001; Mainil et al., 1992). Le gène codant la piline des fimbriae F41, bien que chromosomique, est toutefois souvent retrouvé associé aux gènes codant les fimbriae F5 chez les ETEC bovines.

Le portage plasmidique du gène *estA*, codant l'entérotoxine STa, est caractérisé, dans certains cas, par la présence de transposons dans lesquels est inséré le gène *estA*. Des séquences d'insertion encadrant le gène *estA* ont notamment été identifiées sur les plasmides d'ETEC, suggérant que ce gène a pu être mobilisé au sein de plasmides par des séquences d'insertion (Ochi et al., 2009; So and McCarthy, 1980).

- Portage et association de la virulence chez les EHEC bovines

Les principaux déterminants de la virulence des EHEC impliquées en pathologie bovine, correspondant aux gènes codant l'intimine et son récepteur Tir et les shiga-toxines (Stx), sont situés sur le chromosome bactérien. Ils sont systématiquement associés au sein des EHEC, constituant les facteurs de virulence à la base de la définition du pathovar des EHEC.

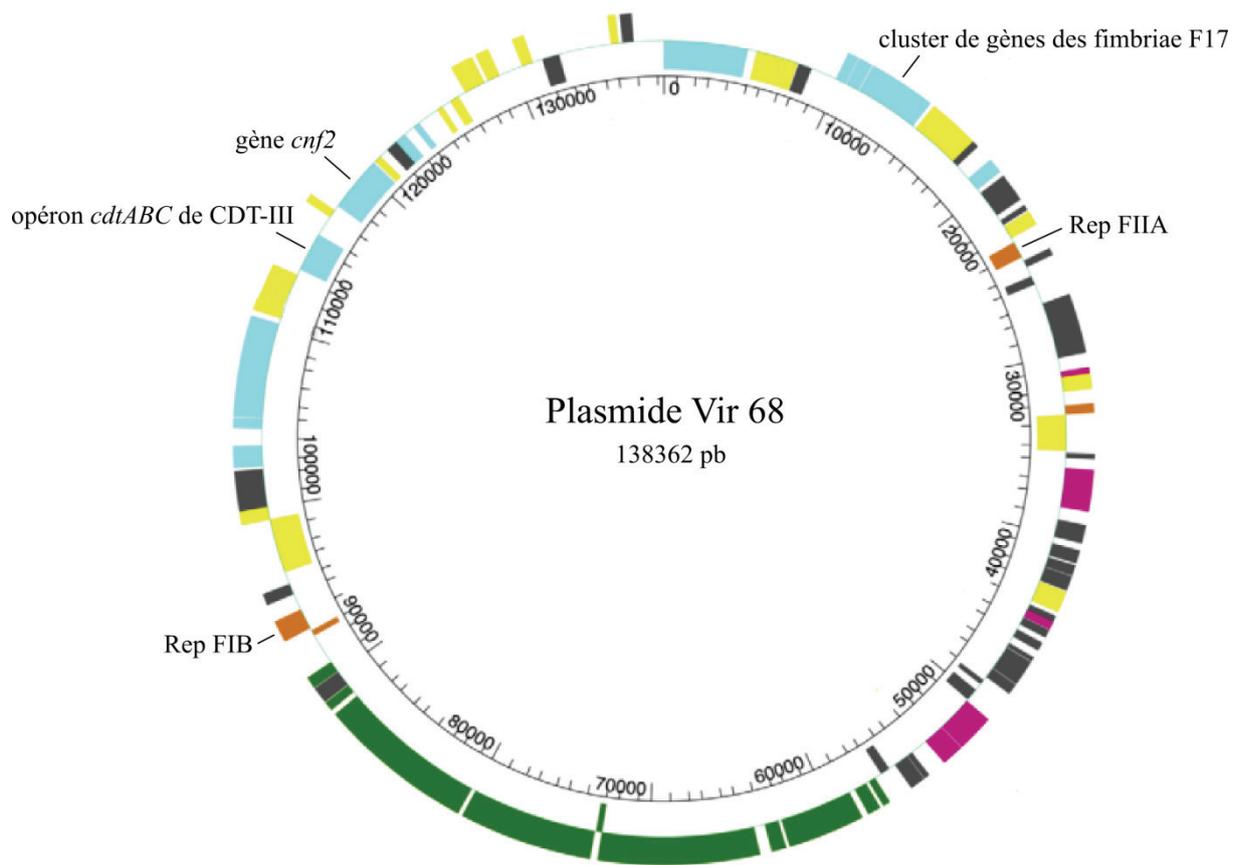
Les opérons *stxAB* codant les variants Stx1, Stx2 et Stx2c des shiga-toxines Stx1 et Stx2, qui sont les principaux variants identifiés chez les EHEC bovines, sont portés par des prophages lambdaïdes insérés dans le chromosome bactérien (Mainil et al., 1999; Mainil and Daube, 2005; Rietra et al., 1989). Les gènes *eae* et *tir*, codant respectivement l'intimine et son récepteur Tir, sont portés par le locus d'effacement des entérocytes, qui correspond à un îlot de pathogénicité de 35 à 45 kb, inséré au niveau du chromosome bactérien (Mainil and Daube, 2005).

- Portage et association de la virulence chez les NTEC2

De nombreuses études ont révélés l'existence de fortes associations entre les gènes codant pour des facteurs associés à la virulence chez les NTEC2. Les gènes codant la nécrotoxine CNF2 et les fimbriae F17 sont en effet très souvent retrouvés ensemble dans des souches NTEC2 (Bertin et al., 1996b; Orden et al., 1999). Ils sont aussi souvent retrouvés en présence des gènes codant l'adhésine afimbriaire Afa-VIII (Mainil et al., 1997) et de la nécrotoxine CDT-III (Van Bost et al., 2001a) au sein de ces mêmes souches NTEC2.

L'ensemble des gènes codant ces facteurs de virulence sont principalement portés par un même plasmide, appelé plasmide Vir (Gérardin et al., 2000; Johnson et al., 2010a; Mainil et al., 2000, 1997; Oswald et al., 1991; Pérès et al., 1997; Van Bost et al., 2001a). Le plasmide Vir est un plasmide appartenant au groupe d'incompatibilité IncF, décrit pour la première fois en 1974 (Smith, 1974) et rapidement identifié chez des souches d'*E. coli* responsables de diarrhées et de septicémies chez les veaux (Lopez-Alvarez et al., 1980; Lopez-Alvarez and Gyles, 1980). L'analyse d'un plasmide Vir de 138 kb, appelé plasmide pVir68, montre la présence des réplicons RepFIB et RepFIIA, ainsi que des gènes codant les nécrotoxines CNF2 et CDT-III et les fimbriae F17 (Johnson et al., 2010a). Ce plasmide est également caractérisé par le portage d'une région fonctionnelle impliqué dans le transfert plasmidique, associé au groupe IncF, et de régions impliquées dans la stabilité du plasmide et son maintien (Figure 7). De façon générale, les plasmides Vir semblent avoir évolué d'une façon spécifique en comparaison à d'autres plasmides de virulence, avec l'acquisition de facteurs de virulence via des événements de recombinaison sur une ossature génétique comportant des origines de réplication RepFIB et RepFIIA (Johnson and Nolan, 2009).

L'adhésine afimbriaire Afa-VIII et les fimbriae F17 présentent également d'autres profils de portage. Les gènes codant l'adhésine Afa-VIII ont en effet également été identifiés sur un îlot de pathogénicité de 61 kb inséré au niveau du gène codant un ARNt phénylalanine, sans être associés toutefois aux gènes codant les autres facteurs des NTEC2 (Lalioui and Le Bouguéneq, 2001). De la même façon, les gènes codant pour certains variants de la piline des fimbriae F17 peuvent être détectés au niveau du chromosome bactérien, comme c'est le cas du gène codant le variant F17a-A et plus rarement des gènes codant les variants F17c-A et F17d-A (Lintermans et al., 1988b; Mainil, 2003). Le gène codant le variant F17b-A est quant à lui essentiellement retrouvé sur le plasmide Vir (el Mazouari et al., 1994; Oswald et al., 1991).



**Figure 7 : Carte génétique du plasmide Vir68.** L'analyse de la séquence du plasmide Vir68 montre la présence de gènes impliqués dans sa stabilité et sa maintenance (en rose), dans des fonctions de transfert conjugatif (en vert), ou dans des fonctions de virulence (en bleu). La présence de réplicons de type RepFIIA et RepFIB (en orange) et de séquences d'insertion (en jaune) est également attestée. Parmi les gènes de virulence détectés, on note la présence des gènes *cnf2* et *cdtIII* et d'un cluster de gènes des fimbriae F17. D'après Johnson et al., 2010.

## Objectifs

Les souches d'*E. coli* responsables de diarrhées chez le veau nouveau-né sont réparties en plusieurs pathovars, exprimant une variété de facteurs de virulence. Parmi ces facteurs de virulence, les fimbriae F17, qui sont retrouvés de façon significative chez les souches d'*E. coli* appartenant au pathovar NTEC2, se caractérisent par un polymorphisme de la piline et de l'adhésine qui les constituent. Six variants de ces deux protéines ont, à ce jour, été décrits mais plusieurs études suggèrent qu'il existe, parmi toutes les souches d'*E. coli* productrices de fimbriae F17, des variants qui n'ont pas encore été identifiés.

Cette thèse a eu pour objectif principal d'identifier certains de ces variants non identifiés et de mettre en évidence leur lien avec la virulence, le cas échéant. Pour ce faire, les travaux réalisés pendant cette thèse ont été articulés suivant deux axes de recherche principaux :

1. Un premier axe visant à l'identification de nouveaux variants de la piline et de l'adhésine des fimbriae F17 chez des souches d'*E. coli* isolées de veaux atteints de diarrhées, ainsi qu'à la description de leurs séquences génétiques.
2. Un second axe ayant pour but la caractérisation des structures génétiques porteuses des gènes codant ces nouveaux variants et la détermination de leur association à la virulence des souches d'*E. coli* responsables de diarrhées chez le veau.



## Chapitre 2 - Identification de trois nouveaux variants des fimbriae F17 chez *Escherichia coli*

---

Ce chapitre développe le premier axe de recherche de cette thèse. Il expose les travaux ayant conduit à l'identification de trois nouveaux variants des fimbriae F17 chez des souches bovines d'*E. coli*. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication et sont présentés sous la forme d'un article scientifique.

Le premier variant identifié, nommé F17e-A, est un variant de la piline des fimbriae F17. Il a été découvert avec une forte prévalence au sein d'une collection de 58 souches d'*E. coli* isolées de veaux atteints de diarrhées en Iran. Ce variant est fortement apparenté au variant F17b-A, qui est fréquemment retrouvé chez les NTEC2. Le gène *fl7Ae*, qui code ce variant, a également été détecté sur un probable îlot de pathogénicité situé sur le chromosome de la souche commensale bovine MHI813, dont le génome est entièrement séquencé et qui est connue dans la littérature pour la description du variant Stx1d des shiga-toxines. Le variant F17e-A a en outre été très faiblement détecté au sein d'une collection de souches d'*E. coli* isolées de bovins adultes, suggérant une possible association à la virulence chez le veau.

En parallèle de la détection du variant F17e-A sur cet îlot génomique chez la souche MHI813, un second variant, concernant l'adhésine des fimbriae F17, a été identifié. Ce variant, appelé F17-G3, diffère de façon importante des deux variants F17-G1 et F17-G2 déjà décrits. Sa partie NH<sub>2</sub>-terminale ne présente en effet aucune similitude avec celle de ces deux autres variants, suggérant une spécificité de son récepteur ou de son tropisme d'hôte. De la même manière que pour le variant F17e-A, le variant F17-G3 a été recherché au sein d'une collection de souches d'*E. coli* isolées de bovins adultes mais n'a pas été détecté, suggérant là aussi une possible association à la virulence chez le veau.

Un dernier variant de la piline des fimbriae F17 a également été décrit et nommé F17f-A. Le gène *fl7Af*, qui code ce variant, a été détecté sur le plasmide Vir68 de la souche d'*E. coli* 6.0900. Ce plasmide, porteur des gènes *cnf2* et *cdtIII*, codant les nécrotoxines CNF2 et CDT-III, est à l'origine du pouvoir pathogène de cette souche, initialement isolée chez un veau atteint de diarrhée, et qui appartient au pathovar NTEC2. La séquence codante de ce variant correspond à une combinaison de la partie NH<sub>2</sub>-terminale du variant F17c-A et de la partie COOH-terminale du variant F17d-A, avec la présence entre ces deux parties d'une séquence très conservée de 30 pb commune à ces trois variants.



## Article 1 : Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle

Morgan Bihannic<sup>1,2,3</sup>, Reza Ghanbarpour<sup>4</sup>, Frédéric Auvray<sup>5</sup>, Laurent Cavalié<sup>6</sup>, Pierre Châtre<sup>3</sup>, Michèle Boury<sup>1,2</sup>, Hubert Brugère<sup>1,2</sup>, Jean-Yves Madec<sup>3</sup>, Eric Oswald<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> INRA USC1360, Toulouse, France

<sup>2</sup> Inserm UMR1043 / CNRS UMR5282 / Université Toulouse III, Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, France

<sup>3</sup> Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Anses Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup> Microbiology Department of Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

<sup>5</sup> Unité Ecophysiologie et Détection Bactérienne, Anses Maisons-Alfort, Maisons-Alfort, France

<sup>6</sup> CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

Article publié dans *Veterinary Research* 2014, 45:76.

### Abstract

F17 fimbriae are produced by pathogenic *Escherichia coli* involved in diarrhea and septicemia outbreaks in calves and lambs. These proteins result from the expression of four different clustered genes, namely *f17A*, *f17D*, *f17C* and *f17G*, encoding a pilin protein, a periplasmic protein, an anchor protein and an adhesin protein, respectively. Several variants of *f17A* and *f17G* genes have been reported and found genetically associated with typical virulence factors of bovine pathogenic *E. coli* strains. In this study, a new F17e-A variant, closely related to F17b-A, was identified from a collection of 58 *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran. While highly prevalent in Iranian F17-producing clinical isolates from calves, this variant was rare among *E. coli* from a French healthy adult bovine population, suggesting a possible association with virulence. The *f17Ae* gene was also found in the genome of the Shiga-like toxin variant Stx<sub>1d</sub>-producing bovine *E. coli* strain MHI813, and belonged to a gene cluster also encoding a new F17-G3 variant, which greatly differed from F17-G1 and F17-G2. This gene cluster was located on a pathogenicity island integrated in the tRNA *pheV* gene. The gene coding for a third new F17f-A variant corresponding to a combination of F17c-A and F17d-A was also identified on the pVir68 plasmid in the bovine pathogenic *E. coli* strain 6.0900. In conclusion, we identified three new F17-A and F17-G variants in cattle *E. coli*, which may also have significant impact on the development of new diagnostics and vaccination tools.

## Introduction

*Escherichia coli* is a predominant member of the normal aerobic intestinal microflora in mammals. However, due to the high genetic plasticity of the *E. coli* species, some *E. coli* strains may behave as pathogens and be responsible for a wide range of infections. These infections can be split into intestinal and extra-intestinal infections, such as urinary tract infection (UTI), meningitis or septicemia [1,2]. In veterinary medicine, different pathotypes of *E. coli* have been recognized, such as Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) in birds or Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in cattle. For pathogenic isolates, adhesion to host cells is an essential step before colonization and possible invasion, and these strains usually produce fimbrial or afimbrial adhesins to bind host cells receptors. In ruminants, some of them are involved in diarrhea (intestinal disease) or septicemia (extra-intestinal disease) outbreaks, particularly in newborn calves and lambs [3,4], and produce fimbriae of the F17 family. Despite an obvious association with virulence, the exact role of F17 fimbriae in the pathogenicity of *E. coli* remains unknown. These fimbriae were reported to bind N-acetyl-D-glucosamine (Glc-NAc)-containing receptors present on host intestinal epithelial cells in bovines [4,5]. They consist in fine filamentous heteropolymers composed of two main subunits: the structural major subunit F17-A, whose hundred copies are assembled to form the bulk of the fimbriae, and the adhesin minor subunit F17-G [4].

Among the F17 fimbriae family, several variants of the two subunits have been identified. This polymorphism was shown to result in changes in receptor specificity, in association with various virulence factors and clinical disorders [3]. Four variants of the major subunit F17-A are currently known : F17a-A, formerly named FY antigen and characterized in bovine ETEC strains [6]; F17b-A, formerly named Vir antigen and identified in *E. coli* strains isolated from septicaemic calves and lambs [7]; F17c-A, formerly called 20 K and associated with *E. coli* strains responsible for diarrhea or septicemia in calves [8]; and F17d-A, previously known as F111 and identified in bovine ETEC [9]. Two variants of the minor subunit F17-G have been identified : F17-G1 and F17-G2 [10], that are randomly associated with the 4 different variants of the subunit F17-A [11]. The F17 fimbriae are also expressed by a few human uropathogenic *E. coli* strains [12], and were described in these strains as G fimbriae [13], with two subunits GafA and GafD, that correspond to the variants F17c-A and F17-G2, respectively. Some of these variants are known to be associated with virulence factors involved in bovine pathogenesis, like CNF2 (cytotoxic necrotizing factor 2) or CDT-III (cytolethal distending toxin III) toxins [10,14,15], and the detection of these virulence factors and of F17 fimbriae is used to monitor their genetic flux and association. Two methods are widely used for the detection of F17 variants, i.e. immunological detection using specific anti-F17-A antibodies - no F17-G antibodies have been reported to date -, and PCR using either specific primers for the F17-A and F17-G variants encoding genes or consensual primers for the F17-A encoding genes family [8,10]. In F17-positive strains, negative PCR results with specific primers of every known F17 variant revealed the likely existence of unknown F17 variants [10].

In this study, we report the characterization of two new variants of the structural subunit F17-A in calves, that we propose to name F17e-A and F17f-A. A new variant of the F17-G

adhesin subunit, proposed as F17-G3, was also identified, in association with the new variant F17e-A on a pathogenicity island. Based on specific primers designed in this study, we also report a very weak prevalence of F17e-A and F17-G3 in *E. coli* from healthy adult cattle. Lastly, a widely used F17-producing isolates detecting antiserum was tested on reference strains for each variant of the major subunit and was found to detect the variant F17a-A only.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

*E. coli* strain MHI813 (ONT:H19 serotype) was isolated from a healthy bovine feces and shown to produce the new Stx1d variant of Shiga Toxin Stx1 [16]. *E. coli* strain 6.0900 (O36:H5 serotype) was isolated from feces of a calf with diarrhea and shown to harbor the pVir68 plasmid [17]. *E. coli* strains 25KH9, S5, 31A and 111KH86 [6–9] were used as positive controls for F17a-A, F17b-A, F17c-A and F17d-A variants, respectively (Table 1). All strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth (Invitrogen, Paisley, Scotland) for 16 h at 37 °C with 220 rpm shaking. For FY antiserum testing, *E. coli* isolates were grown overnight on polyvitaminic supplemented Minca medium (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France) at 37 °C.

**Table 1** : Strains used in this study

Bacteria	Strain	Fimbriae	F17-A-like subtype	F17-G-like subtype	Host	Pathology	Reference
<i>E. coli</i>	25KH9	F17	F17a-A	F17-G1	calf	diarrhea	Girardeau <i>et al.</i> , 1979
	S5		F17b-A	F17-G2	lamb	septicaemia	Morris <i>et al.</i> , 1982
	31A		F17c-A	F17-G2	calf	septicaemia	Bertin <i>et al.</i> , 1996
	111KH86		F17d-A	F17-G1	calf	diarrhea	Bertels <i>et al.</i> , 1989
	MHI813		F17e-A	F17-G3	cow	no path.	Bürk <i>et al.</i> , 2003
	6.0900		F17f-A	F17-G2	calf	diarrhea	Johnson <i>et al.</i> , 2009
	CK210	F17	F17a-A	F17-G2	lambs and goats kids	diarrhea	Cid <i>et al.</i> , 1999
	CK377		F17c-A	F17-G2			
	CL114		F17d-A	F17-G2			
	CL394		F17d-A	F17-G1			
IH11165	F17-related	GafA	GafD	human	cystitis	Martin <i>et al.</i> , 1997	
536		F17-A 536	F17-G 536	human	cystitis	Hochhut <i>et al.</i> , 2006	
<i>P. mirabilis</i>	HI4320	Uca	UcaA	UcaG	human	cystitis	Pearson <i>et al.</i> , 2008
	HU1069		UcaA	UcaG			Cook <i>et al.</i> , 1995
<i>B. cereus</i>	ATCC14579	Bcp	BcpA	BcpB	human	numerous	Budzik <i>et al.</i> , 2007

### **Collection of *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran**

Between March 2004 and June 2005, a collection of 58 *E. coli* isolates was recovered from rectal swabs of 58 diarrheic calves aged 3 to 14 days old, bred in 11 herds in the Kerman province, Southeastern Iran. The 11 herds were either in industrial or traditional rearing conditions without any history of antibiotherapy. Rectal swabs were immediately sent out to the laboratory in ice-cooled containers and streaked on MacConkey agar plates (Biolife Laboratories, Milan, Italy), which were incubated overnight at 37 °C. A single lactose-positive colony from the fecal culture from each calf was selected and confirmed biochemically to be *E. coli* (API 20E, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and stored at -80 °C in LB broth with 30% sterile glycerol. After DNA extraction, virulence-associated genes were detected by PCR with specific primers of the *aap*, *aggR* and *AA probe* genes [18], *f17A* genes family, *f17Aa*, *f17Ab*, *f17Ac*, *f17Ad*, *f17G1* and *f17G2* genes [10], *afaE-VIII* gene [19], F5 and F41 fimbriae encoding genes [20], *stx1*, *stx2* and *eae* genes [21], *ltI*, *stI* and *ipaH* genes [22], *pap E-F*, *afal (B-C)*, *sfa*, *hly* and *iucD* encoding operons [23], *cnf1*, *cnf2*, *cdtIII* and *cdtIV* genes [24] and *clpG* gene [25]. The primers used and expected sizes of PCR products are presented in Table 2. The PCR products were detected by 2% agarose gel electrophoresis and 3X GelRed staining. O serogroup of *E. coli* isolates were determined with 24 antisera provided by LREC, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain. Phylogenetic groups (A, B1, B2, or D) were determined by triplex PCR [26] and the combinations of three genetic markers *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 were used for phylogenetic subgroups determination (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B1, B2<sub>2</sub>, B2<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>) [27]. Clonality of isolates was investigated by Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) analysis. In brief, whole-cell DNA from *E. coli* isolates was digested with XbaI (for 16 h at 37 °C) after lysis by lysozyme and proteinase K. Electrophoresis of enzyme-generated fragments was performed with a contour-clamped electric field CHEF Mapper XA System apparatus (Bio-Rad) through a 1% agarose gel. Migration was performed for 30 h at 14 °C, with an electric field of 6 V/cm. DNA bands patterns were visualized with ethidium bromide, digitally photographed and analyzed with Gelcompar II 6.5 software. DNA bands size was determined from CHEF DNA Size Standard, Lambda Ladder (Bio-Rad) (Size range: 50–1000 kb).

### **In silico analysis of *E. coli* MHI813 genome and plasmid pVir68**

The localization of the F17 gene cluster on the genome of *E. coli* MHI813 was determined by nucleotide basic local alignment search tool (BLASTn) analyses on *E. coli* MHI813 whole genome shotgun (wgs) sequences (taxonomy ID: 754089, GenBank:AFDZ0100000000.1) using the nucleotidic sequences of the already described F17 variants. The genetic environment of the F17 cluster on the genome was determined using BLASTn analysis of *E. coli* MHI813 wgs sequence carrying F17 cluster on the entire nucleotide collection database. All automatic annotations of coding sequences located in the vicinity of the F17 cluster were also checked with Artemis software (Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK) and BLASTx analyses. The F17 cluster on pVir68 plasmid sequence (GenBank accession number: CP001162.1) was analyzed by BLASTn and *f17A* gene on pVir68 sequence was compared

with *f17Ac* and *f17Ad* genes from 31A and 111KH86 reference strains by alignment with ClustalX2 software.

