



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Microbiologie*

Présentée et soutenue par

Alpha Amadou DIALLO

Le 06 Décembre 2013

Titre :

Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents
d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après
traitement épuratoire

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*

Unité de recherche : *UMR INSERM 1043 CPTP Centre de Physiopathologie Toulouse
Purpan/Equipe 11-USC INRA 1360-INP-ENVT*

Directeur de Thèse : *Dr. Hubert BRUGERE, INP-ENV de Toulouse*

JURY

Pr. Christine ROQUES, Université Paul Sabatier Toulouse (Président du Jury)

Dr. Delphine THEVENOT SERGENTET, VetAgro Sup Lyon (Rapporteur)

Dr. Jean-Yves MADEC, ANSES Lyon (Rapporteur)

Dr. Evelyne FORANO, INRA Clermont-Ferrand (Examineur)

Dr. Delphine BIBBAL, INP-ENV de Toulouse (Examineur)

Dr. Hubert BRUGERE, INP-ENV de Toulouse (Examineur)

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement,

Dr. Hubert BRUGERE,

Pour ton amitié et ton soutien, j'admire beaucoup ta grande humanité et ta sympathie. C'est grâce à toi que j'ai eu l'opportunité de débiter cette thèse et je t'en suis très reconnaissant.

Dr. Yaya THIONGANE,

Pour m'avoir recruté comme Ingénieur d'Etudes au LNERV et m'avoir offert la possibilité de faire la thèse. Cela est toujours un plaisir de travailler dans ton équipe et sous ta direction. Trouve ici toute ma gratitude et mon respect sincère.

Dr. Delphine BIBBAL,

Merci pour toutes ces heures passées au bureau à discuter des résultats et des manipulations à suivre. Toujours des bonnes idées. La qualité de la publication est grâce à toi.

Pr. Eric OSWALD,

J'apprécie beaucoup ta façon de gérer l'équipe, ceci nous permet de travailler dans un environnement très agréable, mais qui reste en même temps exigeant et perfectionniste. Merci de m'avoir donné la possibilité de travailler avec ton groupe et toi.

Pr. Rianatou BADA ALAMBEDJI,

Pour les diverses collaborations et les nombreux échanges qui ont fait avancer mes projets et mes idées.

Monique KEROUREDAN,

Merci de me guider au sein du labo, cela a été un plaisir de travailler avec toi, au-delà de mes espérances en arrivant au fond du couloir et sans toi ce travail n'aurait pas été possible

L'ensemble de l'équipe,

Ce fût très agréable de travailler avec vous tous ; des moments que je garderai précieusement dans mes souvenirs.

Mbène DIAKHOUMPA, mon épouse, pour sa compréhension et son soutien ces dernières années, pour avoir accepté les nombreuses absences,
Reçois ma profonde gratitude,

Aux membres du jury,

Je vous remercie d'avoir cordialement accepté de juger mes travaux de thèse.

A ma famille

Et A tous ceux qui me sont chers

TABLE DES MATIERES

PARTIE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
Chapitre 1 : GENERALITES SUR LES ESCHERICHIA COLI	13
I.1. Taxonomie et définition	13
I.2. Antigènes et sérotypage	13
I.2.1. Les antigènes somatiques O	14
I.2.2. Les antigènes flagellaires H	14
I.2.3. Les antigènes de surface K.....	15
I.3. Plasticité génotypique et clonalité de l'espèce <i>E. coli</i>	15
Chapitre 2 : LES SOUCHES DE <i>E. COLI</i> PATHOGENES	17
II.1. Commensalité et pathogénicité	17
II.2. Les pathogènes intestinaux	18
II.2.1. Les <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	18
II.2.2. Les <i>Escherichia coli</i> entéroinvasives (EIEC)	19
II.2.3. Les <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (DAEC)	19
II.2.4. Les <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatives (EaggEC, ou EAEC)	19
II.2.5. Les <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes (EPEC)	20
II.2.6. Les <i>Escherichia coli</i> enterohémorragiques (EHEC)	22
II.2.7. Les « Shiga-toxin producing enteroaggregatives <i>E. coli</i> » (STEAEC)	40
II.3. Les <i>E. coli</i> pathogènes extraintestinaux (ExPEC)	41
II.3.1. Les facteurs de virulence des ExPEC.....	42
II.3.2. Un réservoir animal d'ExPEC.....	52
II.3.3. Les voies de transmission possibles des ExPEC vers l'homme	57
Chapitre 3 : LA RESISTANCE BACTERIENNE	59
III.1. Résistance naturelle	59
III.2. Résistance acquise	59
III.3. Supports génétiques de la résistance	60
III.4. Mécanismes de la résistance	63
III.5. Le cas des βlactamines	68
III.5.1. Modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP).....	68
III.5.2. Systèmes d'efflux actif	68
III.5.3. Production de β -lactamases.....	68
III.5.4. Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).....	69
III.5.5. Classification des β -lactamases.....	70
III.5.6. Classification phylogénétique des BLSE	71
III.5.7. Les animaux réservoirs de BLSE.....	74
III.5.7.1. Les enzymes CTX-M.....	74
III.5.7.2. SHV-12	76
III.5.7.3. TEM-52.....	76
III.5.8. Distribution géographique des BLSE	76
Chapitre 4 : LES EAUX USEES ET LEUR EPURATION	79
IV.1.1. Les effluents d'abattoirs.....	79
IV.1.2. Les effluents domestiques.....	80