### **Phylogenetic analysis of F17-A and F17-G variants encoding genes**

For F17-A and F17-G phylogenetic assessment, all nucleotidic sequences of F17-A and F17-G variants were obtained from GenBank [AF022140.1, L14318.1, L14319.1, L43373.1, L43374.1, L77091.1, AFDZ01000020.1, CP001162.1, AF055306.1, AF055307.1, AF055308.1, AF055309.1, AF055310.1, AF055311.1, AF055312.1, AF055313.1, L33969.1, L43372.1, CP000247.1, U28420.1, and AM942759.1]. The sequences corresponding to the fimbrial-encoding genes *BcpA* and *BcpB* from *Bacillus cereus* strain ATCC14579 [GenBank:AE016877.1] were used as outgroups for phylogenetic analyses of *f17A* genes and *f17G* genes respectively. The sequences were aligned with MEGA 5.2 software. Based on the F17 variants alignments, phenograms were drawn using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model [28].

### **F17e-A and F17-G3 variants PCR detection**

Two primers were designed with Primer3Plus software for specific PCR detection of the new variants F17e-A and F17-G3: 5'-CTGACTCCATTTACCATTGAGC-3' for F17e-A and 5'-GCCAAATAGTGGATATGAAACAAC-3' for F17-G3. These primers were set up in addition to the currently available multiplex PCR protocol for the detection of all known variants of F17-A and F17-G [10].

### **F17e-A and F17-G3 prevalence in a healthy bovine population in France**

A feces sampling campaign was performed on 787 healthy adult bovines entering in 6 slaughterhouses in Western France from October 2010 to March 2011. After enrichment in trypticase-soy novobiocine added broth overnight at 37 °C, the total DNA was extracted with the Food Extraction Pack kit (GeneSystems). A F17 screening was performed on the total DNA samples extracted from each bovine feces sample by qPCR with F17 common primers. On the F17-positive samples identified, F17e-A and F17-G3 were searched using specific primers as described above.

### **FY antiserum testing on F17A variants reference strains**

The FY antiserum (Biovac, Angers, France) was assessed by agglutination test on *E. coli* strains 25KH9, S5, 31A, 111KH86, MHI813 and 6.0900, which were used as reference strains for F17a-A, F17b-A, F17c-A, F17d-A, F17e-A and F17f-A variants respectively.

**Table 2** : Oligonucleotide primers used for detection of the virulence-associated genes detection on *E. coli* isolates from feces of calves with diarrhea in Iran.

Gene / DNA fragment	Primer Sequence (5'- 3')	Product size (bp)	Reference
<i>aap</i>	CTTGGGTATCAGCCTGAATG AACCCATTCGGTTAGAGCAC	310	Cerna <i>et al.</i> (2003)
<i>aggR</i>	CTAATTGTACAATCGATGTA AGAGTCCATCTCTTTGATAAG	457	Cerna <i>et al.</i> (2003)
<i>AA probe</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	629	Cerna <i>et al.</i> (2003)
<i>f17A</i> family	GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG CTGATAAGCGATGGTGTAATTAAC (P2)*	537	Bertin <i>et al.</i> (1996)
<i>f17Aa</i>	GCTGGAAGGGTGCAATACGCCTG	321	Bertin <i>et al.</i> (1996)
<i>f17Ab</i>	CAACTAACGGGATGTACAGTTTC	323	Bertin <i>et al.</i> (1996)
<i>f17Ac</i>	GCAGGAACCGCTCCCTTGGC	416	Bertin <i>et al.</i> (1996)
<i>f17Ad</i>	GATAGTCATAACCTTAATATTGCA	239	Bertin <i>et al.</i> (1996)
<i>f17G1</i>	CGGAGCTAATACTGCATCAACC TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	615	Bertin <i>et al.</i> (1996)
<i>f17G2</i>	CGTGGGAAATTATCTATCAACG TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	615	Bertin <i>et al.</i> (1996)
<i>afa E-VIII</i>	CTAACTTGCCATGCTGTGACAGTA TTATCCCCTGCGTAGTTGTGAATC	302	Lalioui <i>et al.</i> (1999)
<i>f5</i>	TATTATCTTAGG TGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC	314	Franck <i>et al.</i> (1998)
<i>f41</i>	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	380	Franck <i>et al.</i> (1998)
<i>stx1</i>	AGAGCGATGTTACGGTTTG TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	China <i>et al.</i> (1996)
<i>stx2</i>	TGGGTTTTTCTTCGGTATC GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	China <i>et al.</i> (1996)
<i>eaeA</i>	AGGCTTCGTCACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA	570	China <i>et al.</i> (1996)
<i>stI</i>	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	190	Aranda <i>et al.</i> (2004)
<i>ltI</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATCCCTGTT	450	Aranda <i>et al.</i> (2004)
<i>ipaH</i>	G TTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600	Aranda <i>et al.</i> (2004)
<i>papE-F</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>afaI B-C</i>	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>sfa/focDE</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>hly</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGC ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>iucD</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCG AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	602	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)

<i>cnf1</i>	GGGGGAAGTACAGAAGAATTA TTGCCGTCCACTCTCACCAGT	1111	Toth <i>et al.</i> (2003)
<i>cnf2</i>	TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC GTCACAATAGACAATAATTTTCCG	1240	Toth <i>et al.</i> (2003)
<i>cdtIII</i>	GAAAATAAATGGAATATAAATGTCCG TTTGTGTCGGTGCAGCAGGGAAAA	555	Toth <i>et al.</i> (2003)
<i>cdtIV</i>	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC TTGCTGCAGAATCTATACCT	350	Toth <i>et al.</i> (2003)
<i>clpG</i>	GGGCGCTCTCTCCTTCAAC CGCCCTAATTGCTGGCGAC	402	Bertin <i>et al.</i> (1998)
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Clermont <i>et al.</i> (2000)
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCTCAAC	211	Clermont <i>et al.</i> (2000)
TspE4.C2	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	Clermont <i>et al.</i> (2000)

\*P2 was used as common reverse primer for *f17A* family, *f17Aa*, *f17Ab*, *f17Ac*, *f17Ad* detection

## Results

### A new F17e-A variant of the F17 fimbriae major subunit was detected in diarrheic calves in Iran

Among the 58 *E. coli* isolates recovered from diarrheic calves in Iran, various virulence-associated genes were identified, such as the *hly*, *iucD* or *afaE-VIII* genes (Table 3). Interestingly, 20 out of 28 F17-A-positive isolates (71.4%), which were also shown to carry the F17-G2 variant, could not be further characterized using specific PCR for the F17-A variants. These isolates originated from 7/11 herds and corresponded to 5 *E. coli* clones (I to V), as shown by PFGE (Figure 1). Clone I and II were closely related with 90% identity on their PFGE patterns and included 11 ONT and 2 ONT and 1 O101 isolates respectively. Clone III included 3 ONT isolates, one of them carrying the enterotoxigenic *E. coli* characteristic genes *LT-I* and *ST-I*, clone IV included a single O15 isolate and clone V included 2 ONT isolates, which were found to carry the typical bovine necrotoxicogenic *E. coli* genes *cnf2* and *cdtIII* [29,30]. The PCR product obtained with F17-A common primers on one *E. coli* isolate of the most prevalent clone (clone I) was sequenced and compared to the F17-A variants sequences by ClustalX2 software alignment. The F17-A PCR product sequence was found to share from 73 to 93% identity with the sequences of the four already described F17-A variants, suggesting that it was corresponding to a new variant that we named F17e-A. A specific forward primer for this new variant was designed to be used with the common reverse primer P2, which is used for detection of the *f17A* family, *f17Aa*, *f17Ab*, *f17Ac*, and *f17Ad* genes [10]. A PCR with the F17e-A specific primer was then performed on all other 19 uncharacterized F17-A *E. coli* isolates, that were found to carry the new variant F17e-A.

**Table 3 :** Detection and identification of F17 genes variants and virulence-associated genes in the collection of *E. coli* isolates from feces of calves with diarrhea in Iran.

Isolate	Herd	Sampling date	Serogroup	Phylogroup	F17A	F17a-A	F17b-A	F17c-A	F17d-A	F17e-A	F17-G1	F17-G2	Other virulence-associated genes	
2		march-04	-	B1-1										
10		march-04	-	B1-1	+					+		+		
30		may-04	-	B1-1	+					+		+		
44	1	may-04	O8	B1-1										
38		may-04	-	B1-1	+					+		+		
49		june-04	-	B1-1										
52		june-04	O8	B1-1										
64		march-05	O157	A-1									<i>afaE-VIII, iucD</i>	
16		april-04	-	B1-1										
68	2	april-05	-	B1-1	+			+				+	<i>iucD</i>	
73		june-05	-	D-1									<i>afaE-VIII, clpG, iucD</i>	
45	3	may-04	-	B1-1										
57		june-04	O15	B1-1	+		+				+			
4		march-04	O8	B1-1										
3	4	march-04	O8	B1-1										
29		april-04	-	B1-1	+					+		+		
56		june-04	O8	A-1									<i>afaE-VIII, iucD</i>	
25		april-04	-	B1-1	+	+						+		
35	5	may-04	-	B1-1	+	+						+		
63		march-05	O49	B1-1										
5		march-04	-	B1-1	+					+		+		
26		april-04	-	B1-1	+					+		+		
28	6	april-04	O101	B1-1	+					+		+		
32		may-04	-	B1-1	+					+		+		
51		june-04	O141	B1-1										
54		june-04	-	B1-1										
9		march-04	-	B1-1	+					+		+		
11		march-04	O8	B1-1	+			+				+	<i>iucD</i>	
14		march-04	-	B1-1	+					+		+		
46		may-04	-	B1-1	+					+		+	<i>cnf2, cdtIII</i>	
43	7	may-04	O8	B1-1										
33		may-04	-	B1-1	+					+		+	<i>cnf2, cdtIII</i>	
66		march-05	O8	A-2										
69		april-05	O8	A-2										
75		june-05	O8	B1-1	+			+				+	<i>iucD</i>	
74		june-05	O8	B1-1	+			+				+		
19		april-04	-	B1-1	+					+		+		
34		may-04	-	B1-1	+					+		+		
47		may-04	-	B1-1	+					+		+		
48		june-04	-	B1-1	+					+		+	<i>stI, ltl</i>	
53	8	june-04	-	A-1									<i>iucD</i>	
59		june-04	-	B1-1										
62		march-05	-	B1-1										
65		march-05	-	D-1										<i>hly</i>
71		april-05	O8	B1-1										
39	9	may-04	O15	B1-1	+					+		+		
31		may-04	-	B1-1										

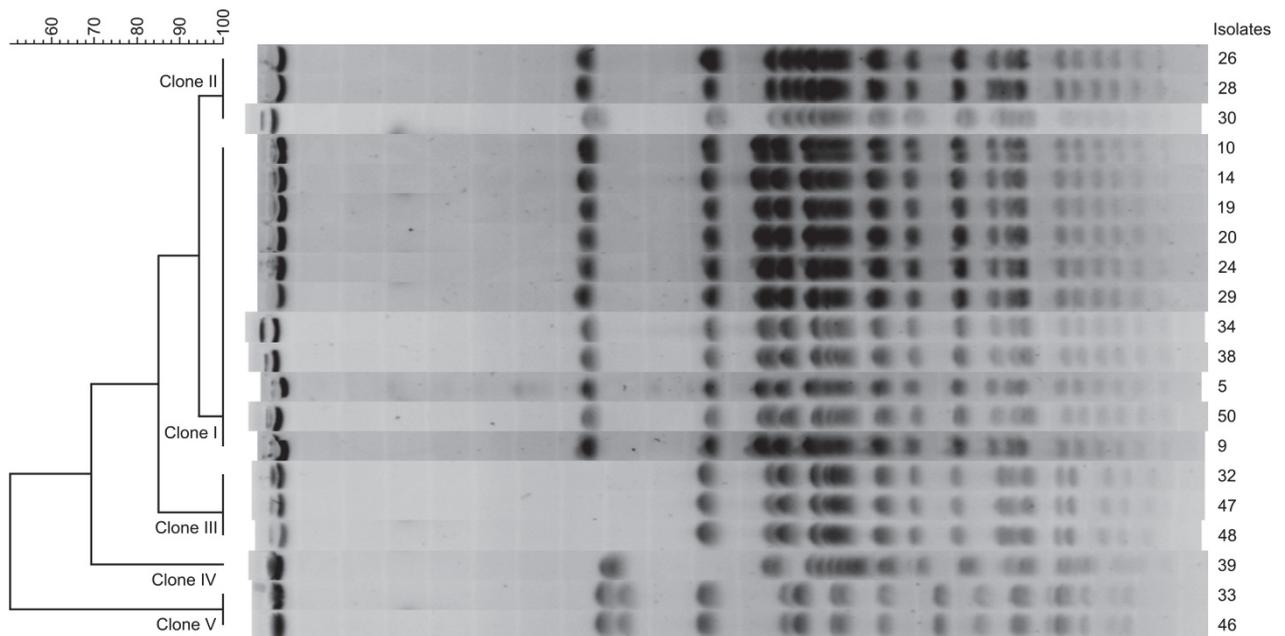
60		june-04	O49	B1-1				
70		april-05	-	A-1				
27		april-04	O8	B1-1				
20		april-04	-	B1-1	+		+	+
24		april-04	-	B1-1	+		+	+
37	10	may-04	O8	B1-1				
41		may-04	O8	B1-1				
50		june-04	-	B1-1	+		+	+
72		april-05	O15	B1-1	+		+	+
55		june-04	-	D-1				<i>stI, ltl</i>
61	11	june-04	-	A-2				<i>hly</i>

### **The F17e-A variant is encoded on a gene cluster carried by a pathogenicity island on *E. coli* MHI813 genome, in association with a new variant F17-G3 of the minor subunit**

The MHI813 strain was previously detected to be positive with F17-A common primers PCR but tested negative with F17a-A, F17b-A, F17c-A, and F17d-A specific PCRs as well as with F17-G1 and F17-G2 specific PCRs (data not shown). However, the MHI813 strain was now found positive using the newly designed F17e-A specific primer. To identify the localization and the genetic environment of the *fl7Ae* gene on MHI813 genome, the wgs sequence of MHI813 strain was used. The *in silico* analysis of MHI813 genome revealed that the F17 fimbriae encoding genes, ie *fl7A*, *fl7D*, *fl7C* and *fl7G*, were organized in a gene cluster, which was identified on the contig 19 of MHI813 strain wgs sequence. The N-terminal half of the adhesin encoding gene *fl7G* on MHI813 genome also showed no identity with the same part of the adhesin genes of the other variants. This result suggests the expression of a very different adhesin in MHI813 strain, that we named F17-G3, and for which we developed a specific primer for its detection by PCR. The nucleotide sequences of *fl7Ae* and *fl7G3* genes located on MHI813 genome are presented in Table 4. The F17 cluster was otherwise found to be carried by a genomic island, that straddles the contigs 19 and 20 of MHI813 wgs sequences. This genomic island was shown to be inserted in the tRNA *pheV* gene. Other putative genes were found as well, notably a P4-like integrase gene close to *pheV* gene, and gene clusters and operons like type VI secretion system gene cluster, microcins I47 and H47 gene cluster (Figure 2), suggesting that it actually constitutes a pathogenicity or fitness island.

### **The F17e-A and F17-G3 prevalence in healthy bovines in France is very low**

To further assess the genetic flux of these two new variants F17e-A and F17-G3, we investigated their prevalence in faecal samples from 787 healthy adult cattle in 6 slaughterhouses in Western France. Among the 787 samples analyzed, 373 were found positive for F17 by qPCR. On the 373 F17-positive samples, 3 were shown to be positive for F17e-A (3/373, 0.8%). No F17-G3 positive sample was detected.



**Figure 1** : PFGE profiles of the 20 uncharacterized F17-producing isolates of the collection of *E.coli* isolates from feces of diarrheic calves in Iran. The PFGE profiles were analyzed with Gelcompar II 6.5 software, using Dice similarity coefficient, 0% optimization, 1% tolerance and UPGMA clustering method. 5 clones were identified, named from clone I to clone V.

### **Plasmid pVir68 carries a new variant F17f-A, which corresponds to a combination of F17c-A and F17d-A**

The 6.0900 strain was previously detected positive by PCR with F17-A common primers, and with F17c-A and F17d-A specific primers (data not shown). The 6.0900 strain plasmid pVir68, which was sequenced by Johnson et al. [17], is known to carry a F17 fimbriae encoding gene cluster. To clarify the F17-A status of 6.0900 strain, an *in silico* analysis of the plasmid pVir68 sequence was undertaken. It showed that the *f17A* encoding gene on pVir68 corresponds to a combination of F17c-A and F17d-A variants, with the N-terminal part corresponding to the same part on *f17Ac* gene and the C-terminal part corresponding to the same part on *f17Ad* gene (Figure 3). A 30 bp highly conserved area was also identified between the *f17Ac* gene corresponding N-terminal part and the *f17Ad* gene corresponding C-terminal (264–292 bp area on plasmid pVir68 *f17A* gene). Sequencing of F17c-A specific PCR product obtained on 6.0900 strain was then performed, and the *in silico* analysis of the genetic sequence of the PCR product confirmed that the *f17A* gene of pVir68 was a combination of *f17Ac* and *f17Ad* genes. We proposed F17f-A for this new variant of the major subunit. *f17Af* nucleotide sequence is presented in Table 4.

**Table 4 :** Nucleotide sequences of the new F17 variants genes *f17Ae*, *f17Af* and *f17G3*.

***f17Ae* gene (GenBank:AFDZ01000020.1\_420293-420832)**

ATGCGGAAAATTCAATTTATCCTTGGAACTACTGGCGGCTGCGTCATCTTCTGCTACGCTTGCTTATGACGGTACA  
ATTACTTTTTAATGGAAAAGTTGTTGCTCAGACTTGTCTGTTTCATCAGGAAGCAAGAATTTAACCGTTACATTA  
CCGACTGTTTCTGAAGCTTCATTGGCTGCCGCAACAAATACTGCAGGTCTGACTCCATTTACCATTGAGCTGACC  
GGGTGTGATACCAATGCAGCTTCTGGTGCTCAGAACGTAAAAGCTTATTTTGAACCTAACGCCACGACTGATTAC  
GATACGGGTAATCTAAATATTGCTGCCAGTGGTGCAAATAACGTTTCAGATACAGCTTCTAAATGCAGATGGAGTT  
ACTCCAATAAAACTAGGCCAAGATGCTACAGGACAGAATGTTACAGCTGTACAGATTGATAACGCAGCTATGAAA  
CTGCGTTATAATGCACAATATTATGCCACAGCTCAGGCTACAGCTGGTGATGTCTCTGCCACAGTAAATTACACC  
ATCGCGTATCAGTAA

***f17Af* gene (GenBank:CP001162.1\_9749-10297)**

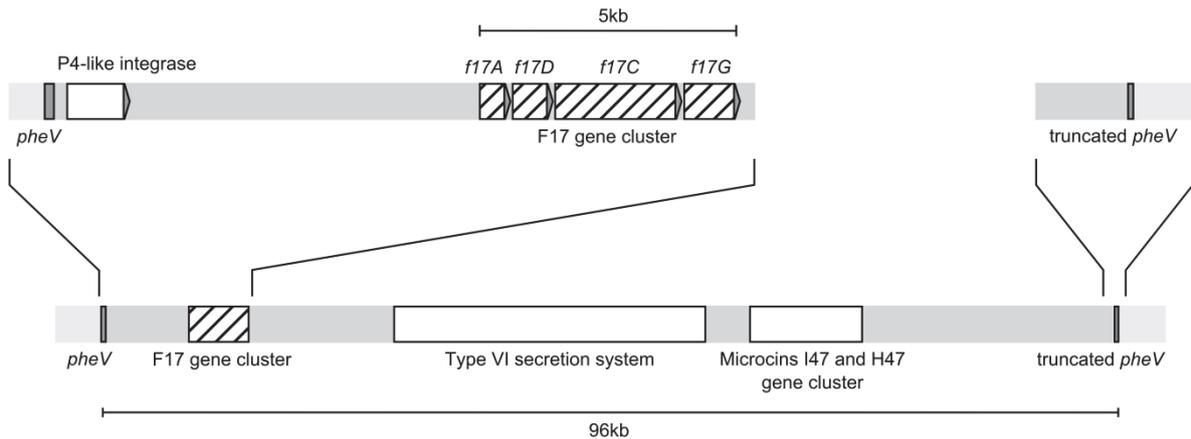
ATGCAGAAAATTCAATTTATCCTTGGAACTACTGGCGGCTGCGTCATCTTCTGCTACGCTTGCTTATGACGGTACA  
ATTAATTTTACTGGGAAAGTCGTTGATCAAACCTTGTCTGTTACTACAGGAACCGCTCCCTTGGCAGTTACACTA  
CCAACCTGTCTCCACAAAATCATTAGATTCAACCGGGAAGGTAGCAGGCCTTACTCCTTTCACAATTTCACTGAGT  
GGGTGTAATACTGCTGCCGCTACAGGAGCTCAAAGTGTGAAGGCTTATTTTGAAGCTAATGCGACCACTGATTAT  
GATAGCCATAACCTTAATATTTCAAGTAGTGGCTCTGGTAACGCAACAAATGTCCAGATTGAGCTTCTGAATGCT  
GATGGTACCACACAGATACTACTTGGTAATGATTCTGCTACTCAGGGAGTAACACCTGTTGTTATTAATAATGAC  
GCAATGACATTGCGTTATAACGCACGGTACTATGCAACAGGTGAGGCCACCGCCGGCAACGTTTCTGCCACTGTG  
AATTACACCATCGCTTATCAGTAA

***f17G3* gene (GenBank:AFDZ01000020.1\_424180-425235)**

ATGATTTTTCAGATATATCAGATTATTTTTAGTTGTACTTTGCAGTGTTGTTCTGTTGACAGGGGAAACGCAGCA  
TCTTTGTTAATATCACGTTTGTGCGTAATGCTGAACAAACAATCACACCATCATCTGCATATACACTGACGCAT  
GCAATGGATAATCTGCCTTACGTGTTTCGATGAGGCGGGAGTAAGTATTGGTTATTCCGCGGTTACTGTCTGGCAA  
TATCCACGAGGGGTAAGAGTGTGTGCCGGGCTTGATGCAAAAGTTGGTTTACCCGTAGTGGGTAGCATTAAATGGT  
CAGGATATCTATGGCGTCACTGATGAAGTGGGGCTGCTGGTATGGATGGGGGATGCCGGATATTCAGATGATGTT  
GCAATGACCGGAAATACGTGGACAAATGTACTGGATTTCATGGTGTACAGCAAACGTTCCCTCCAACGAGCCAGGGA  
CTATCCCTTTATGTAACCTGTCAATTTAAAAGAAGTACTACTGCTTCTTATGTTATCCCTCAGACGACAATA  
GGTAGTATTAAGTTTCGTCTGGAAGATGGGCCAAATAGTGGATATGAAACAACCTGTCAATTTTACACTCAGTAGT  
TTTACGATTAACAATACAGTCACATCGTGCAGACTGTTGACGCCGGCATCCGTCAATGTTGCATTGCAGGACGTT  
TTTGTGAGTCAAGTTTCCCTCTTCCGGTGATGAGGTTGCAGCCGGCTCCACGACGTTGCGGCTGCAGTGTGATGCA  
GGAGTGACGGTATGGGCAACACTGACTGATGCGACCACACCGTCCAACAGAAGCGATATACTCACACTGACGGGG  
GCATCGACTGCAACCGGAGTCCGGGCTGAGAATATAACAAGAACACTGACAGTTTGCCCTGAAGTTTGGACCTGAT  
TCGCCGGTAAAGGGAAATGAAAACAGTGGCAGTTATCGTCAGGGACGGAAACGTTGCCCTCAGTTACCTGAAAT  
GTAAAGTATGTTAATACCGGTGAGGGAATTAATCCGGGTACGGTCAACGGAATATCAACATTTACGTTTCTCTAT  
CAGTAA

**F17e-A and F17-G3 phylogenetically diverge from the other variants of F17-A and F17-G**

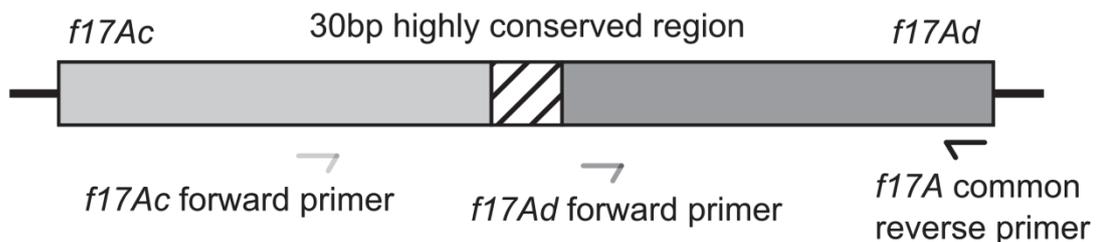
In order to clarify the phylogenetic links between the 4 F17-A and 2 F17-G variants reported up to now and the F17e-A, F17f-A and F17-G3 newly described, a phylogenetic analysis was performed with the *f17A* and *f17G* gene sequences from several *E. coli* F17-producing strains and *E. coli* and *P. mirabilis* F17-related producing strains (Table 1). In the two phenograms, all gene sequences encoding a variant were observed in related leaves (Figure 4). *f17Ae* gene sequence was found to be related to *f17Ab* gene sequence. On the other hand, *f17G3* gene was found to significantly diverge from the genes coding the two variants F17-G1 and F17-G2.



**Figure 2 :** Map of the *E. coli* strain MHI813 pathogenicity or fitness island carrying the F17e-A and F17-G3 variants gene cluster. This 96kb genomic island is inserted into the phenylalanine tRNA encoding gene *pheV* and carries notably a P4-like integrase gene, close to the insertion site, F17 fimbriae encoding genes, organized in a gene cluster, a type VI secretion system gene cluster and a microcins I47 and H47 gene cluster.

### The FY antiserum detects F17a-A variant-producing isolates only

The FY antiserum is commonly used in veterinary laboratories to detect all F17-producing *E. coli* isolates involved in diarrhea or septicemia outbreak in calves. To check the ability of this antiserum to detect all F17-A variants, we performed agglutination testing using the appropriate reference strains for each F17-A variant, including the MHI813 and 6.0900 strains for the new variants F17e-A and F17f-A. A positive agglutination reaction was only observed with the 25KH9 reference strain only, suggesting that this antiserum is unable to detect other F17a-A variants.



**Figure 3 :** Map of the *f17A* gene carried on plasmid pVir68. This gene corresponds to a mixture of *f17Ac* and *f17Ad* genes. The highly conserved region identified is shared by the both variants genes *f17Ac* and *f17Ad* and constitutes a likely recombination region. This region is located between the two matching regions of the forward specific primers for *f17Ac* and *f17Ad*.

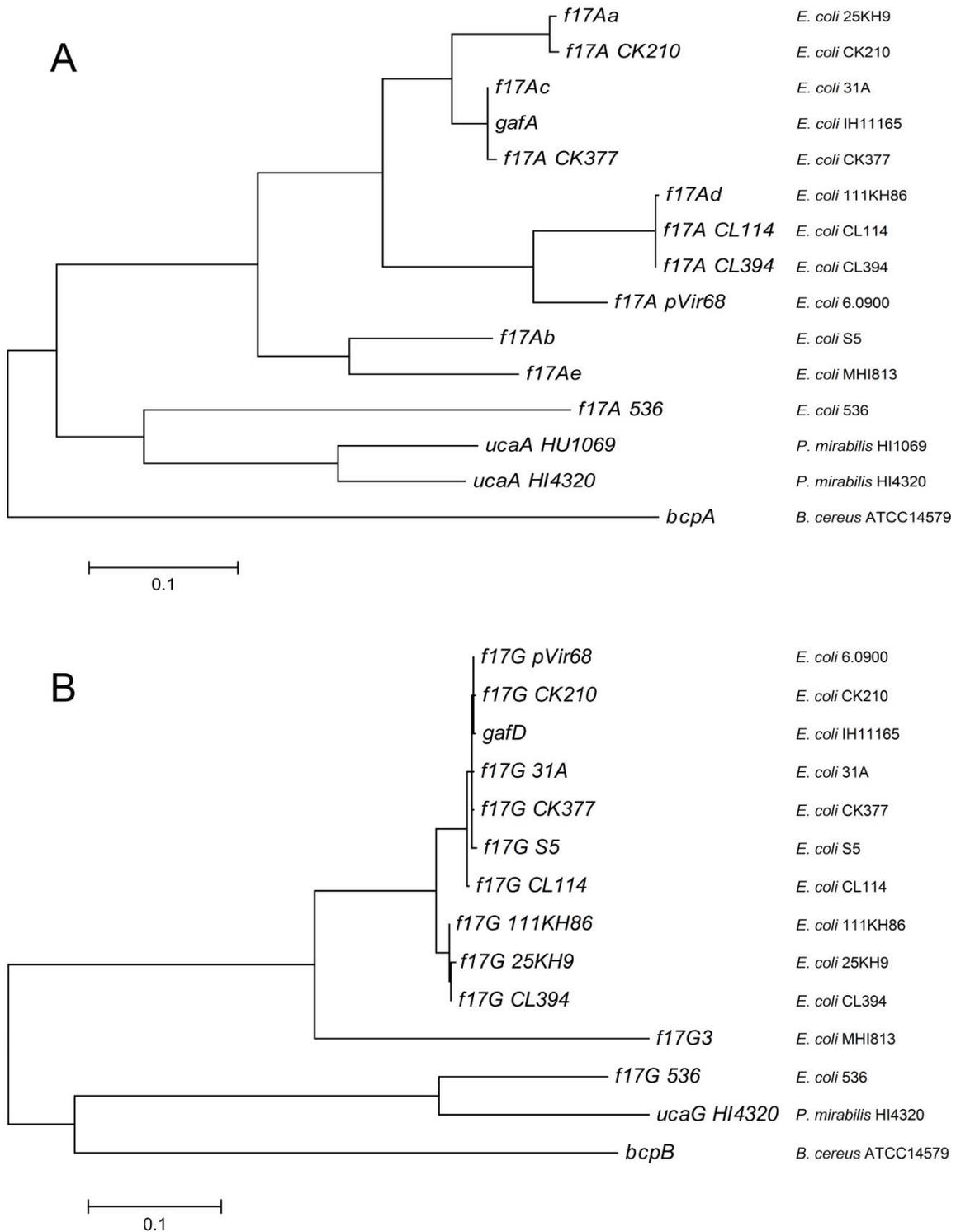
## Discussion

In this study, we report three new variants of the pilin and adhesin subunits F17A and F17G of the F17 fimbriae in *E. coli*. The F17e-A variant was identified in *E. coli* isolates recovered from feces of diarrheic calves in Southeastern Iran. The prevalence of this variant among the F17-A positive *E. coli* isolates (71.4%) was surprisingly high in this cattle population. These F17e-A isolates were identified in 7/11 herds, suggesting a wide spread of the variant F17e-A in the Kerman province. These isolates were found in 5 *E. coli* clones, three of them harbouring the F17e-A variant only. Moreover, the *cnf2* and *cdtIII* genes were found in association with F17e-A in a fourth clone. Interestingly, the most prevalent clone I and the 3 clones II, III and V were detected in the same herds suggesting the presence of a major clone disseminating the F17e-A variant. Considering that a plasmidic location of the *f17Ae* gene would probably be associated with a higher clonal diversity of the *f17Ae*-carrying *E. coli* thanks to intercellular plasmid spread, the hypothesis of a chromosomal location of *f17Ae* can be put forward. However, this would need further molecular confirmation.

In three clones (I, II and IV), the F17e-A variant was the unique virulence-associated factor identified. Considering that those calves were severely affected with diarrhea, this may suggest the expression of a still unknown virulence factor associated to the F17e-A variant. Therefore, it could be of interesting value to further determine the whole sequence genome of these *E. coli* clones in order to detect in silico possible new virulence factors involved in diarrhea outbreak in calves.

The new variant F17e-A was also identified in the *E. coli* MHI813 strain, which was isolated from bovine feces. It was found to be associated on the MHI813 strain genome to a new variant of the adhesin subunit, F17-G3. These two variants were found into a gene cluster, confirming the previous observations of a co-localization of the F17 fimbriae encoding genes in a cluster organization [10,31]. Moreover, the co-localization of a type VI secretion gene cluster, and a microcins I47 and H47 gene cluster is reminiscent of a pathogenicity or fitness island [32,33]. The integration of this genomic island within the *pheV* gene, which encodes phenylalanine tRNA, also supports this hypothesis. Indeed, the *pheV* gene is localized at the 67<sup>th</sup> minute on the *E. coli* K12 genome map, which is a known hot spot for pathogenicity island insertions [34–37].

The new variant F17-G3 was found to share no identity on its N-terminal encoding part with the two already reported variants F17-G1 and F17-G2, what was highlighted by the great phylogenetic divergence of F17-G3 with the two others adhesin variants. The N-terminal part of the adhesin is known to be responsible for the adhesion onto the host receptor [4] and the completely different N-term part of F17-G3 may indicate some differences in receptor specificity or even in host tropism. Therefore, a functional characterization of this new variant may help investigating the F17-G3 adhesion properties. Concerning the two variants F17-G1 and F17-G2, the phylogenetic analysis showed a very close relatedness. These two variants share 99% identity, and we can wonder whether the weak genetic differences between these two variants do really correspond to biological differences, e.g. in terms of adhesion specificity.



**Figure 4** : Phenograms of F17-A variants and F17-A-related genetic sequences (A) and F17-G variants and F17-G-related genetic sequences (B). The phenograms were drawn using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model [28]. The trees with the highest log likelihood (-3962.3380 for F17-A, and -4843.1422 for F17-G) were shown. The trees are drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

Regarding the genetic flux of the two new variants F17e-A and F17-G3, the prevalence of the variant F17e-A was very low in healthy adult bovines in France. F17-G3 was even not detected at all in these animals. One hypothesis would rely on a very low prevalence in cattle, those variants being incidentally identified in a restricted area (Iran) during a short period of time. Another hypothesis could be that these two variants are strongly associated with virulence in calves, as it is the case for the F17b-A variant, which is known to be mainly associated to CNF2 producing *E. coli* strains, both of them being carried by the Vir plasmid [4,10,14].

Another new variant F17f-A of the major subunit was identified on the recently sequenced virulence plasmid pVir68, that carries different virulence factors encoding genes, like *cnf2* and *cdtIII* genes [17]. This new variant corresponds to a combination of the already described variants F17c-A and F17d-A. The structure of this new variant suggests that the highly conserved regions previously identified [4] on the different variants of the pilin and adhesin subunits could be the target of recombination events, which would constitute a potential source of genetic diversity. This strategy may allow the F17-producing strains to bypass the immune defense system of the host, particularly the specific antibodies developed against the major subunits variants of F17 fimbriae after a first contact with a F17-producing pathogenic *E. coli*.

From all new variants and the already reported ones for the major subunit of F17 fimbriae, and as tested through agglutination reactions, the FY antiserum of Biovac was able to detect the F17a-A variant only. This does not exclude that the FY antiserum would have detected other variants using different approaches, such as immunoblotting. However, our point was to assess the capabilities of this serum to detect F17-producing *E. coli* from diarrheic calves in the same conditions as routinely performed by veterinary laboratories. Further work is required to provide new immunological tools for the detection of all F17 variants for routine purposes. Interestingly, the same F17a-A variant is used to produce the two vaccine formulas of Trivacton6® and Imocolibov® purchased by Merial company. Accordingly, serious doubts on the ability of these vaccine formulas to confer a total protection against all the F17-producing *E. coli* strains can be put forward. As noticed above for immunological reagents, it would be interesting to consider all the described variants of the major subunit for their inclusion in these vaccines.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Authors' contributions**

EO and JYM conceived the study. RG collected the feces samples from diarrheic calves in Iran, detected the virulence-associated genes and determined the serogroups and the phylogenetic groups and subgroups of the isolates of this collection. MB detected F17 encoding genes on the isolates from the collection of diarrheic calves feces in Iran, performed the PFGE on the F17e-A-positive isolates, performed the in silico analyses on *E. coli* MHI813

genome and pVir68 sequence, the phylogenetic analyses of F17-A and F17-G variants, designed the specific primers for F17e-A and F17-G3, detected these two variants in the French bovines collection and assessed FY antiserum detection. LC, PC provided support for PFGE. MBo provided technical support. HB provided the French bovines feces collection. MB interpreted all the results and wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Morgan Bihannic had a PhD fellowship from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses). We gratefully thank Patricia Martin for helpful discussions and proofreading.

## References

1. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL: **Pathogenic Escherichia coli**. *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**:123–140.
2. Russo TA, Johnson JR: **Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC**. *J Infect Dis* 2000, **181**:1753–1754.
3. Mainil J: **Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'Escherichia coli : I) les adhésines et facteurs de colonisation**. *Ann Med Vet* 2003, **147**:105–126 (in French).
4. Le Bouguéneq C, Bertin Y: **AFA and F17 adhesins produced by pathogenic Escherichia coli strains in domestic animals**. *Vet Res* 1999, **30**:317–342.
5. Buts L, Bouckaert J, De Genst E, Loris R, Oscarson S, Lahmann M, Messens J, Brosens E, Wyns L, De Greve H: **The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic Escherichia coli has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N-acetylglucosamine**. *Mol Microbiol* 2003, **49**:705–715.
6. Girardeau JP, Dubourguier HC, Contrefois M: **Attachement des Escherichia coli entéropathogènes à la muqueuse intestinale**. In J. Espinasse (ed.), *Gastroentérites néonatales du veau* 1979, 49–59. Société Française de Buiatrie, Maison Alfort, France. in French.
7. Morris JA, Thorns CJ, Scott AC, Sojka WJ: **Adhesive properties associated with the Vir plasmid: a transmissible pathogenic characteristic associated with strains of invasive Escherichia coli**. *J Gen Microbiol* 1982, **128**:2097–2103.
8. Bertin Y, Girardeau JP, Darfeuille-Michaud A, Contrefois M: **Characterization of 20 K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated Escherichia coli strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition**. *Infect Immun* 1996, **64**:332–342.

9. Bertels A, Pohl P, Schlicker C, Charlier G, Lintermans P, van Driessche E, De Greve H: **Isolation of the F111 fimbrial antigen on the surface of a bovine Escherichia coli strain isolated out of calf diarrhea: characterization and discussion of the need to adapt recent vaccines against neonatal calf diarrhea.** *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* 1989, **58**:118–122.
10. Bertin Y, Martin C, Oswald E, Girardeau JP: **Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic Escherichia coli strains by multiplex PCR.** *J Clin Microbiol* 1996, **34**:2921–2928.
11. Cid D, Sanz R, Marín I, de Greve H, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Amils R, de la Fuente R: **Characterization of nonenterotoxigenic Escherichia coli strains producing F17 fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**:1370–1375.
12. Rhen M, Klemm P, Korhonen TK: **Identification of two new hemagglutinins of Escherichia coli, N-acetyl-D-glucosamine-specific fimbriae and a blood group M-specific agglutinin, by cloning the corresponding genes in Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 1986, **168**:1234–1242.
13. Martin C, Rousset E, De Greve H: **Human uropathogenic and bovine septicemic Escherichia coli strains carry an identical F17-related adhesin.** *Res Microbiol* 1997, **148**:55–64.
14. Oswald E, de Rycke J, Lintermans P, van Muylem K, Mainil J, Daube G, Pohl P: **Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of Escherichia coli.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**:2522–2527.
15. Pérès SY, Marchès O, Daigle F, Nougayrède JP, Herault F, Tasca C, De Rycke J, Oswald E: **A new cytolethal distending toxin (CDT) from Escherichia coli producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase.** *Mol Microbiol* 1997, **24**:1095–1107.
16. Bürk C, Dietrich R, Açar G, Moravek M, Bülte M, Märtlbauer E: **Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in Escherichia coli ONT:H19 of bovine origin.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:2106–2112.
17. Johnson TJ, DebRoy C, Belton S, Williams ML, Lawrence M, Nolan LK, Thorsness JL: **Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic Escherichia coli.** *Vet Microbiol* 2010, **144**:100–109.
18. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T: **Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative Escherichia coli strains.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:2138–2140.
19. Lalioui L, Jouve M, Gounon P, Le Bouguenec C: **Molecular cloning and characterization of the afa-7 and afa-8 gene clusters encoding afimbrial adhesins in Escherichia coli strains associated with diarrhea or septicemia in calves.** *Infect Immun* 1999, **67**:5048–5059.

20. Franck SM, Bosworth BT, Moon HW: **Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**:1795–1797.
21. China B, Pirson V, Mainil J: **Typing of bovine attaching and effacing Escherichia coli by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**:3462–3465.
22. Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA: **Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:5849–5853.
23. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O: **Detection of urovirulence factors in Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995, **12**:85–90.
24. Tóth I, Héroult F, Beutin L, Oswald E: **Production of cytolethal distending toxins by pathogenic Escherichia coli strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV).** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:4285–4291.
25. Bertin Y, Martin C, Girardeau JP, Pohl P, Contrepois M: **Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing Escherichia coli strains from cattle with septicemia and diarrhea.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **162**:235–239.
26. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: **Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:4555–4558.
27. Escobar-Páramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Rahimy MC, Andremont A, Denamur E, Ruimy R: **Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:5698–5700.
28. Tamura K, Nei M: **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.** *Mol Biol Evol* 1993, **10**:512–526.
29. Van Bost S, Roels S, Oswald E, Mainil J: **Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic Escherichia coli type 2 (NTEC2) strains in calves.** *Microbes Infect* 2003, **5**:1189–1193.
30. Mainil JG, Jacquemin E, Oswald E: **Prevalence and identity of cdt-related sequences in necrotoxicogenic Escherichia coli.** *Vet Microbiol* 2003, **94**:159–165.
31. Lintermans PF, Bertels A, Schlicker C, Deboeck F, Charlier G, Pohl P, Norgren M, Normark S, van Montagu M, De Greve H: **Identification, characterization, and nucleotide sequence of the F17-G gene, which determines receptor binding of Escherichia coli F17 fimbriae.** *J Bacteriol* 1991, **173**:3366–3373.

32. Coulthurst SJ: **The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system.** *Res Microbiol* 2013, **164**:640–654.
33. Azpiroz MF, Bascuas T, Laviña M: **Microcin H47 system: an Escherichia coli small genomic island with novel features.** *PLoS One* 2011, **6**:e26179.
34. Gal-Mor O, Finlay BB: **Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence.** *Cell Microbiol* 2006, **8**:1707–1719.
35. Bertin Y, Boukhors K, Livrelli V, Martin C: **Localization of the insertion site and pathotype determination of the locus of enterocyte effacement of shiga toxin-producing Escherichia coli strains.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:61–68.
36. Jores J, Rumer L, Kiessling S, Kaper JB, Wieler LH: **A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at pheV in bovine Shiga toxin-producing Escherichia coli strain O103:H2.** *FEMS Microbiol Lett* 2001, **204**:75–79.
37. Michelacci V, Tozzoli R, Caprioli A, Martínez R, Scheutz F, Grande L, Sánchez S, Morabito S: **A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing Escherichia coli of human and ovine origin.** *Clin Microbiol Infect* 2013, **19**:E149–156.
38. Hochhut B, Wilde C, Balling G, Middendorf B, Dobrindt U, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Carniel E, Hacker J: **Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic Escherichia coli strain 536.** *Mol Microbiol* 2006, **61**:584–595.
39. Pearson MM, Sebahia M, Churcher C, Quail MA, Seshasayee AS, Luscombe NM, Abdellah Z, Arrosmith C, Atkin B, Chillingworth T, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabbinowitsch E, Walker D, Whithead S, Thomson NR, Rather PN, Parkhill J, Mobley HLT: **Complete genome sequence of uropathogenic Proteus mirabilis, a master of both adherence and motility.** *J Bacteriol* 2008, **190**:4027–4037.
40. Cook SW, Mody N, Valle J, Hull R: **Molecular cloning of Proteus mirabilis uroepithelial cell adherence (uca) genes.** *Infect Immun* 1995, **63**:2082–2086.
41. Budzik JM, Marraffini LA, Schneewind O: **Assembly of pili on the surface of Bacillus cereus vegetative cells.** *Mol Microbiol* 2007, **66**:495–510.



## Chapitre 3 - Support génétique et association à la virulence de nouveaux variants des fimbriae F17 chez *Escherichia coli*

---

Le chapitre précédent a mis en évidence l'existence de trois nouveaux variants des fimbriae F17. Ces variants, nommés F17e-A, F17f-A et F17-G3, sont potentiellement associés à la virulence des souches d'*E. coli* pathogènes chez le veau. Néanmoins, ce lien avec la virulence ne peut être établi de façon claire que pour le variant F17f-A, qui a été détecté sur un plasmide de virulence d'une souche NTEC2. Afin de déterminer ce lien pour les variants F17e-A et F17-G3, dans ce chapitre, l'association de ces deux variants à d'autres facteurs de virulence a été évaluée et leurs supports génétiques ont été déterminés. Ces travaux ont conduit à la rédaction de deux articles scientifiques qui composent ce chapitre.

Le premier article présente les travaux de détection et de caractérisation des variants F17e-A et F17-G3 et des nécrotoxines CNF2 et CDT-III au sein d'une collection de souches d'*E. coli* isolées de veaux sains en France. Au sein de ces souches, le gène *f17G3*, codant le variant F17-G3, est exclusivement détecté au niveau chromosomique et n'est associé à aucune nécrotoxine. Le variant F17e-A est quant à lui systématiquement associé à la nécrotoxine CNF2 et très souvent à la nécrotoxine CDT-III également. Deux profils de portage du variant F17e-A et de ces nécrotoxines ont pu être distingués : soit les gènes *f17Ae* et *cdtIII*, codant respectivement le variant F17e-A et la toxine CDT-III, sont détectés au niveau du chromosome bactérien et le gène *cnf2*, codant la toxine CNF2, est plasmidique, soit le gène *f17Ae* est situé au niveau de plasmides également porteurs des gènes *cnf2* et *cdtIII*. L'ensemble des plasmides identifiés, porteurs du gène *cnf2* seul ou des gènes *f17Ae*, *cnf2* et *cdtIII*, appartiennent à deux lignées de plasmides IncF, suggérant deux voies évolutives principales dans la formation du pathovar NTEC2, impliquant des plasmides IncF porteurs du gène *cnf2* plutôt que l'implication de clones NTEC2 divergents. Les supports génétiques du variant F17e-A chez les souches d'*E. coli* isolées en Iran présentée dans le chapitre précédent ont également été déterminés, conduisant à l'identification d'une autre lignée de plasmides IncF porteurs du gène *f17Ae*.

Le second article décrit, suivant le même objectif que le premier, la détection et la caractérisation des variants F17e-A et F17-G3 et des nécrotoxines CNF2 et CDT-III, mais cette fois au sein de deux collections de souches d'*E. coli* isolées de veaux sains et de veaux diarrhéiques en France. Alors que le variant F17-G3 n'a pas été détecté chez ces souches, le gène *f17Ae* a été retrouvé sur des plasmides IncF porteurs des gènes *cnf2* et *cdtIII* et appartenant à la lignée plasmidique identifiée dans le premier article, confortant l'hypothèse d'une implication de plasmides IncF de mêmes lignées dans la formation du pathovar NTEC2.



## **Article 2 : Divergent evolutions of repFII replicon of IncF plasmids carrying the Cytotoxic Necrotizing Factor *cnf2*, Cytolethal Distending Toxin *cdt III* and *f17e-A* fimbriae variant genes in necrotoxicogenic NTEC2 *Escherichia coli* from calves**

Morgan Bihannic<sup>1,2,3</sup>, Marisa Haenni<sup>1</sup>, Eric Oswald<sup>2,3,4</sup>, Jean-Yves Madec<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Anses Lyon, Lyon, France.

<sup>2</sup>INRA USC1360, Toulouse, France.

<sup>3</sup>Inserm UMR1043 / CNRS UMR5282 / Université Toulouse III, Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, France.

<sup>4</sup>CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-Hygiène, Toulouse, France.

Article soumis à *Applied and Environmental Microbiology* (14 août 2015), en revue.

### **Abstract**

Among pathovars of *Escherichia coli* in cattle, necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) are defined by the production of cytotoxic necrotizing factors (CNFs). In particular, NTEC2 are frequent in diarrheic and septicemic calves and usually co-produce CNF2, cytolethal distending toxin (CDT) type III and fimbrial adhesins of the F17 family, whose genetic determinants were frequently reported on the same Vir-like plasmid. In this study, we investigated the genetic environment of *cnf2*, *f17Ae* and *cdtIII* genes in a collection of fecal *E. coli* recovered from 484 French and 58 Iranian calves. In particular, we highlighted the spread of *cnf2*, *f17Ae* and *cdtIII* on similar 150 kb IncF plasmids harboring the new repFII replicon allele F74 in NTEC2 isolates. Interestingly, this 150 kb IncF plasmid differed from the 140 kb IncF plasmid of the new repFII replicon allele F75 carrying *cnf2* alone. These results suggest two divergent lineages of *cnf2*-carrying IncF plasmids depending on the presence of the *f17Ae* and *cdtIII* genes. This partition was observed in unrelated backgrounds of *E. coli*, rather suggesting to two different evolutionary paths of *cnf2*-carrying IncF plasmids than divergent evolutions of NTEC2 clones. The driving forces for such divergent evolutions are not known and further studies are required to clarify the selection of plasmid subtypes spreading virulence determinants in *E. coli*, in particular plasmids of the IncF family.

## Introduction

*Escherichia coli* is considered a predominant member of the normal microflora of mammals but may also be responsible for intestinal and extra-intestinal infections (1). Accordingly, several pathovars of *E. coli* have been described and reported over time, both in humans and animals (1, 2). In general, those infections result from a combination between host susceptibility and biological functions expressed by the pathogenic *E. coli*, such as enhanced capability to colonize the host or production of toxigenic factors.

To adhere to host cells before colonization, pathogenic *E. coli* usually produce fimbrial or afimbrial adhesins. In cattle, *E. coli* isolates from diarrheic and septicemic calves often produce F17 fimbriae (3, 4), which bind N-acetyl-D-glucosamine (Glc-NAc)-containing receptors present on host intestinal epithelial cells (4, 5). F17 fimbriae consist of fine filamentous heteropolymers composed of two main subunits : the pilin F17-A subunit, that forms the bulk of the fimbriae, and the adhesin F17-G subunit (4). Several variants were reported: F17a-A, F17b-A, F17c-A, F17d-A, F17e-A and F17f-A for the pilin F17-A (6-10) and F17-G1, F17-G2 and F17-G3 for the adhesin F17-G (10, 11). In particular, the recently reported F17e-A variant was abundantly found in *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran and associated to F17-G3 on a pathogenicity or fitness island in the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strain MHI813 (10).

Among virulence determinants reported in pathogenic cattle *E. coli*, cytotoxic necrotizing factors (CNFs) and cytolithal distending toxins (CDTs) are of significant importance (12). Indeed, necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) are a group of pathogenic *E. coli* defined by the production of CNF1, CNF2 or CNF3 variants found in several hosts, including humans (13-16). In particular, NTEC2, which produce CNF2, are frequently encountered in diarrheic and septicemic calves (17). In addition, NTEC2 usually produce other toxins, such as CDT type 3 (CDT-III) (18, 19). Also, whereas NTEC1, which produce CNF1, frequently express fimbrial adhesins of the P and S families or afimbrial adhesins of the AFA family, NTEC2 mainly express fimbrial adhesins of the F17 family or afimbrial adhesins of the AFA family (4, 12).

The genetic location of these genes, either plasmidic or on the chromosome, has a crucial impact on the spread of virulence-associated features within the *E. coli* population. Accordingly, the Vir plasmid was initially designated as the molecular support of both toxic and adhesive transmissible properties as referred to the 'Vir phenotype' in *E. coli* isolates from septicemic calves and lambs (6, 20-22). Later on, the Vir plasmid was reported to propagate the *cnf2* and *f17A* genes in NTEC2 cattle isolates (23, 24) and other genes, such as *cdtIII* (19, 25). The role of such Vir-like plasmids was also investigated in experimental calf models (26). These plasmids mostly belong to the F-type family even though a comprehensive picture of the different IncF plasmid subtypes disseminating those genes is lacking (27). To this regard, Replicon Sequence Typing (RST) is a useful and convenient tool, which has been largely set up for studying the epidemiology of IncF plasmids carrying antimicrobial resistance genes, and proved to be of major help in deciphering major driving forces in plasmid selection or evolution (28-30). This method was however less used to clarify the distribution of plasmids harbouring virulence-associated factors.

In this study, we studied the co-localization of *cnf2*, *cdtIII* and the recently reported *f17Ae* genes in NTEC2 isolates from diarrheic calves. We also sub-typed the corresponding IncF plasmids and highlighted specific distributions of repFII replicons, which suggest divergent evolutionary paths.

## Materials and methods

### Collection of *E. coli* isolates

A collection of *E. coli* isolates was recovered between February 2012 and July 2012 from feces of 484 healthy calves aged of 6 months old, originating from 12 slaughterhouses in four distinct areas in France (31). This collection was composed of (i) 2420 *E. coli* isolates from the dominant flora (five isolates per animal) and (ii) 152 *E. coli* isolates producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) conferring resistance to broad-spectrum cephalosporins (one per animal, if any). In brief, approximately 10 g of feces from each calf were diluted 1/10 in phosphate buffer. The resulting inoculum was plated in parallel on selective ChromID ESBL agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for the isolation of ESBL producers and on MacConkey agar (bioMérieux) for the isolation of bacteria from the dominant flora. After 24h incubation at 37°C, one colony was arbitrarily selected from the ESBL agar plate and five colonies from the MacConkey agar plate. All the selected isolates were identified as *E. coli* using colony morphology and API20E tests (bioMérieux).

An additional published collection of *E. coli* isolates (10) was also considered in this study. Briefly, between March 2004 and June 2005, 58 *E. coli* isolates were recovered from rectal swabs of 58 diarrheic calves from 11 herds in the Kerman province, Southeastern Iran.

### Determination of F17e-A, F17-G3, CNF2 and CDT-III producers

After DNA extraction of each isolate, F17A was searched by PCR with F17 common primers (11). For convenience, for non ESBL producers, F17A and F17-G were first detected on a pool of the five dominant isolates per calf. Detection of F17e-A and F17-G3 variants was then performed by PCR with specific primers (10), using MHI813 (32) and MG1655 *E. coli* as positive and negative controls, respectively. On the F17e-A and F17-G3 positive isolates, *cnf2* and *cdtIII* were searched by PCR (25), using 6.0900 (25) and MG1655 *E. coli* as positive and negative controls, respectively.

### Clonality of the *E. coli* isolates

Clonality of the F17e-A and F17-G3 positive isolates was investigated by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE). In brief, whole-cell DNA was digested with *XbaI* (for 16 hours at 37°C) after lysis by lysozyme and proteinase K. Electrophoresis of enzyme-generated fragments was performed with a contour-clamped electric field CHEF Mapper XA System apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA) through a 1% agarose gel. Migration was performed for 24 hours at 14°C, with an electric field of 6 V/cm. DNA bands patterns were stained with ethidium bromide, photographed with a Gel Doc XR System (Bio-Rad), and analyzed with

Gelcompar II 6.5 software. DNA bands size was determined from CHEF DNA Size Standard, Lambda Ladder (Bio-Rad) (Size range: 50-1000 kb).

### **Plasmid analysis and Southern blot**

On the different F17e-A and F17-G3 positive clones identified by *Xba*I PFGE, the plasmid content was investigated by nuclease S1-PFGE. Briefly, whole-cell DNA from *E. coli* isolates was digested with S1 nuclease (for 45 minutes at 37°C) after lysis by lysozyme and proteinase K. Electrophoresis of linearized plasmids was performed in the same conditions as described above, except that migration was performed for 20 hours. After ethidium bromide staining and digital photograph, DNA fragments were transferred on Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (GE healthcare, Pittsburgh, USA). Then, plasmidic or non plasmidic locations of *f17Ae*, *f17G3*, *cnf2* and *cdtIII* genes were investigated by Southern Blot with specific probes labeled with a DIG probe (Roche, Basel, Switzerland).

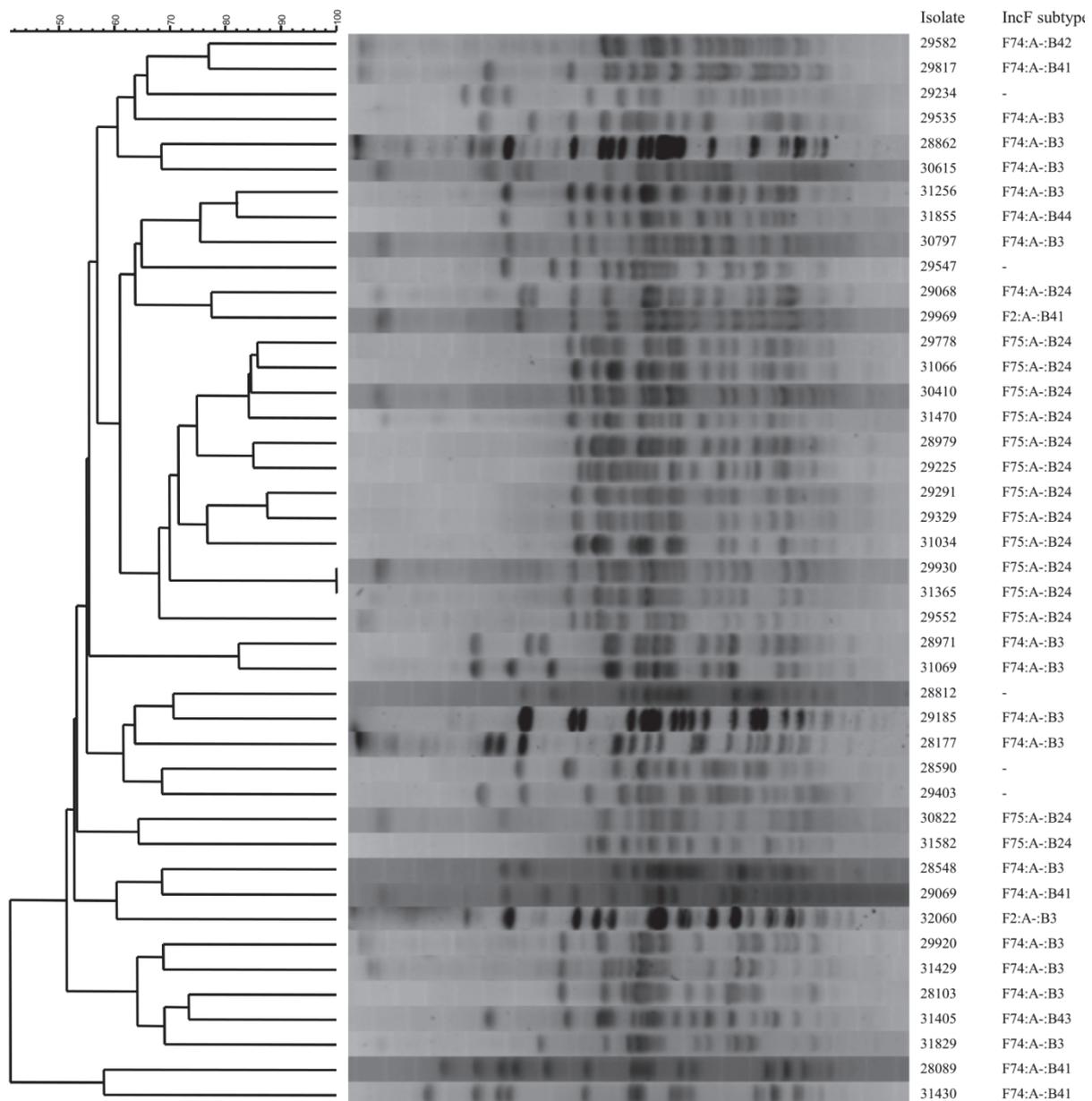
### **IncF plasmid typing and subtyping**

Characterization of the plasmid families was performed by PCR-based replicon typing (33). In isolates harboring *f17Ae*, *f17G3*, *cnf2* or *cdtIII* genes on IncF plasmids, a complete sequencing of the RepFII, RepFIA and RepFIB replicons was performed and the RST scheme was used to produce the FAB formula (30).

## **Results**

### **Prevalence of F17e-A and F17-G3 in healthy calves**

Among the dominant *E. coli* isolates from the 484 animals studied, 131 pools of five isolates – corresponding to 131 calves – tested positive for F17-A and/or F17-G (131/484, 27.1%). Among those animals, 31 were positive for F17e-A (31/131, 6.4%) and 5 for F17-G3 (5/131, 1.0%), covering a total of 70 F17e-A - and 9 F17-G3 - positive isolates, respectively. Among the 152 ESBL *E. coli* isolates, 8 were positive for F17-A (8/152, 5.3%), of which 4 produced F17e-A (2.6%). No F17-G3 positive isolate was detected. Of note, the F17e-A positive ESBL producer was from a different calf than those displaying F17e-A or F17-G3 positive *E. coli* isolates in the dominant flora.



**Figure 1** : PFGE *XbaI* profiles of the F17e-A and F17-G3 producing *E. coli* isolates from healthy calves in France. The PFGE profiles were analyzed with Gelcompar II 6.5 software, using Dice similarity coefficient, 0% optimization, 1% tolerance and UPGMA clustering method.

When a single animal presented several isolates positive for F17e-A or F17-G3, these isolates were clonal as determined by identical PFGE profiles, except for 3 animals in which 2 different *E. coli* clones were identified (data not shown). The 4 F17e-A positive ESBL *E. coli* isolates and the F17e-A or F17-G3 positive *E. coli* clones of the dominant flora were weakly related, except # 29930 and # 31365 which correspond to the same F17e-A positive clone (Figure 1). In total, 43 different *E. coli* clones were identified, including 4 F17e-A positive ESBL clones and 39 F17e-A positive (34/39) or F17-G3 (5/39) positive clones from the dominant flora.

### **Detection and co-localization of *f17e-A*, *f17-G3*, *cnf2* and *cdtIII***

In all, 29 F17e-A-positive *E. coli* were also positive for *cnf2* and *cdtIII* (25 non-ESBL and 4 ESBL producers), and 9 were positive for *cnf2* only (Table 1). The 5 F17-G3 positive *E. coli* were negative for *cnf2* and *cdtIII*. All F17e-A- *E. coli* harbored IncFII/FIB plasmids, whereas the repFIA was never detected (Table 1). Conversely, among the F17-G3 *E. coli*, isolate #29403 harbored an IncFII/FIB plasmid whereas isolates #29234 and #29547 harbored an IncFII plasmid only. None of the two last F17-G3 positive *E. coli* displayed an IncF plasmid. As shown on Southern blots on S1-PFGE gels using appropriate probes, in all F17e-A positive *E. coli*, the *f17Ae* gene was located on a 150 kb IncF plasmid also carrying the *cnf2* gene (Figure 2a, Table 1). Interestingly, this IncF plasmid also carried the *cdtIII* gene in 20 of the 34 F17e-A positive *E. coli* of the dominant flora (Figure 2a) and in the 4 F17e-A positive ESBL *E. coli* (Figure 3). In isolate #29582, *cdtIII* co-localized with *cnf2* on the 150 kb IncF plasmid but no hybridization with the *f17Ae* probe was obtained. Among the remaining 14 F17e-A positive *E. coli*, *f17Ae* and *cdtIII* were located on the chromosome (Figure 2a). For *E. coli* isolate #28979, *f17Ae* also co-hybridized with the genomic DNA but no *cdtIII* signal was detected in Southern blot. In parallel, *f17-G3* hybridized with the genomic DNA as well (data not shown). Whenever those non-*f17Ae* non-*cdtIII* *E. coli* isolates produced CNF2, the *cnf2* gene was located on a different 140 kb IncF plasmid. In conclusion, two groups of *E. coli* isolates could be distinguished, either harboring a 150 kb IncF plasmid carrying the *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes or a 140 kb IncF plasmid carrying the *cnf2* gene only.

### **Replicon types of plasmids carrying *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII***

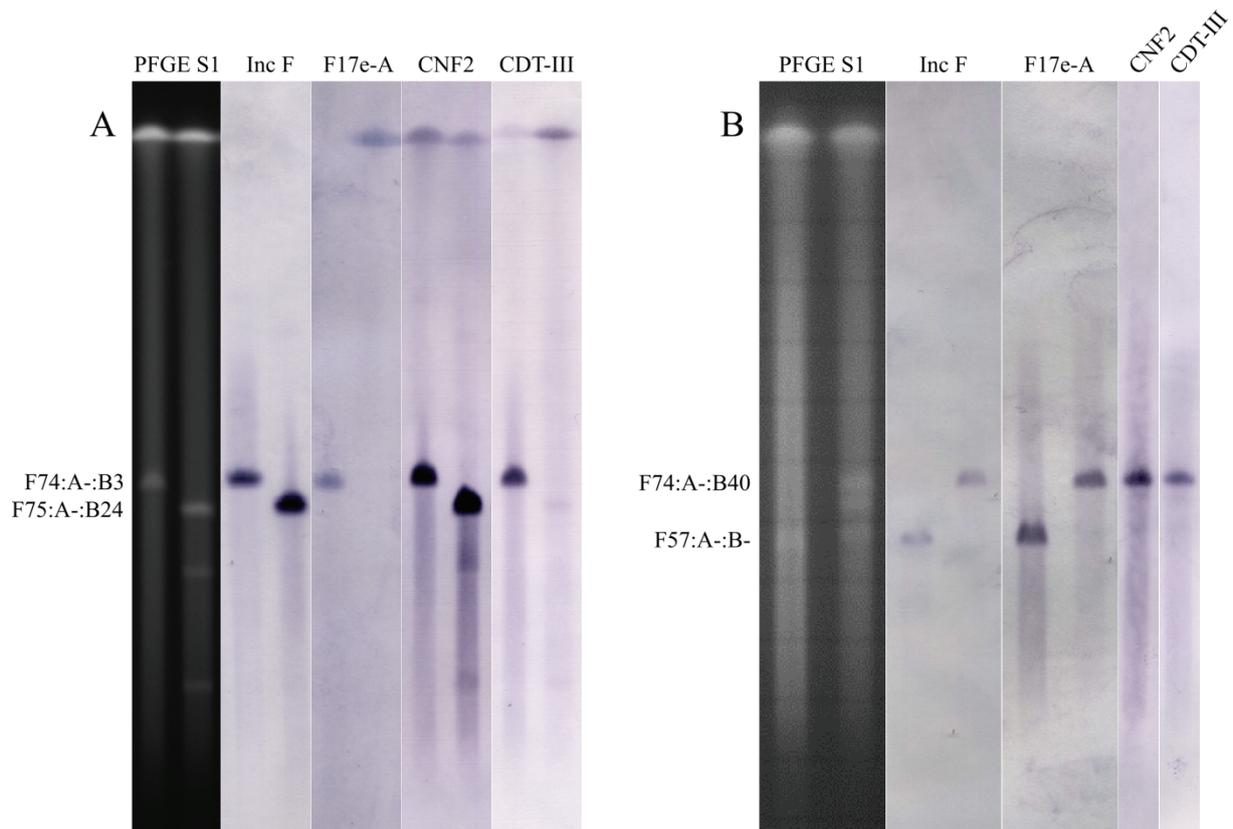
As demonstrated by replicon sequencing, a limited number of repFII (F2, F74, F75) and repFIB (B3, B24, B41, B42, B44) replicons alleles (and therefore, combinations of them) was observed for the *f17Ae/cnf2/cdtIII*-carrying IncF plasmids (Table 1). In particular, two newly assigned repFII alleles (this study) were dominantly found (F74 and F75), which strongly differ one from the other (14 mutations). Hence, these F74 and F75 alleles again discriminate two plasmid populations among the two different groups of NTEC2 isolates highlighted previously.

**Table 1 :** Genetic localizations of *fl7Ae*, *fl7-G3*, *cnf2* and *cdtIII* genes in the collection of *E. coli* isolates from healthy calves in France.

Isolates	Resistance phenotype		Genes detection		Replicon types		Genetic localization		IncF plasmid size (kb)	IncF subtypes (FAB formulas)
	<i>fl7e-A</i>	<i>fl7G3</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	<i>fl7e-A</i>	<i>fl7G3</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>		
28103	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
28548	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
28971	+	-	+	+	FII, FIB, Y, P	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
29535	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
29920	+	-	+	+	FII, FIB, B/O	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
30615	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
30797	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
31069	+	-	+	+	FII, FIB, P	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
31256	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
31429	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
31829	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
29068	+	-	+	+	FII, FIB, HI1	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B24
28089	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B41
29069	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	-	Inc F	Inc F	155	F74:A-:B41
29817	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B41
31430	+	-	+	+	FII, FIB, II	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B41
29582	+	-	+	+	FII, FIB, Y, P, B/O, II	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B42
31405	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B43
31855	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B44
29969	+	-	+	+	FII, FIB, P, II	-	Inc F	Inc F	150	F2:A-:B41
28979	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
29225	+	-	+	+	FII, FIB, II	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
30822	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
31470	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
31582	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
29291	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
29329	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
29552	+	-	+	+	FII, FIB, HI1	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
29778	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
<b>29930</b>	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
30410	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
31034	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
31066	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
<b>31365</b>	+	-	+	+	FII, FIB	-	genomic	Inc F	140	F75:A-:B24
28590	-	+	-	-	NT	-	genomic	-	NA	NA
28812	-	+	-	-	II, HI2	-	genomic	-	NA	NA
29234	-	+	-	-	FII, Y	-	genomic	-	NA	NA
29403	-	+	-	-	FII, FIB, P	-	genomic	-	NA	NA
29547	-	+	-	-	FII	-	genomic	-	NA	NA
28177	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
28862	+	-	+	+	FII, FIB, P	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
29185	+	-	+	+	FII, FIB, P, HI2	-	Inc F	Inc F	150	F74:A-:B3
32060	+	-	+	+	FII, FIB	-	Inc F	Inc F	150	F2:A-:B3

S: Sensitive to all antibiotics tested, Amx: amoxicillin, Tic: ticarcillin, Str: streptomycin, Kan: kanamycin, Gen: gentamicin, Tob: tobramycin, Chl: chloramphenicol, Ffc: florfenicol, Tet: tetracycline, Sul: sulfonamides, Tmp: trimethoprim, Nal: nalidixic acid, Enr: enrofloxacin, Ofx: ofloxacin - NT: non typable - ND: non determinable in southern blot - NA: not applicable - **29930** and **31365**: correspond to a same *E. coli* clone

Thus, in all but two *E. coli* isolates (#29969 and #32060), F74 allele was found on all IncF plasmids carrying *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII*. On the other hand, F75 allele was systematically associated to IncF plasmids carrying *cnf2* only (Table 1). Besides, some FAB formulas more frequently observed, such as F74:A-:B3 and F75:A-:B24. This distribution was also found in the group of ESBL-producing *E. coli* isolates, with *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* carried on a F74:A-:B3 plasmid in all but one isolates.



**Figure 2** : PFGE S1 profiles and Southern blots of (A) two isolates (#30797, F74:A-:B3; #30822, F75:A-:B24) chosen as representatives of the two groups of F17e-A positive *E. coli* isolates from French calves, and of (B) two isolates (Iran 33, F74:A-:B40; Iran 48, F57:A-:B-) chosen as representatives of the two groups of F17e-A positive *E. coli* isolates from Iranian calves. Southern blots were performed with IncF, F17e-A, CNF2 and CDT-III probes.

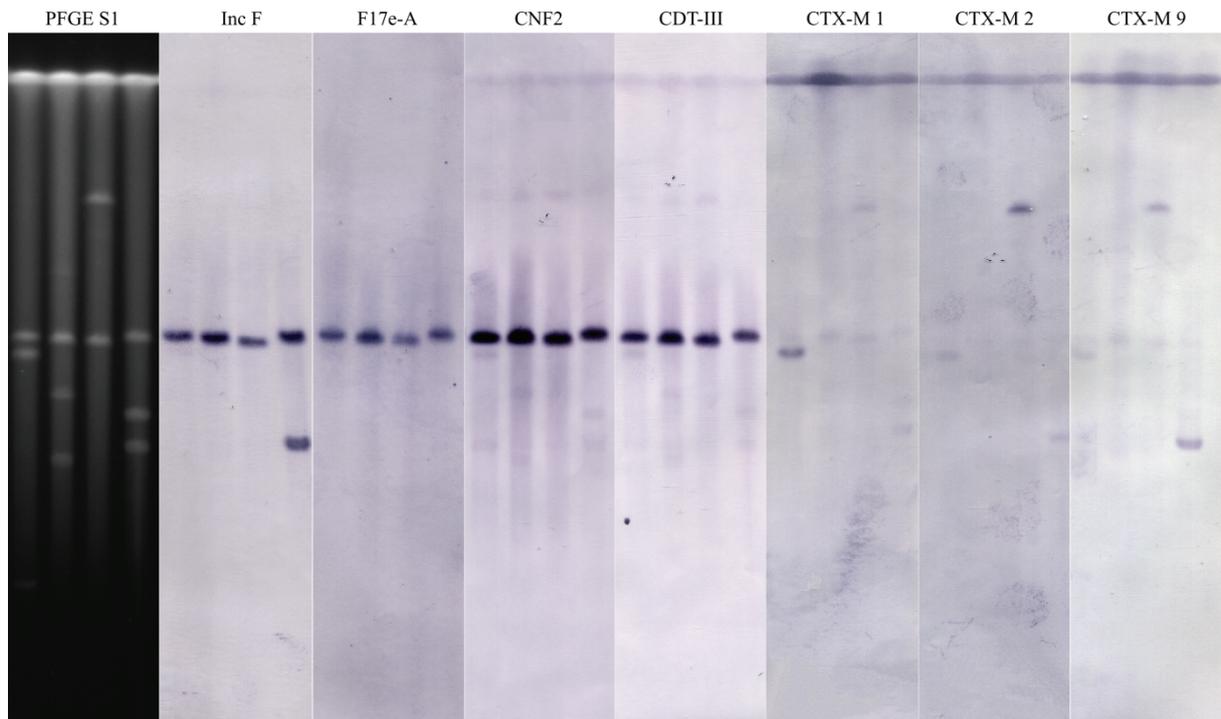
### Plasmid location of the ESBL genes

The genetic location of the ESBL genes present in the four F17e-A positive ESBL producers was investigated. As shown by Southern blot, none of the *bla*<sub>CTX-M</sub> genes was located on the IncF plasmids carrying *f17Ae*, *cnf2* and *cdt3* (Figure 3).

### Replicon types of plasmids carrying *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* in diarrheic calves in Iran

For comparison purposes, the repFII and repFIB replicons alleles and combinations (FAB formulas) of IncF plasmids carrying *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* was investigated from a previously

published collection of F17e-A-producing *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran (10). As reported, only one minor *E. coli* clone (clone V, 2 isolates) was found to carry the *fl7Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes. Interestingly, these two isolates also harbored the F74 repFII allele (a 150 kb F74:A-:B40 plasmid) whereas the IncF-type plasmid dominantly recovered in isolates testing negative for *cnf2* and *cdtIII* was a 110 kb F57:A-:B- plasmid (Figure 2b, Table 2). F57 differs from F74 by 18 mutations and from F75 by 14 mutations.



**Figure 3** : PFGE S1 profiles and Southern blot of the F17e-A positive ESBL *E. coli* isolates from French calves. Southern blots were performed with IncF, F17e-A, CNF2, CDT-III probes.

### **Clonality of *E. coli* isolates and F74/F75 repFII alleles distribution in French calves**

As reported above, the vast majority of *E. coli* isolates recovered from French calves were different clones. However, as shown in Figure 1, the distribution of the F74 and the F75 alleles was not randomly distributed among isolates but partly clustered with sub-groups of them.

## **Discussion**

F17e-A is a newly reported F17-A variant, closely related to F17b-A (10), which was first identified from a collection of pathogenic *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran. Also, F17e-A was rare among F17 producing *E. coli* isolates in another collection from healthy adult bovines (0.8%) (10), suggesting an association between F17e-A and virulence. F17e-A

was also found in the Shiga-like toxin variant Stx1d-producing bovine *E. coli* strain MHI813, together with the F17-G3 variant (10, 32). Here, we report a higher prevalence (6.4%) of F17e-A variant in healthy animals, albeit of much younger age (calves). This may indicate that the F17e-A variant preferentially confers adherence to intestine cells in young animals, which is a prerequisite for further colonization and invasion.

The genetic locations of the F17 fimbrial adhesins are rarely studied in detail even though some F17-A variants were reported to be preferentially located on plasmids or on the chromosome of *E. coli* (3, 23, 24, 34). A particular variant may have either a plasmidic or chromosomal location depending on the *E. coli* isolate considered. In MHI813, *f17Ae* was chromosomally located (10) but this location was not investigated in the rest of the collection studied. Here, we found that *f17Ae* was principally plasmid-located (60.5%). Moreover, *f17Ae*-carrying plasmids were all of the IncF family, which is coherent with previous data on *f17*-carrying plasmids. In the same way, *f17G3* was exclusively found to be chromosomally located, which is coherent with data on MHI813 strain (10). As *f17G3* was detected on a genomic island in MHI813 strain, it could be interesting to further determine *f17G3* carriage on the chromosome in the *f17G3*-carrying isolates of the study.

As, in NTEC2 isolates, F17 fimbrial adhesins are usually associated with CNF2 - and to a lesser extent CDT-III (12) - production, we investigated the presence of those genes in the *f17Ae* positive isolates. Interestingly, in *cnf2*-positive isolates, *f17Ae* and *cdtIII* were either both plasmidic or both non-plasmidic-located, and this prompted us to investigate to what extent those three genes were linked on the same plasmid or not. Indeed, when present in the same cell, *cnf2*, *f17Ae* and *cdtIII* were found on the same 150 kb IncF plasmid. In addition, this 150 kb IncF plasmid differed from the 140 kb IncF plasmid carrying *cnf2* alone. This suggests two divergent lineages of *cnf2*-carrying IncF plasmids, depending on the presence (or not) of the *f17Ae* and *cdtIII* genes. As this distribution was observed in unrelated backgrounds of *E. coli* isolates originating from unrelated calves, this would rather correspond to two different evolutionary paths of *cnf2*-carrying IncF plasmids than to divergent evolutions of NTEC2 clones. Nevertheless, this plasmid distribution also discriminates somehow the *E. coli* population in different main clusters, suggesting that a clonal component of this issue is not to exclude. This may result from chromosomal integration of plasmidic genes occurring at certain time points of the evolution, combined with further clonal expansion of the newly recombined *E. coli* clones.

To get further insights into this plasmid distribution in NTEC2 isolates, we investigated the nature of the repFII and repFIB replicons of IncF plasmids either carrying the *cnf2* gene only or all three *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes. Of note, none of the plasmids harbored a repFIA replicon, which is coherent with previous published data on virulence plasmids (25, 27). Surprisingly enough, this distribution reflected a strict partition of two repFII alleles (F74 and F75) among the two plasmid subpopulations. Certain FAB formulas were even highly predominant, such as F74:A-:B3 and F75:A-:B24. This similarity in FAB formulas among isolates is particularly noteworthy considering the diversity of the NTEC2 isolates, which were from different calves, different geographical origins throughout France and recovered at different periods of time. This reinforces the hypothesis of strong divergent evolutions of the

**Table 2 :** Genetic localizations of *fl7Ae*, *fl7-G3*, *cnf2* and *cdtIII* genes in the collection of *E. coli* isolates from diarrhetic calves in Iran.

Isolates	Clones	Resistance phenotype	Genes detection			Replicon types			Genetic localization			IncF plasmid size (kb)	IncF subtypes (FAB formulas)
			<i>fl7e-A</i>	<i>fl7G3</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	<i>fl7e-A</i>	<i>fl7G3</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>			
Iran 5	I	Tet	+	-	-	-	Inc F	-	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 9	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 10	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 14	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 19	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 20	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 24	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 29	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 34	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 38	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 50	I	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 26	II	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 28	II	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 30	II	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 32	III	Tet	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 47	III	S	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 48	III	S	+	-	-	-	FII, Y, II	Inc F	-	-	110	F57:A-B-	
Iran 39	IV	S	+	-	-	-	FII, FIB	Inc F	-	-	110	F18:A-B16	
Iran 33	V	Tet	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	Inc F	Inc F	Inc F	150	F74:A-B40	
Iran 46	V	Tet	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	Inc F	Inc F	Inc F	150	F74:A-B40	

S: Sensitive to all antibiotics tested, Tet: tetracycline

IncF plasmids in those NTEC2 isolates.

This hypothesis is even strengthened by the finding of a 150 kb F74:A-B40 plasmid specifically carrying the *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes in the only minor *E. coli* clone (2 isolates) among a collection of 58 *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran. On the contrary, in all other isolates that tested negative for *cnf2* and *cdtIII*, the *f17Ae* gene was carried on non-F74 non-F75 IncF-type plasmids, and mostly on a 110 kb F57:A-B- plasmid. In all, these data obtained from a totally different context again suggest a strong association of the repFII F74 allele and the simultaneous spread of the *cnf2*, *cdtIII* and *f17Ae* genes in NTEC2 isolates.

The driving forces for such divergent evolutions are not known, and one may consider that antimicrobial resistance may play a role, as all NTEC2 isolates were resistant or multidrug resistant to antibiotics. Also, ESBL genes are regularly recognized on IncF plasmids. However, FAB formulas reported here were newly described, which may argue for different IncF plasmid lineages disseminating antimicrobial resistance and virulence factors. Nevertheless, this issue should be kept under attention as resistance of antimicrobials has widely colonized the cattle *E. coli* flora over time and may well contribute to the selection of virulence determinants in the future, such as of *cnf2* and *cdtIII*, thanks to further plasmid evolutions among the IncF family.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interest.

### **Authors' contributions**

EO and JYM conceived the study. MB performed all practical work. MB, MH and JYM contributed to the analysis of the results. All authors read and approved the manuscript.

### **Funding information**

This work was supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses). Morgan Bihannic had a PhD fellowship from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

### **Acknowledgements**

We gratefully thank Marisa Haenni for providing the collection of *E. coli* isolates from healthy calves in France.

### **References**

1. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123–140.
2. **Russo TA, Johnson JR.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **181**:1753–1754.
3. **Mainil J.** 2003. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : I) les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann Médecine Vét* **147**:105–126.
4. **Le Bouguéneq C, Bertin Y.** 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* **30**:317–342.
5. **Buts L, Bouckaert J, De Genst E, Loris R, Oscarson S, Lahmann M, Messens J, Brosens E, Wyns L, De Greve H.** 2003. The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic *Escherichia coli* has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N-acetylglucosamine. *Mol Microbiol* **49**:705–715.
6. **Morris JA, Thorns CJ, Scott AC, Sojka WJ.** 1982. Adhesive properties associated with the Vir plasmid: a transmissible pathogenic characteristic associated with strains of invasive *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **128**:2097–2103.
7. **Girardeau JP, Dubourguier HC, Contrepolis M.** 1979. Attachement des *Escherichia coli* entéropathogènes à la muqueuse intestinale. *Gastro-Entérites Néonatales Veau* **53–66**.
8. **Bertin Y, Girardeau JP, Darfeuille-Michaud A, Contrepolis M.** 1996. Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infect Immun* **64**:332–342.
9. **Bertels A, Pohl P, Schlicker C, Charlier G, Lintermans P, van Driessche E, De Greve H.** 1989. Isolation of the F111 fimbrial antigen on the surface of a bovine *Escherichia coli* strain isolated out of calf diarrhea: characterization and discussion of the need to adapt recent vaccines against neonatal calf diarrhea. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr* **58**:118–122.
10. **Bihannic M, Ghanbarpour R, Auvray F, Cavalié L, Châtre P, Boury M, Brugère H, Madec J-Y, Oswald E.** 2014. Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Vet Res* **45**:76.
11. **Bertin Y, Martin C, Oswald E, Girardeau JP.** 1996. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **34**:2921–2928.
12. **De Rycke J, Milon A, Oswald E.** 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Res* **30**:221–233.
13. **Caprioli A, Falbo V, Roda LG, Ruggeri FM, Zona C.** 1983. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* **39**:1300–1306.

14. **De Rycke J, González EA, Blanco J, Oswald E, Blanco M, Boivin R.** 1990. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **28**:694–699.
15. **Mainil JG, Jacquemin E, Pohl P, Fairbrother JM, Ansuini A, Le Bouguéne C, Ball HJ, De Rycke J, Oswald E.** 1999. Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Vet Microbiol* **70**:123–135.
16. **Orden JA, Domínguez-Bernal G, Martínez-Pulgarín S, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J, Blanco J, de la Fuente R.** 2007. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* **10**:47–55.
17. **Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D, García S, de la Fuente R.** 1999. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Vet Microbiol* **66**:265–273.
18. **Mainil JG, Jacquemin E, Oswald E.** 2003. Prevalence and identity of *cdt*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **94**:159–165.
19. **Pérès SY, Marchès O, Daigle F, Nougayrède JP, Hérault F, Tasca C, De Rycke J, Oswald E.** 1997. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol* **24**:1095–1107.
20. **Lopez-Alvarez J, Gyles CL.** 1980. Occurrence of the *vir* plasmid among animal and human strains of invasive *Escherichia coli*. *Am J Vet Res* **41**:769–774.
21. **Oswald E, De Rycke J, Guillot JF, Boivin R.** 1989. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of *Vir* plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* **49**:95–99.
22. **Smith HW.** 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J Gen Microbiol* **83**:95–111.
23. **el Mazouari K, Oswald E, Hernalsteens JP, Lintermans P, De Greve H.** 1994. F17-like fimbriae from an invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect Immun* **62**:2633–2638.
24. **Oswald E, de Rycke J, Lintermans P, van Muylem K, Mainil J, Daube G, Pohl P.** 1991. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **29**:2522–2527.
25. **Johnson TJ, DebRoy C, Belton S, Williams ML, Lawrence M, Nolan LK, Thorsness JL.** 2010. Pyrosequencing of the *Vir* plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **144**:100–109.
26. **Van Bost S, Roels S, Oswald E, Mainil J.** 2003. Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves. *Microbes Infect Inst Pasteur* **5**:1189–1193.

27. **Johnson TJ, Nolan LK.** 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:750–774.
28. **Dahmen S, Haenni M, Châtre P, Madec J-Y.** 2013. Characterization of blaCTX-M IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J Antimicrob Chemother* **68**:2797–2801.
29. **Shin J, Choi M-J, Ko KS.** 2012. Replicon sequence typing of IncF plasmids and the genetic environments of blaCTX-M-15 indicate multiple acquisitions of blaCTX-M-15 in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from South Korea. *J Antimicrob Chemother* **67**:1853–1857.
30. **Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A.** 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* **65**:2518–2529.
31. **Haenni M, Châtre P, Métayer 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.
32. **Bürk C, Dietrich R, Açar G, Moravek M, Bülte M, Märtilbauer E.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* **41**:2106–2112.
33. **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**:219–228.
34. **Lintermans PF, Pohl P, Deboeck F, Bertels A, Schlicker C, Vandekerckhove J, Van Damme J, Van Montagu M, De Greve H.** 1988. Isolation and nucleotide sequence of the F17-A gene encoding the structural protein of the F17 fimbriae in bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **56**:1475–1484.



## **Article 3 : Detection of related F-type plasmids carrying the Cytotoxic Necrotizing Factor *cnf2*, Cytolethal Distending Toxin *cdtIII* and *f17Ae* fimbriae variant genes in necrotoxicogenic NTEC2 *Escherichia coli* from healthy and diarrheic calves in France**

Morgan Bihannic<sup>1,2,3</sup>, Marisa Haenni<sup>1</sup>, Eric Oswald<sup>2,3,4</sup>, Jean-Yves Madec<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Anses Lyon, Lyon, France.

<sup>2</sup>INRA USC1360, Toulouse, France.

<sup>3</sup>Inserm UMR1043 / CNRS UMR5282 / Université Toulouse III, Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, France.

<sup>4</sup>CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-Hygiène, Toulouse, France.

Article en préparation.

### **Abstract**

The type 2 necrotoxicogenic strains of *E. coli* (NTEC2) are frequently detected in diarrheic and septicemic calves. NTEC2 strains are defined by the production of the CNF2 variant of cytotoxic necrotizing factors (CNFs) and are also known for the usual expression of the CDT-III variant of cytolethal distending toxins (CDTs) and of F17 fimbriae. The genetic determinants of CNF2, CDT-III and F17 fimbriae are regularly reported on Vir plasmids. Recently, two divergent lineages of IncF *cnf2*-carrying plasmids were highly detected in a collection of *E. coli* strains from calves in France and Iran. In this study, we investigated the genetic carriage of *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes in a collection of *E. coli* strains isolated from diarrheic and healthy calves in France. Surprisingly, we reported a nearly exclusive carriage of these genes by 150 kb IncF plasmids harbouring the F74 allele of repFIIA replicon. We also identified a carriage of *f17Ae* gene alone on 110 kb IncF plasmids harbouring the F57 allele of repFIIA replicon, as previously described. These results may weigh in favour of the hypothesis of an involvement of a limited number of IncF plasmids lineages in the evolution and dissemination of NTEC2 pathovar, more than NTEC2 clonal divergence.

## Introduction

*Escherichia coli* is considered a predominant member of the normal microflora of mammals. Nonetheless, due to high genetic plasticity within this species, some *E. coli* strains may also be responsible for intestinal and extra-intestinal infections (Kaper et al., 2004). Accordingly, several pathovars of *E. coli* have been described and reported over time, both in humans and animals (Kaper et al., 2004; Russo and Johnson, 2000). *E. coli* infections generally result from a combination between host susceptibility and biological functions expressed by the pathogenic *E. coli*. These functions correspond essentially to production of fimbrial or afimbrial adhesins to adhere to host cells, allowing colonization, and the production of toxigenic factors.

In cattle, *E. coli* isolates from diarrheic and septicemic calves often produce fimbrial adhesins named F17 fimbriae (Le Bouguéneć and Bertin, 1999; Mainil, 2003), which bind N-acetyl-D-glucosamine (Glc-NAc)-containing receptors present on host intestinal epithelial cells (Buts et al., 2003; Le Bouguéneć and Bertin, 1999). F17 fimbriae consist of fine filamentous heteropolymers composed of two main subunits : the pilin F17-A subunit, that forms the bulk of the fimbriae, and the adhesin F17-G subunit (Le Bouguéneć and Bertin, 1999). Several variants were reported: F17a-A, F17b-A, F17c-A, F17d-A, F17e-A and F17f-A for the pilin F17-A (Girardeau et al., 1979; Morris et al., 1982; Bertin et al., 1996a; Bertels et al., 1989) and F17-G1, F17-G2 and F17-G3 for the adhesin F17-G (Bertin et al., 1996b; Bihannic et al., 2014).

In pathogenic *E. coli* isolated from diarrheic and septicemic calves, F17 fimbriae were regularly found associated with toxigenic factors, such as CNF2 variant of cytotoxic necrotizing factors (CNFs) and CDT-III variant of cytolethal distending toxins (CDTs) (De Rycke et al., 1999; Le Bouguéneć and Bertin, 1999). The CNF2 variant of CNFs is used to define the necrotoxicogenic *E. coli* type 2 (NTEC2) group of pathogenic *E. coli* (De Rycke et al., 1999). This pathovar is known to be responsible for diarrhea and septicemia outbreak in calves (De Rycke et al., 1999; Van Bost et al., 2001b, 2003).

The genetic location of these genes, either plasmidic or on the chromosome, has a crucial impact on the spread of virulence-associated properties within the *E. coli* population. As a major example, the Vir plasmid was reported to propagate the *cnf2* and *f17Ab* genes in NTEC2 cattle isolates (Morris et al., 1982; Oswald et al., 1991). Also, such plasmids usually carry other genes, as shown for pVir68 carrying both *cnf2*, *cdtIII* and *f17Af* genes (Bihannic et al., 2014; Johnson et al., 2010). Those plasmids mostly belong to the F-type family even though a comprehensive picture of the different IncF plasmid subtypes disseminating those genes is lacking.

Lately, the F17e-A variant was abundantly found in *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran and associated to F17-G3 variant on a pathogenicity or fitness island in the MHI813 *E. coli* strain (Bihannic et al., 2014). These two variants were also identified in a collection of *E. coli* isolates from healthy calves in France and different combinations of plasmidic carriages of *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes were identified in *E. coli* isolates from healthy calves in France and diarrheic calves in Iran (article 2). Using plasmid Multi Locus Sequence Typing (pMLST) – a method set up for studying the epidemiology of IncF plasmids carrying

antimicrobial resistance genes (Villa et al., 2010), all *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII*-carrying IncF plasmids were found to harbor the F74 repFIIA replicon allele whereas *f17Ae*-carrying IncF plasmids harbored the F57 repFIIA replicon allele. These results suggested that *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes are driven by specific evolutionary pathways, and in order to clarify the major driving forces involved in this evolution, the analysis of these genes carriage could of high interest.

In this study, we studied *cnf2*, *cdtIII* and *f17e-A* genes location in NTEC2 isolates from healthy and diarrheic calves in France. These genes were detected exclusively on IncF plasmids. The sub-typing of these plamids highlighted specific distributions of repFIIA replicons, which confirmed the divergent evolutionary pathways observed in our previous report (article 2).

## Materials and methods

### Collection of *E. coli* isolates from healthy calves

Between November 2013 and July 2014, a collection of *E. coli* strains was recovered from rectal swabs of 498 healthy calves from 10 farms in Western France. The calves were sampled two times, at 9 to 50 days old (median age: 18.5 days) and at 5 to 6 months. Due to mortality, 481 calves aged from 5 to 6 months were sampled at the second sampling time. Briefly, MacConkey agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were inoculated with both rectal swabs for each animal and one colony was arbitrarily selected after 24h incubation at 37°C. All the isolates selected were identified as *E. coli* using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis.

### Collection of *E. coli* isolates from diarrheic calves

Between March 2014 and May 2014, a collection of *E. coli* strains was recovered from rectal swabs of 122 diarrheic calves in France. All the diarrheic calves were under 1 month old. In brief, MacConkey agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were inoculated with rectal swabs for each animal and one colony was arbitrarily selected after 24h incubation at 37°C. All the isolates selected were identified as *E. coli* using colony morphology and API20E tests (bioMérieux).

### Determination of F17e-A, F17-G3, CNF2 and CDT-III producers

After DNA extraction of each isolate, F17A was searched by PCR with F17 common primers (Bertin et al., 1996b). Detection of F17e-A and F17-G3 variants was then performed by PCR with specific primers (Bihannic et al., 2014), using MHI813 (Bürk et al., 2003) and MG1655 *E. coli* as positive and negative controls, respectively. On the F17e-A and F17-G3 positive isolates, *cnf2* and *cdtIII* were searched by PCR (Johnson et al., 2010), using 6.0900 (Johnson et al., 2010) and MG1655 *E. coli* as positive and negative controls, respectively.

### **Clonality of the *E. coli* isolates**

Clonality of the F17e-A and F17-G3 positive isolates was investigated by Pulse-field Gel Electrophoresis (PFGE). In brief, whole-cell DNA was digested with *Xba*I (for 16 hours at 37°C) after lysis by lysozyme and proteinase K. Electrophoresis of enzyme-generated fragments was performed with a contour-clamped electric field CHEF Mapper XA System apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA) through a 1% agarose gel. Migration was performed for 24 hours at 14°C, with an electric field of 6 V/cm. DNA bands patterns were stained with ethidium bromide, photographed with a Gel Doc XR System (Bio-Rad), and analyzed with Gelcompar II 6.5 software. DNA bands size was determined from CHEF DNA Size Standard, Lambda Ladder (Bio-Rad) (Size range: 50-1000 kb).

### **Plasmid analysis and Southern blot**

On the different F17e-A and F17-G3 positive clones identified by *Xba*I PFGE, the plasmid content was investigated by nuclease S1-PFGE. Briefly, whole-cell DNA from *E. coli* isolates was digested with S1 nuclease (for 45 minutes at 37°C) after lysis by lysozyme and proteinase K. Electrophoresis of linearized plasmids was performed in the same conditions as described above, except that migration was performed for 20 hours. After ethidium bromide staining and digital photograph, DNA fragments were transferred on Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (GE healthcare, Pittsburgh, USA). Then, plasmidic or non plasmidic locations of *f17Ae*, *f17G3*, *cnf2* and *cdtIII* genes was investigated by Southern Blot with specific probes labeled with a DIG probe (Roche, Basel, Switzerland).

### **IncF plasmid typing and subtyping**

Characterization of the plasmid families was performed by PCR-based replicon typing (Carattoli et al., 2005). In isolates harboring *f17Ae*, *f17G3*, *cnf2* or *cdtIII* genes on plasmids, a complete sequencing of the RepFIIA, RepFIA and RepFIB replicons was performed and the Replicon Sequence Typing (RST) scheme was used to produce the FAB formula (Villa et al., 2010).

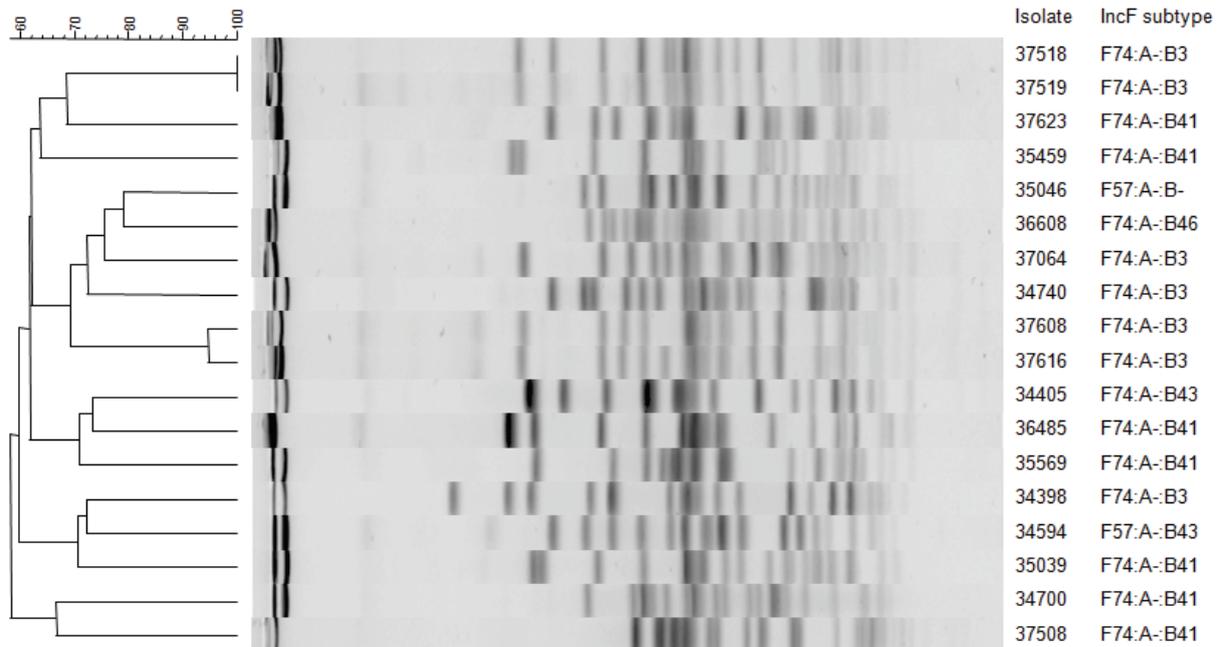
## **Results**

### **Prevalence of F17e-A and F17-G3 in healthy and diarrheic calves**

Among the collection of *E. coli* isolates from the 498 healthy calves, 94 from calves at 9 to 50 days were tested positive for F17-A and/or F17-G (94/498, 18.9%) and 43 from calves at 5 to 6 months (43/481, 8.9%). Among those isolates, 9 from calves at 9 to 50 days were positive for F17e-A (9/498, 1.8%) and 9 from calves at 5 to 6 months (9/481, 1.9%). No F17-G3 positive isolate was detected neither in calves at 9 to 50 days, nor in calves at 5 to 6 months. Of note, the 9 F17e-A positive *E. coli* isolates from the 9 to 50 days calves were from different calves than the other 9 F17e-A positive *E. coli* isolates.

Among the 122 *E. coli* isolates from the diarrheic calves, 25 were positive for F17-A (25/122, 20.5%), of which 2 produced F17e-A (0.1%). No F17-G3 positive isolate was detected.

The 18 F17e-A positive *E. coli* clones from the healthy calves were weakly related, except # 37518 and # 37519 which correspond to the same F17e-A positive clone, and # 37608 and # 37616 which were related at more than 90% (Figure 1). In the same way, the 2 F17e-A positive *E. coli* clones from the diarrheic calves were also weakly related (data not shown).

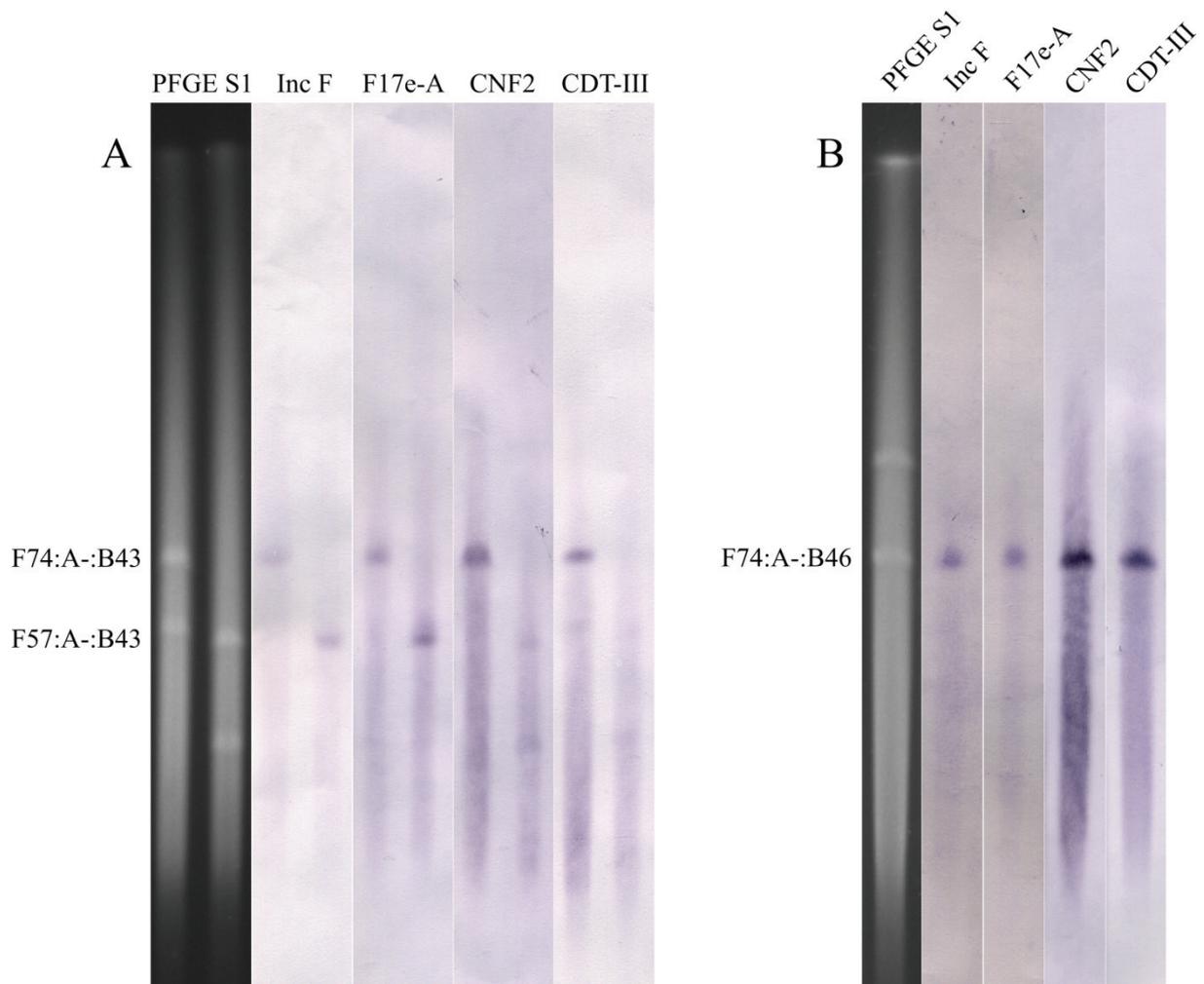


**Figure 1 :** PFGE *XbaI* profiles of the F17e-A producing *E. coli* isolates from healthy calves in France. The PFGE profiles were analyzed with Gelcompar II 6.5 software, using Dice similarity coefficient, 0% optimization, 1% tolerance and UPGMA clustering method.

#### Detection and co-localization of *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes

All the F17e-A positive *E. coli* from healthy calves were also positive for CNF2 and CDT-III, except for # 34594 and # 35046 which were positive neither for CNF2 nor for CDT-III (Table 1). The 2 F17e-A positive *E. coli* from diarrheic calves were also positive for CNF2 and CDT-III. All F17e-A positive *E. coli* harbored IncFIB/FIIA plasmids, the repFIIA being never detected, except for # 35046 which carried a IncFIIA plasmid (Table 1).

As shown on Southern blots on S1-PFGE gels using appropriate probes, all F17e-A positive *E. coli* from healthy and diarrheic calves harbored a 150 kb F-type plasmid carrying the *cnf2*, *cdtIII*, and *f17Ae* genes (Figure 2), except for the two CNF2/CDT-III negative isolates from healthy calves (# 34594 and # 35046), which harbored a 110 kb F-type plasmid carrying the *f17Ae* gene (Figure 2).



**Figure 2** : PFGE S1 profiles and Southern blot representative of F17e-A positive *E. coli* isolates from (a) healthy calves and (b) diarrheic calves. The profiles shown were obtained with (a) strains 34405 and 34594 and (b) strain 37172, respectively Southern blots were performed with F17e-A, CNF2, CDT-III and IncF probes

### Replicon types of plasmids carrying *f17e-A*, *cnf2* and *cdtIII* genes

Among the F17e-A positive *E. coli* isolates from healthy and diarrheic calves, the replicon sequencing demonstrated that a limited number of combinations of repFIB and repFIIA replicons alleles (FAB formulas) were observed. In particular, for the *f17Ae*, *cnf2* and *cdtIII*-carrying IncF plasmids, the F74 repFIIA allele was systematically identified, associated with the B3, B41 and B43 repFIB alleles in *E. coli* from healthy calves, and the newly assigned B45 and B46 alleles (this study) in *E. coli* from diarrheic calves. Incidentally, B46 is related with B3, B41 and B43, whereas B45 differs from all of the others (10 mutations at least). In the two CNF2/CDT-III negative isolates from healthy calves, the F57 repFIIA allele was identified on the *f17Ae*-carrying IncF plasmids, associated with the B43 repFIB allele or without any repFIB replicon.

**Table 1** : Resistance phenotypes and genetic locations of *fl7Ae*, *fl7G3*, *cnf2* and *cdtIII* genes in *E. coli* isolates from healthy and diarrheic calves.

Isolates	Resistance phenotype	Genes detection			Replicon types		Genetic localization			IncF subtypes (FAB formulas)
		<i>fl7e-A</i>	<i>fl7G3</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	<i>fl7e-A</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>		
5 to 6 months old	Sul, Tmp	+	-	+	+	FII, FIB, I1, Y	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
	S	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
	S	+	-	+	+	FII, FIB, I1	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B41
	S	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B41
	Amx, Tic, Str, Kan, Tet, Sul	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B41
	Tet	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B41
	Sul, Tmp	+	-	+	+	FII, FIB, Y	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B43
	S	+	-	-	-	FII, FIB	Inc F	-	-	F57:A-;B43
	Tet	+	-	-	-	FII, I1	Inc F	-	-	F57:A-;B-
	Tet, Sul	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
9 to 50 days old	Tet	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
	Tet	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
	Tet	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
	Amx, Tic, Str, Tet, Sul	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
	Amx, Tic, Str, Kan, Tet, Sul	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B3
	S	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B41
	Str, Chl, Ffc, Tet, Sul	+	-	+	+	FII, FIB, B/O	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B41
	Tet	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B41
	Amx, Tic, Str, Kan, Tet, Sul	+	-	+	+	FII, FIB, P, B/O	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B46
	ND	+	-	+	+	FII, FIB	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B45
Diarrheic calves	ND	+	-	+	+	FII, FIB, H11	Inc F	Inc F	Inc F	F74:A-;B46

S: Susceptible to all antibiotics tested, Amx: amoxicillin, Tic: ticarcillin, Str: streptomycin, Kan: kanamycin, Gen: gentamicin, Tob: tobramycin, Chl: chloramphenicol, Ffc: florfenicol, Tet: tetracycline, Sul: sulfonamides, Tmp: trimethoprim, Nal: nalidixic acid, Enr: enrofloxacin, Ofx: ofloxacin - **37518** and **37519** : correspond to a same *E. coli* clone.

## Discussion

F17e-A is a recently described variant of F17 fimbriae pilin. Closely related to F17b-A, this variant was first identified from a collection of pathogenic *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran (Bihannic et al., 2014). F17e-A was also weakly detected among *E. coli* isolates from another collection of healthy adult bovines (0.8%) (Bihannic et al., 2014), suggesting an association between F17e-A and virulence, as proposed for other F17 variants in newborn calves (el Mazouari et al., 1994; Mainil, 2003; Oswald et al., 1991). Lately, a higher prevalence of F17e-A variant in healthy calves was reported (article 2), suggesting that F17e-A preferentially confers adherence to intestine cells in young animals. Here, we reported a steady prevalence of F17e-A variant in healthy calves from birth to 6 months old, higher than the prevalence determined in healthy adult bovines (Bihannic et al., 2014). These results confirm the hypothesis of a preferential adherence to intestine cells in calves conferred by F17e-A variant. However, these results don't reinforce the idea of an association between F17e-A and virulence, even more in newborn calves.

As F17e-A variant was chromosomally detected in *E. coli* strain MHI813 (Bihannic et al., 2014), but mostly detected on F-type plasmids in *E. coli* isolates from healthy and diarrheic calves in France and Iran (article 2), we investigated *fl7Ae* gene location. We reported an exclusive carriage on F-type plasmids in the collection of *E. coli* isolates from healthy and diarrheic calves in France. These results suggest that F17e-A variant is mainly carried on F-type plasmids and could be consequently associated to specific properties conferred to *E. coli* strains that carry these plasmids.

Considering the fact that F17 fimbrial adhesins are usually associated with CNF2 production - and to a lesser extent CDTIII (De Rycke et al., 1999; Orden et al., 1999; Van Bost et al., 2001a), the presence of *cnf2* and *cdtIII* genes was investigated in the F17e-A positive isolates. Interestingly, when *cnf2*, *cdtIII*, and *fl7Ae* genes were found in association, they were systematically detected on a 150 kb IncF plasmid, as previously reported in *E. coli* isolates from healthy and diarrheic calves (article 2). In the same way, when *fl7Ae* gene was found alone on plasmids, it was systematically found on a 110 kb IncF plasmid, as previously observed in *E. coli* isolates from diarrheic calves in Iran (article 2).

To elucidate the mechanisms involved in this plasmidic distribution, we investigated the nature of the repFIB and repFIIA replicons of IncF plasmids either carrying the *fl7Ae*, *cnf2* and *cdtIII* genes or the *fl7Ae* gene only. That is to note that, in coherence with previous published data (article 2), none of the plasmids harbored a repFIA replicon. All *cnf2*, *cdtIII*, and *fl7Ae* genes carrying 150 kb IncF plasmids were reported to harbor the F74 allele of repFIIA replicon, mostly with the related B3, B41 and B43 alleles of repFIB replicon whereas the *fl7Ae* gene carrying 110 kb IncF plasmids harbored F57:A-B43 and F57:A-B-combinations. This similarity in FAB formulas among isolates is particularly interesting considering the diversity of the *E. coli* isolates. Indeed, these isolates were recovered from healthy and diarrheic calves at different periods of time, and the calves were from different geographical origins throughout France. Furthermore, these combinations of replicon alleles were previously reported on the same type of plasmids (*cnf2*, *cdtIII*, and *fl7Ae* genes carrying 150 kb IncF plasmids/*fl7Ae* gene carrying 110 kb IncF plasmids) in *E. coli* isolates from

healthy and diarrheic calves (article 2). These observations suggest a strong association between the F74 allele of the repFIIA replicon and the simultaneous spread of the *cnf2*, *cdtIII* and *fl7Ae* genes in NTEC2 isolates on one hand, and between the F57 allele of the repFIIA replicon and the spread of *fl7Ae* gene on another hand. Finally, an involvement of strongly related IncF plasmids in NTEC2 pathovar emergence and dissemination could be assumed.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

### Acknowledgements

This work was supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses). Morgan Bihannic had a PhD fellowship from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses).

### References

- Bertels, A., Pohl, P., Schlicker, C., Charlier, G., Lintermans, P., van Driessche, E., De Greve, H., 1989. Isolation of the F111 fimbrial antigen on the surface of a bovine *Escherichia coli* strain isolated out of calf diarrhea: characterization and discussion of the need to adapt recent vaccines against neonatal calf diarrhea. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 58, 118–122.
- Bertin, Y., Girardeau, J.P., Darfeuille-Michaud, A., Contrepolis, M., 1996a. Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infect. Immun.* 64, 332–342.
- Bertin, Y., Martin, C., Oswald, E., Girardeau, J.P., 1996b. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2921–2928.
- Bihannic, M., Ghanbarpour, R., Auvray, F., Cavalié, L., Châtre, P., Boury, M., Brugère, H., Madec, J.-Y., Oswald, E., 2014. Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Veterinary Research* 45, 76. doi:10.1186/s13567-014-0076-9
- Bürk, C., Dietrich, R., Açar, G., Moravek, M., Bülte, M., Märtilbauer, E., 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2106–2112.
- Buts, L., Bouckaert, J., De Genst, E., Loris, R., Oscarson, S., Lahmann, M., Messens, J., Brosens, E., Wyns, L., De Greve, H., 2003. The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic *Escherichia coli* has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N-acetylglucosamine. *Mol. Microbiol.* 49, 705–715.

- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* 63, 219–228. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
- De Rycke, J., Milon, A., Oswald, E., 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.* 30, 221–233.
- el Mazouari, K., Oswald, E., Hernalsteens, J.P., Lintermans, P., De Greve, H., 1994. F17-like fimbriae from an invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect. Immun.* 62, 2633–2638.
- Girardeau, J.P., Dubourguier, H.C., Contrepolis, M., 1979. Attachement des *Escherichia coli* entéropathogènes à la muqueuse intestinale. *Gastro-entérites néonatales du veau* 53–66.
- Johnson, T.J., DebRoy, C., Belton, S., Williams, M.L., Lawrence, M., Nolan, L.K., Thorsness, J.L., 2010. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 144, 100–109. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.022
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140. doi:10.1038/nrmicro818
- Le Bouguéneq, C., Bertin, Y., 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.* 30, 317–342.
- Mainil, J., 2003. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : I) les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann. Méd. Vét.* 147, 105–126.
- Morris, J.A., Thorns, C.J., Scott, A.C., Sojka, W.J., 1982. Adhesive properties associated with the Vir plasmid: a transmissible pathogenic characteristic associated with strains of invasive *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2097–2103.
- Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., García, S., de la Fuente, R., 1999. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Vet. Microbiol.* 66, 265–273.
- Oswald, E., de Rycke, J., Lintermans, P., van Muylem, K., Mainil, J., Daube, G., Pohl, P., 1991. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrhoeic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2522–2527.
- Russo, T.A., Johnson, J.R., 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753–1754. doi:10.1086/315418
- Van Bost, S., Bâbe, M.H., Jacquemin, E., Mainil, J., 2001a. Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrhoeic calves between 1958 and 1970. *Vet. Microbiol.* 82, 311–320.
- Van Bost, S., Roels, S., Mainil, J., 2001b. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.* 81, 315–329.

- Van Bost, S., Roels, S., Oswald, E., Mainil, J., 2003. Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves. *Microbes Infect.* 5, 1189–1193.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., Carattoli, A., 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2518–2529. doi:10.1093/jac/dkq347



### I. Synthèse des résultats

Conformément aux objectifs initiaux de cette thèse, plusieurs variants des fimbriae F17 ont pu être caractérisés et le lien qui les associe à la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau a été évalué.

Parmi ces trois variants, le variant de la piline F17e-A, identifié initialement chez des souches d'*E. coli* isolées de veaux atteints de diarrhée en Iran, a été retrouvé associée aux nécrotoxines CNF2 et CDT-III chez des souches d'*E. coli* isolées chez des veaux sains et diarrhéiques en France. Tout comme le variant F17b-A, auquel il est fortement apparenté, il est retrouvé de façon significative associé à des plasmides Vir, qui sont porteurs des gènes *cnf2* et *cdtIII* codant les nécrotoxines CNF2 et CDT-III et, de ce fait, caractéristiques des souches d'*E. coli* classées au sein du pathovar NTEC2. De façon surprenante, les différents plasmides identifiés au sein de l'ensemble des souches utilisées qui sont porteurs du gène *f17Ae*, qui code le variant F17e-A, et des gènes *cnf2* et *cdtIII*, appartiennent à une même lignée de plasmides IncF d'une taille d'environ 150 kb. D'autres plasmides, porteurs du gène *cnf2* uniquement, appartiennent tous également à une même lignée de plasmides IncF d'une taille d'environ 140 kb. En outre, le gène *f17Ae* a été détecté seul sur des plasmides IncF d'une autre lignée plasmidique chez les souches isolées en Iran et deux souches isolées de veaux sains en France. Un dernier type de portage, au niveau d'un possible îlot de pathogénicité situé sur le chromosome bactérien, a été détecté chez la souche MHI813, qui a été isolée d'un bovin adulte.

Le variant de l'adhésine F17-G3 a été identifié sur le même îlot génomique porteur du gène *f17Ae*, situé sur le chromosome de la souche MHI813. Ce variant se caractérise par un portage exclusivement chromosomique, détecté chez des souches d'*E. coli* isolées de veaux sains en France. Il est très différent des deux variants F17-G1 et F17-G2, avec une partie NH<sub>2</sub>-terminale ne présentant aucune similitude avec la partie correspondante chez les deux autres variants.

Le dernier variant caractérisé au cours des travaux effectués dans le cadre de cette thèse est le variant F17f-A de la piline des fimbriae F17, découvert chez la souche 6.0900, en particulier au niveau de son plasmide Vir68. Ce plasmide, porteur des gènes *cnf2* et *cdtIII*, est caractéristique du pathovar NTEC2. Le variant f17f-A correspond à une combinaison des variants F17c-A et F17d-A. Le gène *f17Af*, codant ce variant, est en effet constitué de la séquence codant la partie NH<sub>2</sub>-terminale du variant F17c-A et de la séquence codant la partie COOH-terminale du variant F17d-A, séparée par une séquence très conservée de 30 pb.

## II. Discussion

L'ensemble des résultats obtenus au cours des travaux réalisés pendant cette thèse sont traités sous trois angles différents, cherchant à élucider le rôle joué par la variation des fimbriae F17 chez la bactérie *E. coli*, son lien avec la virulence des souches d'*E. coli* pathogènes, et, plus largement, le caractère pathogène des souches constituant le pathovar NTEC2.

### II.1. Rôle biologique de la variation des fimbriae F17

L'identification des trois variants F17e-A, F17f-A, et F17-G3 portent à neuf le nombre de variants des fimbriae F17 actuellement décrits chez la bactérie *E. coli*, et il est probable qu'il existe d'autres variants supplémentaires n'ayant pas encore été décrits. Le nombre de ces variants exprimés par les souches bovines d'*E. coli* interpelle et soulève notamment la question du rôle biologique de cette variation.

Pour apporter des éléments de réponse à cette question, il est nécessaire de la replacer du point de vue de la structure moléculaire des fimbriae F17. Cette variation ne concerne en effet que la piline F17A et l'adhésine F17G, qui correspondent aux deux principales sous-unités constituant le corps des fimbriae F17 (Le Bouguéneq and Bertin, 1999; Mainil, 2003). Ces fimbriae, et les deux sous-unités qui les composent, sont exprimés à la surface des cellules bactériennes et exposés à l'environnement extérieur de la bactérie. De fait, la piline F17A, connue pour son caractère immunogène et utilisée de ce fait comme valence vaccinale (Contrepois, 1996), représente une cible potentielle pour le système immunitaire de l'hôte et le développement d'anticorps spécifiques. L'existence de variations au niveau de la piline peut donc constituer une stratégie d'échappement au système immunitaire de l'hôte, augmentant les chances de colonisation de l'hôte par une souche d'*E. coli* pathogène exprimant des fimbriae F17.

Concernant l'adhésine F17G, l'existence de variations peut avoir pour conséquence la modification du phénotype d'adhésion des souches d'*E. coli* productrices de fimbriae F17. Cette modification peut se traduire par la fixation sur d'autres récepteurs spécifiques, une situation qui est probablement celle du variant F17-G3, eu égard à l'absence de similitudes dans sa partie NH<sub>2</sub>-terminale – responsable de la fixation au récepteur (Saarela et al., 1995), avec les deux variants F17-G1 et F17-G2. On notera à ce propos que les deux variants F17-G1 et F17-G2, qui présentent 99% de similitudes dans leurs séquences codantes respectives (Bertin et al., 1996b), reconnaissent probablement les mêmes récepteurs, formant vraisemblablement un même et unique variant. Une autre conséquence potentielle de la variation de l'adhésine des fimbriae F17 consiste en un changement du tropisme d'hôte d'une souche d'*E. coli* productrice d'un variant particulier de l'adhésine F17G, lui conférant une capacité d'adaptation à une niche écologique différente au sein du tractus intestinal de l'hôte voire à une niche constituée par un nouvel hôte.

La variation chez les fimbriae F17 peut donc représenter un avantage sélectif pour les souches d'*E. coli* qui colonisent le tractus digestif des bovins. Cet avantage sélectif pourrait expliquer la dissémination observée des différents variants décrits au sein des populations bovines d'*E. coli*.

Dans le cas de souches pathogènes bovines d'*E. coli*, les avantages conférés en terme de capacité de colonisation par la variation des fimbriae F17 représente un risque accru d'apparition d'épidémies de diarrhées chez les veaux. Pour contrer ce risque, la principale solution à la disposition des éleveurs consiste à vacciner les mères gestantes afin d'induire une immunité passive chez les veaux nouveau-nés par ingestion de colostrum. Le colostrum de mères vaccinées contient en effet des anticorps dirigés, entre autres, contre la piline des fimbriae F17. Actuellement, les principales solutions vaccinales présentes sur le marché (Immocolibov, Trivacton 6) n'utilisent que le variant F17a-A de la piline comme valence vaccinale. L'absence de détection des variants autres que F17a-A par le sérum FY, produit par injection du variant F17a-A chez le lapin, soulève la question de l'efficacité de ces formules vaccinales face à la variété des fimbriae F17 exprimés par les souches pathogènes d'*E. coli* chez le veau. Il pourrait ainsi être judicieux d'ajouter aux actuelles valences utilisées les autres variants connus de la piline des fimbriae F17 afin de conférer une efficacité optimale à ces vaccins.

## **II.2. Lien des nouveaux variants identifiés avec la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau**

Les gènes codant les trois variants des fimbriae F17 identifiés au cours de cette thèse ont été détectés sur différentes structures génétiques et une association avec le pathovar NTEC2 a été décrite pour deux de ces variants. Ces résultats semblent indiquer l'existence d'un lien entre ces variants et la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau. Ce lien est discuté pour chacun des trois variants.

- Lien du variant F17e-A avec la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau

Le principal lien entre la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau et le variant de la piline F17e-A est établi avec le pathovar NTEC2. Le gène *f17Ae* a, en effet, été retrouvé sur des plasmides Vir porteurs des gènes de virulence *cnf2* et *cdtIII*. Cette association est en adéquation avec les données de la littérature concernant les fimbriae F17 (Bertin et al., 1996b; Orden et al., 1999), et notamment le variant F17b-A (el Mazouari et al., 1994; Oswald et al., 1991), auquel le variant F17e-A est fortement apparenté. La contribution du variant F17e-A à la virulence des NTEC2 n'est toutefois pas connue avec précision, comme c'est le cas pour les fimbriae F17 en général. La notion même de virulence des souches NTEC2 demeure par ailleurs à définir, en témoigne leur détection au cours de cette thèse, chez des veaux sains ou malades, d'âges variables. Ces points sont discutés dans la partie II.3 de ce chapitre.

Curieusement, les plasmides Vir porteurs des gènes *f17Ae*, *cnf2* et *cdtIII*, identifiés au cours des travaux effectués pendant cette thèse, sont tous porteurs de réplicons repFIIA

identiques (allèle F74) et repFIB très semblables (allèles B3 et B40 à B46) suggérant leur appartenance à une même famille de plasmides IncF. De la même manière, les plasmides Vir porteurs du gène *cnf2* seul, qui ont été identifiés en parallèle, appartiennent à une même famille de plasmides IncF. Ils présentent eux aussi des réplicons repFIIA identiques (allèle F75) et également des réplicons repFIB identiques (allèle B24). L'appartenance de l'ensemble de ces plasmides à deux familles distinctes est d'autant plus surprenante que les souches porteuses de ces plasmides ont été isolées d'animaux d'origine géographique variables et à des temps différents. Ces observations viennent confirmer l'hypothèse d'une évolution typique des plasmides Vir à partir d'une ossature plasmidique porteuse de réplicons de type repFIIA/FIB (Johnson et al., 2010a; Johnson and Nolan, 2009), et mettent en évidence l'importance des plasmides Vir dans la formation et la dissémination du pathovar NTEC2. En effet, ces résultats évoquent l'implication d'au moins deux voies évolutives principales dans la formation de ce pathovar, reposant sur les deux familles de plasmides IncF identifiées au cours de cette thèse, et infirment l'idée d'une évolution du pathovar NTEC2 reposant sur la formation de clones divergents.

Le gène *fl7Ae* a également été détecté au niveau chromosomique chez certaines des souches d'*E. coli* issues des collections étudiées pendant cette thèse. Ces souches, de type NTEC2, portent le gène *cnf2* au niveau de plasmides IncF appartenant à une des deux familles plasmidiques décrites précédemment (allèle F75 du réplicon repFIIA). Parmi ces souches, la présence des gènes *cdtIII* sur le chromosome bactérien a aussi été décelée dans certains cas. Les structures génétiques porteuses des gènes *fl7Ae* et *cdtIII* chez ces souches n'ont pas été recherchées, mais leur détermination pourrait apporter des indices sur le lien potentiel du variant F17e-A et de la toxine CDT-III avec une éventuelle virulence de ces souches. En témoigne la détection, en parallèle, du gène *fl7Ae*, associé sur un même cluster au gène *fl7G3*, sur un îlot génomique de 96 kb situé sur le chromosome de la souche MHI813, isolée des fèces d'un bovin adulte (Bürk et al., 2003). Cet îlot génomique constitue un potentiel îlot de pathogénicité, en raison notamment du portage d'un cluster de gènes codant le système de sécrétion de type VI, qui est connu pour son implication dans la virulence bactérienne chez de nombreuses bactéries Gram négatives parmi lesquelles la bactérie *E. coli* (Coulthurst, 2013; de Pace et al., 2011). Il est probable par ailleurs que cet îlot puisse également augmenter la fitness (valeur sélective) bactérienne dans son environnement, étant porteur du cluster de gènes codant les microcines H47 et I47, qui correspondent à des peptides antibactériens (Azpiroz et al., 2011; Vassiliadis et al., 2010). Ces caractéristiques suggèrent ainsi que les variants F17e-A et F17-G3 puissent être associés chez la souche MHI813 à un pouvoir pathogène, dont l'hôte ciblé et les propriétés restent à déterminer, ou, du moins, à des capacités d'adaptation à d'autres niches écologiques, elles aussi à déterminer.

Chez la majorité des souches d'*E. coli* isolées de veaux diarrhéiques en Iran, le gène *fl7Ae* a en outre été décelé sur des plasmides appartenant, comme pour les plasmides Vir identifiés au cours de cette thèse, à une même famille de plasmides IncF. Cette famille se caractérise par le portage de réplicons repFIIA uniquement, correspondant au sous-type F57. Aucun des habituels gènes de virulence des *E. coli* pathogènes bovins n'a pu être détecté, en plus du gène *fl7Ae*, sur les plasmides de cette famille. Il est donc impossible, en l'état,

d'établir un lien entre le variant F17e-A et l'expression d'une quelconque forme de virulence dans ce contexte génétique. Il est par ailleurs possible que les isolats d'*E. coli* porteurs de ces plasmides ne soient en réalité pas à l'origine des diarrhées observées chez les veaux. Cependant, la forte prévalence de ces plasmides au sein des souches isolées interroge. Il est également possible qu'un gène de virulence n'ayant pas encore été décrit dans la littérature ou, plus simplement, présent de façon inhabituelle chez des souches d'*E. coli* pathogènes chez le veau, puisse être à l'origine d'un éventuel pouvoir pathogène associé à ces plasmides, et donc au variant F17e-A.

- Lien du variant F17-G3 avec la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau

Le lien du variant F17-G3 avec la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau n'est pas clairement défini. Le gène *fl7G3* a été exclusivement détecté au niveau du chromosome bactérien chez les souches d'*E. coli* issues des différentes collections analysées pendant cette thèse. Les structures génétiques porteuses du gène *fl7G3* n'ont pas été recherchées et, comme dans le cas des gènes *fl7Ae* identifiés au niveau chromosomique, leur caractérisation permettrait d'élucider le lien du variant F17-G3 avec une éventuelle virulence ou des capacités d'adaptation à des environnements spécifiques. L'exemple de la détection du gène *fl7G3*, en même temps que le gène *fl7Ae*, sur un îlot génomique de 96 kb situé sur le chromosome de la souche MHI813, qui a été décrite précédemment, en est caractéristique. La très probable spécificité de récepteur du variant F17-G3 par rapport aux variants F17-G1 et F17-G2 – liée à l'absence de similitudes dans leurs parties NH<sub>2</sub>-terminales respectives, ainsi que le très faible taux, voire l'absence de détection parmi les souches des différentes collections étudiées, sont autant d'arguments supplémentaires en faveur d'une possible association du variant F17-G3 à des capacités d'adaptation à des niches écologiques particulières, qui peuvent se manifester par un tropisme d'hôte spécifique à ce variant.

- Lien du variant F17f-A avec la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau

Le lien du variant F17f-A avec la virulence des *E. coli* pathogènes chez le veau est établi, de façon semblable à ce qui a été décrit pour le variant F17e-A, avec le pathovar NTEC2. Le gène *fl7Af* a en effet été caractérisé sur le plasmide Vir68 présent chez la souche 6.0900, de type NTEC2 (Johnson et al., 2010a). De la même manière que pour le variant F17e-A et les fimbriae F17 dans leur ensemble, le lien précis entre variant F17f-A et virulence n'est pas défini, d'autant plus qu'aucune donnée de prévalence de ce variant au sein des souches d'*E. coli* pathogènes du veau n'est actuellement connue. De façon opportune, plusieurs de ces souches pathogènes, présentant un profil d'amplification positif par PCR pour les variants F17c-A et F17d-A, pourraient en réalité être porteuses du variant F17f-A (Bertin et al., 1996b). Pour remédier à ce problème, une détection du gène *fl7Af* sur des isolats d'*E. coli* issus de veaux atteints de diarrhées pourrait être envisagée. Néanmoins, les outils de détection moléculaire à disposition ne permettent pas de l'entreprendre. En effet, le gène *fl7Af*, qui correspond à une combinaison de la séquence codant la partie NH<sub>2</sub>-terminale du

variant F17c-A et de la séquence codant la partie COOH-terminale du variant F17d-A, ne présente aucune région permettant le design d'amorces de PCR spécifiques de ce variant.

### **II.3. Les souches NTEC2, des *E. coli* pathogènes "accidentels" du veau ?**

Les souches de type NTEC2 identifiées au cours des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, ont été isolées de veaux présentant des statuts différents : ces veaux étaient soit sains, soit atteints de diarrhées, et d'âges et d'origines géographiques variables. Ces observations soulèvent la question du pouvoir pathogène réel des souches de type NTEC2 chez le veau, et mettent en doute le lien existant entre la détection de ces souches chez des veaux malades et le déclenchement de diarrhées. Afin d'apporter des réponses à cette problématique, il est nécessaire de prendre en considération le facteur que représente l'hôte et son environnement, et de l'aborder sous l'angle de l'écologie microbienne.

- La virulence des NTEC2 est conditionnée par l'hôte et son environnement

Les souches d'*E. coli* de type NTEC2 sont, de manière générale, couramment retrouvées chez des bovins adultes, sans causer de pathologie (Blanco et al., 1998a, 1998b; Burns et al., 1996). Au sein des collections de souches analysées au cours de cette thèse, les souches de type NTEC2 identifiées ont été isolées de veaux sains âgés de quelques jours jusqu'à 6 mois, et chez des veaux atteints de diarrhées âgés de moins d'un mois. Aucune de ces souches n'a donc été détectée chez des veaux malades âgés de plus d'un mois, conformément aux données de la littérature (Fecteau et al., 2009; Orden et al., 1999). Cette observation suggère que l'âge du veau puisse jouer un rôle important dans la manifestation du pouvoir pathogène des NTEC2. En effet, le veau nouveau-né dispose d'un système immunitaire immature, et donc de capacités de résistance à d'éventuels pathogènes beaucoup plus faibles que celles d'un veau plus âgé. De la même manière, le microbiote d'un veau âgé de quelques jours présente moins de diversité que celui d'un animal plus âgé. Il subit de fortes modifications de sa composition microbienne dans les premiers jours après la naissance alors que, dès l'âge de six mois, une structuration du microbiote est observée (Jami et al., 2013). Cette instabilité du microbiote dans les premiers jours après la naissance peut générer des conditions écologiques favorables à la colonisation du tractus intestinal du veau par une souche pathogène d'*E. coli*.

Une des stratégies, employée par l'ensemble des mammifères, pour suppléer le faible système immunitaire du nouveau-né réside dans l'induction d'une immunité passive par l'ingestion de lait maternel, chargé en anticorps. Chez le veau nouveau-né, l'ingestion du colostrum maternel joue un rôle capital dans la protection contre les agents pathogènes du veau. Des modèles expérimentaux l'ont notamment montré dans la protection contre les NTEC2 (Van Bost et al., 2003, 2001b). Aussi, l'absence d'induction d'une immunité passive chez le veau constitue un autre facteur conditionnant la manifestation de diarrhées liées aux NTEC2.

En outre, le portage asymptomatique de souches de type NTEC2 chez des bovins adultes et des veaux plus âgés (Blanco et al., 1998a, 1998b; Burns et al., 1996) fait de ces animaux de potentiels réservoirs de ces souches. Les méthodes d'élevage actuelles impliquent le regroupement d'animaux d'âges variables dans des bâtiments pendant la saison des vêlages, avec une augmentation de la densité des animaux au fil des naissances. De par leurs caractéristiques, ces méthodes d'élevage facilitent la transmission de microorganismes entre animaux et pourraient constituer un facteur aggravant dans le risque de développement d'épidémies de diarrhées chez les veaux nouveau-nés. L'accroissement constaté, en général, du nombre de veaux atteints de diarrhées au fil d'une saison de vêlage (caractérisée par une augmentation de la densité d'animaux), suivi de la disparition de l'épidémie lorsque les animaux retournent aux prés (grands espaces, faible densité d'animaux), en constituent des indices potentiels. Néanmoins, les caractéristiques, au sein des élevages, de la dissémination et de la transmission entre animaux des souches d'*E. coli*, parmi lesquelles les souches de type NTEC2, ne sont pas aujourd'hui connues.

- Nécrotoxines et fimbriae F17 : des facteurs d'adaptation écologique ?

L'implication des facteurs de l'hôte et de son environnement dans l'expression de la virulence des souches de type NTEC2, démontrée précédemment, indique que ces souches sont des pathogènes "conditionnels". Responsables de l'apparition de diarrhées et de septicémies chez les veaux nouveau-nés, ces souches sont dans le même temps retrouvées de façon asymptomatique chez des veaux plus âgés ou des animaux adultes. Cette double caractéristique suggère que les facteurs exprimés de façon spécifique par les NTEC2 soient, en premier lieu, des facteurs d'adaptation à l'environnement constitué par le microbiote intestinal des ruminants. L'association à la virulence de ces facteurs serait, selon cette hypothèse, un phénomène secondaire.

Parmi ces facteurs exprimés par les NTEC2, il est possible que les nécrotoxines CNF2 et CDT-III puissent jouer un rôle dans sur le plan de l'adaptation bactérienne. Il est en effet possible que la toxicité qu'elles induisent sur des lignées de cellules eucaryotes en culture (Oswald et al., 1989; Pérès et al., 1997) puisse également être induite chez des protozoaires, et ainsi faire de ces nécrotoxines des facteurs impliqués dans la lutte contre ces organismes eucaryotes. Ces propriétés ont par exemple été identifiées chez les shiga-toxines des EHEC (Lainhart et al., 2009; Steinberg and Levin, 2007).

L'expression des fimbriae F17 pourrait aussi être impliquée dans des capacités d'adaptation à des niches écologiques particulières. Au cours de cette étude, ces fimbriae ont notamment été identifiés avec un taux de détection de presque 50% sur une collection d'ADN extraits de fèces de bovins adultes. Ce taux de détection relativement élevé pourrait traduire des propriétés d'adaptation des fimbriae F17 à des niches écologiques au sein du tractus digestif des ruminants, conférant ainsi une augmentation de la fitness des bactéries qui en produisent. Par ailleurs, chez les souches d'*E. coli* issues des veaux sains prélevés dans le premier mois après leur naissance puis à l'âge de 6 mois environ (chapitre 2, article 3), un maintien du taux de détection du variant F17e-A a été observé alors que, dans le même temps,

une diminution du taux de détection des fimbriae F17 en général a été observée. Cette dernière observation pourrait suggérer une association du variant F17e-A en particulier à des propriétés adaptatives.

D'autre part, le portage des gènes *cnf2*, *cdtIII* et *f17Ae* sur des plasmides Vir, appartenant exclusivement à deux familles plasmidiques distinctes, met en relief les fortes associations existant entre ces facteurs exprimés par les souches de type NTEC2. Ces fortes associations expriment une histoire évolutive commune de ces facteurs, qui pourraient découler de l'acquisition de propriétés sélectionnées par les bactéries porteuses des plasmides Vir.

### III. Perspectives

Le traitement des données et résultats obtenus pendant cette thèse soulèvent plusieurs points qui pourraient bénéficier d'améliorations.

- Développement d'outils moléculaires pour la détection des fimbriae F17

Les amorces communes développées pour la détection des fimbriae F17 (Bertin et al., 1996b) reconnaissent des régions très conservées au sein des séquences codantes de tous les variants de la piline, et permettent une détection fiable, rapide et à moindre coût des fimbriae F17. Néanmoins, l'identification du variant F17f-A a mis en avant les limites de la détection par PCR des variants des fimbriae F17 lorsque la variation est issue de recombinaisons homologues entre séquences codantes de variants déjà décrits. Une solution pour détecter l'ensemble de la variation des fimbriae F17 consisterait à effectuer du pyroséquençage 454 avec les amorces communes des fimbriae F17. Cette technique permet d'accéder à l'ensemble du polymorphisme exprimé pour un gène donné avec un débit élevé (Galan et al., 2010), ce qui n'est pas le cas avec les techniques de séquençage classiques, plus lourdes, et également plus onéreuses.

- Caractérisation des variants des fimbriae F17 et de leur lien avec la virulence

Le gène *f17Ae* a été détecté sur des plasmides IncF de type F57 chez des isolats iraniens, mais aucun autre gène associé à la virulence chez le veau n'a pu être identifié. Le séquençage de ces plasmides permettrait d'identifier de potentiels gènes de virulence et ainsi d'établir leur lien éventuel avec la virulence chez le veau. De la même manière, le séquençage des plasmides de type F74 et F75 identifiés au cours de cette thèse et appartenant à deux lignées distinctes, permettrait de vérifier la présence d'autres gènes de virulence qui ne seraient pas encore décrits et de clarifier leur lien avec la virulence des NTEC2.

L'identification des récepteurs spécifiques du variant F17-G3, ainsi que de ceux des variants F17-G1 et F17-G2, pourrait apporter des renseignements importants sur le lien qui pourrait exister entre l'expression des fimbriae F17 et l'adaptation à l'environnement

constitué par le tractus intestinal des bovins. La détermination des structures génétiques porteuses des gènes de *f17G3* et *f17Ae* pourrait également envisagée dans ce but.

- Etude de la transmission des souches de type NTEC2 de la mère au veau

Les bovins adultes et les veaux âgés de plus d'un mois constituent des réservoirs de souches d'*E. coli* de type NTEC2. Les méthodes d'élevage actuelles constituent *a priori* un facteur aggravant du déclenchement des diarrhées chez les veaux nouveau-nés en favorisant les contacts entre ces derniers et leurs réservoirs. Afin de clarifier le rôle de ce facteur, il pourrait être intéressant d'étudier la dissémination des souches NTEC2 au sein des élevages, en évaluant notamment la transmission de ces souches des mères à leurs veaux ou depuis les veaux plus âgés.



## Références bibliographiques

- Acres, S.D., 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *J. Dairy Sci.* 68, 229–256. doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)80814-6
- Anderson, D.G., Moseley, S.L., 1988. *Escherichia coli* F41 adhesin: genetic organization, nucleotide sequence, and homology with the K88 determinant. *J. Bacteriol.* 170, 4890–4896.
- Azpiroz, M.F., Bascuas, T., Laviña, M., 2011. Microcin H47 system: an *Escherichia coli* small genomic island with novel features. *PloS One* 6, e26179. doi:10.1371/journal.pone.0026179
- Bakker, D., Vader, C.E., Roosendaal, B., Mooi, F.R., Oudega, B., de Graaf, F.K., 1991. Structure and function of periplasmic chaperone-like proteins involved in the biosynthesis of K88 and K99 fimbriae in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 875–886.
- Bean, A., Williamson, J., Cursons, R.T., 2004. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 51, 285–287. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00772.x
- Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F., Sanaa, M., 1999. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet. Res.* 30, 61–74.
- Berg, R.D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4, 430–435.
- Bertels, A., Pohl, P., Schlicker, C., Charlier, G., Lintermans, P., van Driessche, E., De Greve, H., 1989. Isolation of the F111 fimbrial antigen on the surface of a bovine *Escherichia coli* strain isolated out of calf diarrhea: characterization and discussion of the need to adapt recent vaccines against neonatal calf diarrhea. *Vlaams Diergeneeskd. Tijdschr.* 58, 118–122.
- Bertin, Y., Girardeau, J.P., Darfeuille-Michaud, A., Contrepolis, M., 1996a. Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infect. Immun.* 64, 332–342.
- Bertin, Y., Girardeau, J.P., Der Vartanian, M., Martin, C., 1993. The ClpE protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of a periplasmic chaperone family in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 108, 59–67.
- Bertin, Y., Martin, C., Oswald, E., Girardeau, J.P., 1996b. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2921–2928.
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J.A., Christie, P.J., 2013. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res. Microbiol.* 164, 620–639. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.012
- Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tschape, H., Schmidt, M.A., Karch, H., 2004. Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Non-O157 Serogroups. *Infect. Immun.* 72, 1812–1816. doi:10.1128/IAI.72.3.1812-1816.2004

- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Blanco, J., 1998a. Distribution and characterization of faecal necrotoxicogenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ isolated from healthy cows and calves. *Vet. Microbiol.* 59, 183–192.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Blanco, J., 1998b. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ in healthy cattle. *Res. Microbiol.* 149, 47–53.
- Boerlin, P., 2010. Evolution of Bacterial Virulence, in: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 33–49.
- Braaten, B.A., Myers, L.L., 1977. Biochemical characteristics of enterotoxigenic and nonenterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1989–1991.
- Bronfenbrenner, J., 1932. The Heat Inactivation of Bacteriophages. *Exp. Biol. Med.* 29, 802–804. doi:10.3181/00379727-29-6087
- Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W.-D., 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 68, 560–602, table of contents. doi:10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004
- Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A., Newsome, P.M., 1978. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21, 526–531.
- Bürk, C., Dietrich, R., Açar, G., Moravek, M., Bülte, M., Märtlbauer, E., 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2106–2112.
- Burns, A.L., Ball, H.J., Finlay, D.A., 1996. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 49, 235–241.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L., 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521–564. doi:10.1051/vetres:2003023
- Buts, L., Bouckaert, J., De Genst, E., Loris, R., Oscarson, S., Lahmann, M., Messens, J., Brosens, E., Wyns, L., De Greve, H., 2003. The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic *Escherichia coli* has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N-acetylglucosamine. *Mol. Microbiol.* 49, 705–715.
- Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L.G., Ruggeri, F.M., Zona, C., 1983. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* 39, 1300–1306.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289–311. doi:10.1051/vetres:2005002
- China, B., Pirson, V., Mainil, J., 1998. Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. *Vet. Microbiol.* 63, 249–259.

- Cho, Y.-I., Yoon, K.-J., 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15, 1–17.
- Cid, D., Sanz, R., Marín, I., de Greve, H., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Amils, R., de la Fuente, R., 1999. Characterization of nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains producing F17 fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1370–1375.
- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., Frankel, G., 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3, 71–87. doi:10.4161/gmic.19182
- Cohan, F.M., Koeppel, A.F., 2008. The Origins of Ecological Diversity in Prokaryotes. *Curr. Biol.* 18, R1024–R1034. doi:10.1016/j.cub.2008.09.014
- Contrepolis, M., 1996. Vaccination contre les colibacilles entérotoxigènes du veau. *Rencontres Rech. Rumin.* 131–138.
- Contrepolis, M., Girardeau, J.P., 1985. Additive protective effects of colostral antipili antibodies in calves experimentally infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 50, 947–949.
- Cope, L.D., Lumbley, S., Latimer, J.L., Klesney-Tait, J., Stevens, M.K., Johnson, L.S., Purven, M., Munson, R.S., Lagergard, T., Radolf, J.D., Hansen, E.J., 1997. A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4056–4061.
- Coulthurst, S.J., 2013. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* 164, 640–654. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.017
- Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R.J., 1961. General Nature of the Genetic Code for Proteins. *Nature* 192, 1227–1232. doi:10.1038/1921227a0
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38. doi:10.1038/nrmicro2265
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 74, 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- Dean-Nystrom, E.A., Bosworth, B.T., Moon, H.W., O'Brien, A.D., 1998. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect. Immun.* 66, 4560–4563.
- Dean, P., Kenny, B., 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 101–109. doi:10.1016/j.mib.2008.11.006
- DebRoy, C., Maddox, C.W., 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim. Health Res. Rev. Conf. Res. Work. Anim. Dis.* 2, 129–140.
- de Graaf, F.K., Krenn, B.E., Klaasen, P., 1984. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. *Infect. Immun.* 43, 508–514.
- de Graaf, F.K., Roorda, I., 1982. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect. Immun.* 36, 751–758.
- de Pace, F., Boldrin de Paiva, J., Nakazato, G., Lancellotti, M., Sircili, M.P., Guedes Stehling, E., Dias da Silveira, W., Sperandio, V., 2011. Characterization of IcmF of the type VI

- secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiol. Read. Engl.* 157, 2954–2962. doi:10.1099/mic.0.050005-0
- De Rycke, J., González, E.A., Blanco, J., Oswald, E., Blanco, M., Boivin, R., 1990. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 694–699.
- De Rycke, J., Milon, A., Oswald, E., 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.* 30, 221–233.
- De Rycke, J., Oswald, E., 2001. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 141–148. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10832.x
- Dho-Moulin, M., Fairbrother, J.M., 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30, 299–316.
- Dorn, C.R., Francis, D.H., Angrick, E.J., Willgohs, J.A., Wilson, R.A., Collins, J.E., Jenke, B.H., Shawd, S.J., 1993. Characteristics of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* associated with intestinal colonization and diarrhea in calves. *Vet. Microbiol.* 36, 149–159.
- Dreyfus, L.A., Frantz, J.C., Robertson, D.C., 1983. Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. *Infect. Immun.* 42, 539–548.
- Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempster, G., Edmunds, P.N., 1955. Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* 70, 335–348.
- Eberhart, R.J., 1977. Coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170, 1160–1163.
- el Mazouari, K., Oswald, E., Hernalsteens, J.P., Lintermans, P., De Greve, H., 1994. F17-like fimbriae from an invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect. Immun.* 62, 2633–2638.
- Escherich, T., 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschr. Med.* 3, 515–522.
- Fecteau, G., Smith, B.P., George, L.W., 2009. Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25, 195–208, vii–viii. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.004
- Fidock, D.A., McNicholas, P.A., Lehrbach, P.R., 1989. Nucleotide sequence of the F41 fimbriae subunit gene in *Escherichia coli* B41. *Nucleic Acids Res.* 17, 2849.
- Foster, D.M., Smith, G.W., 2009. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25, 13–36. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.013
- Frankel, G., Candy, D.C., Fabiani, E., Adu-Bobie, J., Gil, S., Novakova, M., Phillips, A.D., Dougan, G., 1995. Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63, 4323–4328.
- Frankel, G., Lider, O., Hershkoviz, R., Mould, A.P., Kachalsky, S.G., Candy, D.C., Cahalon, L., Humphries, M.J., Dougan, G., 1996. The cell-binding domain of intimin from

- enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J. Biol. Chem.* 271, 20359–20364.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Thelestam, M., 2002. Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 291, 495–499.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732. doi:10.1038/nrmicro1235
- Galan, M., Guivier, E., Caraux, G., Charbonnel, N., Cosson, J.-F., 2010. A 454 multiplex sequencing method for rapid and reliable genotyping of highly polymorphic genes in large-scale studies. *BMC Genomics* 11, 296. doi:10.1186/1471-2164-11-296
- Gal-Mor, O., Finlay, B.B., 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8, 1707–1719. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x
- Gérardin, J., Lalioui, L., Jacquemin, E., Le Bouguéneq, C., Mainil, J.G., 2000. The afa-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the afa-8 variant. *Vet. Microbiol.* 76, 175–184.
- Giannella, R.A., Mann, E.A., 2003. *E. coli* heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 114, 67–85; discussion 85–86.
- Girardeau, J.P., Bertin, Y., 1995. Pilins of fimbrial adhesins of different member species of Enterobacteriaceae are structurally similar to the C-terminal half of adhesin proteins. *FEBS Lett.* 357, 103–108.
- Girardeau, J.P., Bertin, Y., Martin, C., Der Vartanian, M., Boeuf, C., 1991. Sequence analysis of the *clpG* gene, which codes for surface antigen CS31A subunit: evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88, and F41 subunit genes. *J. Bacteriol.* 173, 7673–7683.
- Girardeau, J.P., Der Vartanian, M., Ollier, J.L., Contrepois, M., 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 56, 2180–2188.
- Girardeau, J.P., Dubourguier, H.C., Contrepois, M., 1979. Attachement des *Escherichia coli* entéropathogènes à la muqueuse intestinale. *Gastro-Entérites Néonatales Veau* 53–66.
- Girardeau, J.P., Lalioui, L., Said, A.M.O., De Champs, C., Le Bouguéneq, C., 2003. Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the afa-8 operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* 41, 218–226.
- Gogarten, J.P., Doolittle, W.F., Lawrence, J.G., 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2226–2238.
- Gordon, D.M., Cowling, A., 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 3575–3586.
- Guerra, L., Cortes-Bratti, X., Guidi, R., Frisan, T., 2011. The Biology of the Cytolethal Distending Toxins. *Toxins* 3, 172–190. doi:10.3390/toxins3030172

- Gyles, C., Boerlin, P., 2014. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Vet. Pathol.* 51, 328–340. doi:10.1177/0300985813511131
- Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* 85, E45–E62. doi:10.2527/jas.2006-508
- Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2010. *Escherichia coli*, in: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 267–308.
- Hendrickson, H., 2009. Order and Disorder during *Escherichia coli* Divergence. *PLoS Genet.* 5, e1000335. doi:10.1371/journal.pgen.1000335
- Hoey, D.E.E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C.A., Gally, D.L., Smith, D.G.E., 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cell. Microbiol.* 5, 85–97.
- Holland, R.E., 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 345–375.
- Horiguchi, Y., 2001. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors and *Bordetella dermonecrotic* toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 39, 1619–1627.
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., Mizrahi, I., 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* 7, 1069–1079. doi:10.1038/ismej.2013.2
- Jerse, A.E., Kaper, J.B., 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* 59, 4302–4309.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Håvarstein, L.S., 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res. Microbiol.* 158, 767–778. doi:10.1016/j.resmic.2007.09.004
- Johnson, T.J., DebRoy, C., Belton, S., Williams, M.L., Lawrence, M., Nolan, L.K., Thorsness, J.L., 2010a. Pyrosequencing of the *Vir* plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 144, 100–109. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.022
- Johnson, T.J., DebRoy, C., Belton, S., Williams, M.L., Lawrence, M., Nolan, L.K., Thorsness, J.L., 2010b. Pyrosequencing of the *Vir* plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 144, 100–109. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.022
- Johnson, T.J., Nolan, L.K., 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 750–774. doi:10.1128/MMBR.00015-09
- Jokinen, M., Ehnholm, C., Väisänen-Rhen, V., Korhonen, T., Pipkorn, R., Kalkkinen, N., Gahmberg, C.G., 1985. Identification of the major human sialoglycoprotein from red cells, glycophorin AM, as the receptor for *Escherichia coli* IH 11165 and characterization of the receptor site. *Eur. J. Biochem. FEBS* 147, 47–52.
- Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., Crook, D.W., 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 376–393. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x

- Kang, S.J., Ryu, S.J., Chae, J.S., Eo, S.K., Woo, G.J., Lee, J.H., 2004. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 98, 323–328. doi:10.1016/j.vetmic.2003.11.004
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140. doi:10.1038/nrmicro818
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M., Schierack, P., 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 23. doi:10.3389/fcimb.2015.00023
- Lacher, D.W., Steinsland, H., Whittam, T.S., 2006. Allelic subtyping of the intimin locus (*eae*) of pathogenic *Escherichia coli* by fluorescent RFLP. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 80–87. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00328.x
- Lainhart, W., Stolfa, G., Koudelka, G.B., 2009. Shiga toxin as a bacterial defense against a eukaryotic predator, *Tetrahymena thermophila*. *J. Bacteriol.* 191, 5116–5122. doi:10.1128/JB.00508-09
- Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J.M., Frankel, G., 2013. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 15, 1796–1808. doi:10.1111/cmi.12179
- Lalioui, L., Jouve, M., Gounon, P., Le Bouguenec, C., 1999. Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect. Immun.* 67, 5048–5059.
- Lalioui, L., Le Bouguénec, C., 2001. *afa-8* Gene cluster is carried by a pathogenicity island inserted into the tRNA(Phe) of human and bovine pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* 69, 937–948. doi:10.1128/IAI.69.2.937-948.2001
- Lam, T.J., Lipman, L.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W., Brand, A., 1996. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 57, 39–42.
- Lara-Tejero, M., Galán, J.E., 2001. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.* 69, 4358–4365. doi:10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001
- Lawrence, J.G., Ochman, H., 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9413–9417.
- Le Bouguénec, C., Bertin, Y., 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.* 30, 317–342.
- Lee, J.H., Hur, J., Stein, B.D., 2008. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea. *Vet. J. Lond. Engl.* 197, 205–209. doi:10.1016/j.tvjl.2007.02.007
- Lehman, I.R., Bessman, M.J., Simms, E.S., Kornberg, A., 1958. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 233, 163–170.

- Leimbach, A., Hacker, J., Dobrindt, U., 2013. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 3–32. doi:10.1007/82\_2012\_303
- Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S., Karmali, M., 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* 262, 8834–8839.
- Lintermans, P.F., Bertels, A., Schlicker, C., Deboeck, F., Charlier, G., Pohl, P., Norgren, M., Normark, S., van Montagu, M., De Greve, H., 1991. Identification, characterization, and nucleotide sequence of the F17-G gene, which determines receptor binding of *Escherichia coli* F17 fimbriae. *J. Bacteriol.* 173, 3366–3373.
- Lintermans, P.F., Pohl, P., Bertels, A., Charlier, G., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Schoup, J., Schlicker, C., Korhonen, T., De Greve, H., 1988a. Characterization and purification of the F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1794–1799.
- Lintermans, P.F., Pohl, P., Deboeck, F., Bertels, A., Schlicker, C., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van Montagu, M., De Greve, H., 1988b. Isolation and nucleotide sequence of the F17-A gene encoding the structural protein of the F17 fimbriae in bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56, 1475–1484.
- Lipman, L.J., de Nijs, A., Gaastra, W., 1995. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 47, 1–7.
- Lopez-Alvarez, J., Gyles, C.L., 1980. Occurrence of the vir plasmid among animal and human strains of invasive *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 41, 769–774.
- Lopez-Alvarez, J., Gyles, C.L., Shipley, P.L., Falkow, S., 1980. Genetic and molecular characteristics of Vir plasmids of bovine septicemic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 141, 758–769.
- Mahillon, J., Chandler, M., 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 62, 725–774.
- Mainil, J., 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 2–12. doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.032
- Mainil, J., 2003. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : I) les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann. Médecine Vét.* 105–126.
- Mainil, J., 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.* 30, 235–257.
- Mainil, J.G., Bex, F., Dreze, P., Kaeckenbeeck, A., Couturier, M., 1992. Replicon typing of virulence plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from cattle. *Infect. Immun.* 60, 3376–3380.
- Mainil, J.G., Daube, G., 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol.* 98, 1332–1344. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02653.x

- Mainil, J.G., Gérardin, J., Jacquemin, E., 2000. Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (f17A and f17G) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet. Microbiol.* 73, 327–335.
- Mainil, J.G., Jacquemin, E., Hérault, F., Oswald, E., 1997. Presence of pap-, sfa-, and afa-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Vét.* 61, 193–199.
- Mainil, J.G., Jacquemin, E., Oswald, E., 2003. Prevalence and identity of cdt-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 94, 159–165.
- Mainil, J.G., Jacquemin, E., Pohl, P., Fairbrother, J.M., Ansuini, A., Le Bouguéneq, C., Ball, H.J., De Rycke, J., Oswald, E., 1999. Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Vet. Microbiol.* 70, 123–135.
- Martin, C., 1996. The clp (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Mol. Microbiol.* 21, 281–292.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1664–1668.
- Millemann, Y., 2009. Diagnosis of neonatal calf diarrhoea. *Rev. Médecine Vét.* 160, 404–409.
- Moon, H.W., Bunn, T.O., 1993. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11, 213–200.
- Morris, J.A., Thorns, C.J., Scott, A.C., Sojka, W.J., 1982. Adhesive properties associated with the Vir plasmid: a transmissible pathogenic characteristic associated with strains of invasive *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2097–2103.
- Moxley, R.A., Francis, D.H., 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect. Immun.* 53, 339–346.
- Nagy, B., Fekete, P.Z., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 295, 443–454. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.003
- Nagy, B., Fekete, P.Z., 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30, 259–284.
- Nair, G.B., Takeda, Y., 1998. The heat-stable enterotoxins. *Microb. Pathog.* 24, 123–131.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Neish, A.S., 2009. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology* 136, 65–80. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.080
- Nemeth, J., Muckle, C.A., Gyles, C.L., 1994. In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet. Microbiol.* 40, 231–238.
- Nesić, D., Hsu, Y., Stebbins, C.E., 2004. Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature* 429, 429–433. doi:10.1038/nature02532
- Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Kato, M., Tsuji, T., 2009. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 16, 299–309. doi:10.1093/dnares/dsp015

- Ochman, H., Davalos, L.M., 2006. The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science* 311, 1730–1733. doi:10.1126/science.1119966
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304. doi:10.1038/35012500
- Okuda, J., Kurazono, H., Takeda, Y., 1995. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb. Pathog.* 18, 167–172.
- Orden, J.A., Domínguez-Bernal, G., Martínez-Pulgarín, S., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Blanco, J., Blanco, J., de la Fuente, R., 2007. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 10, 47–55.
- Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., García, S., de la Fuente, R., 1999. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Vet. Microbiol.* 66, 265–273.
- Orskov, I., Orskov, F., 1990. Serologic classification of fimbriae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 151, 71–90.
- Oswald, E., De Rycke, J., 1990. A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the *Vir* plasmid of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 279–284.
- Oswald, E., De Rycke, J., Guillot, J.F., Boivin, R., 1989. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of *Vir* plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 95–99.
- Oswald, E., de Rycke, J., Lintermans, P., van Muylem, K., Mainil, J., Daube, G., Pohl, P., 1991. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2522–2527.
- Oswald, E., Sugai, M., Labigne, A., Wu, H.C., Fiorentini, C., Boquet, P., O'Brien, A.D., 1994. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3814–3818.
- Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.P., Herault, F., Tasca, C., De Rycke, J., Oswald, E., 1997. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* 24, 1095–1107.
- Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russell, G., Erdem, A.N., Zeytin, H., 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect. Immun.* 64, 2070–2078.
- Pickett, C.L., Whitehouse, C.A., 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* 7, 292–297.
- Pruimboom-Brees, I.M., Morgan, T.W., Ackermann, M.R., Nystrom, E.D., Samuel, J.E., Cornick, N.A., Moon, H.W., 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli*

- O157:H7 Shiga toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10325–10329. doi:10.1073/pnas.190329997
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K., Whittam, T.S., 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406, 64–67. doi:10.1038/35017546
- Reynolds, D.J., Morgan, J.H., Chanter, N., Jones, P.W., Bridger, J.C., Debney, T.G., Bunch, K.J., 1986. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.* 119, 34–39.
- Rhen, M., Klemm, P., Korhonen, T.K., 1986. Identification of two new hemagglutinins of *Escherichia coli*, N-acetyl-D-glucosamine-specific fimbriae and a blood group M-specific agglutinin, by cloning the corresponding genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 168, 1234–1242.
- Rietra, P.J., Willshaw, G.A., Smith, H.R., Field, A.M., Scotland, S.M., Rowe, B., 1989. Comparison of Vero-cytotoxin-encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2307–2318. doi:10.1099/00221287-135-8-2307
- Roosendaal, B., de Graaf, F.K., 1989. The nucleotide sequence of the fanD gene encoding the large outer membrane protein involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. *Nucleic Acids Res.* 17, 1263.
- Roosendaal, B., Gaastra, W., Graaf, F.K., 1984. The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22, 253–258. doi:10.1111/j.1574-6968.1984.tb00737.x
- Roosendaal, E., Boots, M., de Graaf, F.K., 1987. Two novel genes, fanA and fanB, involved in the biogenesis of K99 fimbriae. *Nucleic Acids Res.* 15, 5973–5984.
- Russo, T.A., Johnson, J.R., 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753–1754. doi:10.1086/315418
- Saarela, S., Taira, S., Nurmiäho-Lassila, E.L., Makkonen, A., Rhen, M., 1995. The *Escherichia coli* G-fimbrial lectin protein participates both in fimbrial biogenesis and in recognition of the receptor N-acetyl-D-glucosamine. *J. Bacteriol.* 177, 1477–1484.
- Savageau, M.A., 1983. *Escherichia coli* Habitats, Cell Types, and Molecular Mechanisms of Gene Control. *Am. Nat.* 122, 732. doi:10.1086/284168
- Schelcher, F., 2008. Les diarrhées du veau nouveau-né, in: *Maladies des bovins*. Éd. France agricole, Paris, pp. 182–193.
- Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S.T., Garbers, D.L., 1990. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63, 941–948. doi:10.1016/0092-8674(90)90497-3
- Sellers, Z.M., Mann, E., Smith, A., Ko, K.H., Giannella, R., Cohen, M.B., Barrett, K.E., Dong, H., 2008. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) can stimulate duodenal HCO<sub>3</sub>(-) secretion via a novel GC-C- and CFTR-independent pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 1306–1316. doi:10.1096/fj.06-7540com
- Sengupta, M., Austin, S., 2011. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* 79, 2502–2509. doi:10.1128/IAI.00127-11

- Shulman, S.T., Friedmann, H.C., Sims, R.H., 2007. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin. Infect. Dis.* 45, 1025–1029. doi:10.1086/521946
- Simons, B.L., Willemsen, P.T., Bakker, D., Roosendaal, B., De Graaf, F.K., Oudega, B., 1990. Structure, localization and function of FanF, a minor component of K99 fibrillae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4, 2041–2050.
- Simons, L.H., Willemsen, P.T., Bakker, D., de Graaf, F.K., Oudega, B., 1991. Localization and function of FanH and FanG, minor components of K99 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 11, 325–336.
- Sinclair, J.F., O'Brien, A.D., 2004. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 33751–33758. doi:10.1074/jbc.M401616200
- Smith, H.W., 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J. Gen. Microbiol.* 83, 95–111.
- Snodgrass, D.R., Terzolo, H.R., Sherwood, D., Campbell, I., Menzies, J.D., Synge, B.A., 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.* 119, 31–34.
- So, M., McCarthy, B.J., 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 4011–4015.
- Steinberg, K.M., Levin, B.R., 2007. Grazing protozoa and the evolution of the *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding prophage. *Proc. Biol. Sci.* 274, 1921–1929. doi:10.1098/rspb.2007.0245
- Stevens, A., 1960. Incorporation of the adenine ribonucleotide into RNA by cell fractions from *E. coli* B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 92–96. doi:10.1016/0006-291X(60)90110-8
- Stordeur, P., China, B., Charlier, G., Roels, S., Mainil, J., 2000. Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2, 17–24.
- Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., O'Brien, A.D., 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* 53, 135–140.
- Sugai, M., Hatazaki, K., Mogami, A., Ohta, H., Pérès, S.Y., Hérault, F., Horiguchi, Y., Masuda, M., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Suginaka, H., Oswald, E., 1999. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by pathogenic *Escherichia coli* deamidates a gln residue in the conserved G-3 domain of the rho family and preferentially inhibits the GTPase activity of RhoA and rac1. *Infect. Immun.* 67, 6550–6557.
- Suojala, L., Pohjanvirta, T., Simojoki, H., Myllyniemi, A.-L., Pitkälä, A., Pelkonen, S., Pyörälä, S., 2011. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of

- Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 147, 383–388. doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.011
- Takao, T., Tanabe, T., Hong, Y.M., Shimonishi, Y., Kurazono, H., Yutsudo, T., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Takeda, Y., 1988. Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin. *Microb. Pathog.* 5, 57–69.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 207–217. doi:10.1038/nrmicro2298
- Teneberg, S., Willemsen, P.T., de Graaf, F.K., Karlsson, K.A., 1993. Calf small intestine receptors for K99 fimbriated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 109, 107–112.
- Tesh, V.L., O'Brien, A.D., 1991. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol. Microbiol.* 5, 1817–1822.
- Tóth, I., Hérault, F., Beutin, L., Oswald, E., 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41, 4285–4291.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M.E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J., Le Bouguéneq, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C.S., Schneider, D., Turret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Médigue, C., Rocha, E.P.C., Denamur, E., 2009. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genet.* 5, e1000344. doi:10.1371/journal.pgen.1000344
- Turner, S.M., Scott-Tucker, A., Cooper, L.M., Henderson, I.R., 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 10–20. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00401.x
- USDA, 2010. Heifer Calf Health and Management Practices on U.S. Dairy Operations. NAHMS Dairy 2007.
- Vaandrager, A.B., 2002. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. *Mol. Cell. Biochem.* 230, 73–83.
- Van Bost, S., Bâbe, M.H., Jacquemin, E., Mainil, J., 2001a. Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Vet. Microbiol.* 82, 311–320.
- Van Bost, S., Mainil, J., 2003. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : III) Production de toxines. *Ann. Médecine Vét.* 327–342.
- Van Bost, S., Mainil, J., 1999. Reproduction of lesions and clinical signs with a CNF2-producing *Escherichia coli* in neonatal calves. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473, 125–128.

- Van Bost, S., Roels, S., Mainil, J., 2001b. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.* 81, 315–329.
- Van Bost, S., Roels, S., Oswald, E., Mainil, J., 2003. Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 5, 1189–1193.
- van der Woude, M.W., Braster, M., van Verseveld, H.W., de Graaf, F.K., 1990. Control of temperature-dependent synthesis of K99 fimbriae. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 183–188.
- van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R., Trevors, J.T., 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J.* 5, 173–183. doi:10.1038/ismej.2010.80
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzon, D., Lombard, C., Rebuffat, S., Peduzzi, J., 2010. Isolation and Characterization of Two Members of the Siderophore-Microcin Family, Microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 288–297. doi:10.1128/AAC.00744-09
- Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 127–181. doi:10.1016/j.femsre.2003.08.001
- Wenz, J.R., Barrington, G.M., Garry, F.B., Ellis, R.P., Magnuson, R.J., 2006. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J. Dairy Sci.* 89, 3408–3412. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72377-3
- Werkman, C.H., 1927. Vitamin effects in the physiology of microorganisms. *J. Bacteriol.* 14, 335–347.
- Wick, L.M., Qi, W., Lacher, D.W., Whittam, T.S., 2005. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 187, 1783–1791. doi:10.1128/JB.187.5.1783-1791.2005
- Wiedenbeck, J., Cohan, F.M., 2011. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 957–976. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x
- Wieler, L.H., Sobjinski, G., Schlapp, T., Failing, K., Weiss, R., Menge, C., Baljer, G., 2007. Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 120, 296–306.
- Wray, C., McLaren, I., Pearson, G.R., 1989. Occurrence of “attaching and effacing” lesions in the small intestine of calves experimentally infected with bovine isolates of verocytotoxic *E. coli*. *Vet. Rec.* 125, 365–368.
- Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y.H., 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 357–372. doi:10.1007/s10911-011-9236-y
- Ziebuhr, W., Ohlsen, K., Karch, H., Korhonen, T., Hacker, J., 1999. Evolution of bacterial pathogenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 56, 719–728.