TABLE DES MATIERES

IV.1.3.	Les effluents hospitaliers	80
IV.1.4.	Les eaux pluviales.....	81
IV.2.	Propriétés physico-chimiques des effluents.....	81
IV.3.	Epuration des eaux usées	83
IV.3.2.	Traitement primaire	84
IV.3.3.	Les traitements secondaires	85
IV.3.4.	Traitement et valorisation des boues.....	86
PARTIE II. ETUDE EXPERIMENTALE.....		87
Chapitre 5 : OBJECTIFS DU PROJET DE THESE.....		88
Chapitre 6 . MATERIEL ET METHODES		90
VI.1.	Réalisation des prélèvements d'effluent	90
VI.1.1.	En France	90
VI.1.2.	Au Sénégal.....	91
VI.2.	Traitement des prélèvements.....	93
VI.3.	Dénombrement des entérobactéries et des <i>E. coli</i>	93
VI.4.	Isolement des <i>E. coli</i> et constitution d'une banque d'isolats	94
VI.5.	Recherche des 5 principaux sérogroupes des EHEC par Immunoséparation magnétique (IMS).....	94
VI.6.	Caractérisation génétique des souches <i>E. coli</i>.....	96
VI.6.1.	Description des étapes de criblage	96
VI.6.2.	Extraction de l'ADN	97
VI.6.3.	Criblage des facteurs de virulence des EHEC.....	97
VI.6.4.	Recherche des facteurs de virulence des <i>E. coli</i> entéroagrégatives (EAEC).....	98
VI.6.5.	Criblage des facteurs de virulence des ExPEC	99
VI.6.6.	Etude des souches productrices de BLSE	102
VI.7.	Caractérisation des souches <i>E. coli</i> porteuses des gènes de virulence et/ou productrices de BLSE	103
VI.7.1.	Sous-typage des gènes <i>stx</i>	103
VI.7.1.	Recherche des variants du gène <i>eae</i>	104
VI.7.2.	Identification des souches EPEC	105
VI.7.3.	Classification phylogénétique	105
VI.7.4.	Etude de l'antibiorésistance des souches d'intérêt	105
Chapitre 7 : PRESENTATION DES RESULTATS		109
VII.1.	Résultats obtenus en France	109
VII.1.1.	Dénombrement des entérobactéries et <i>E. coli</i>	109
VII.1.2.	Présence des facteurs de virulence associés aux EHEC	110
VII.1.3.	Présence des souches EAEC	118
VII.1.4.	Etude des souches ExPEC	119
VII.1.4.1.	Association des gènes de virulence	119
VII.1.4.2.	Caractérisation des souches porteuses de gènes associés aux ExPEC	121
VII.1.5.	Prévalence des <i>E. coli</i> productrices de BLSE	125

TABLE DES MATIERES

VII.2. Résultats de recherche des <i>E. coli</i> pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques dans les effluents des abattoirs et de la station d'épuration urbaine de Dakar.	127
VII.2.1. Dénombrement des entérobactéries et <i>E. coli</i>	127
VII.2.2. Prévalence des gènes de virulence associés aux EHEC	127
VII.2.3. Prévalence des gènes de virulence associés aux ExPEC.....	128
VII.2.4. La résistance aux antibiotiques	129
VII.3. Valorisation des résultats.....	131
VII.3.1. Publication	131
VII.3.2. Poster N° 1	143
VII.3.3. Porter N°2	145
<i>Chapitre 8 : DISCUSSION</i>	147
<i>Chapitre 9 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>.....	160
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>.....	163
<i>ANNEXES</i>.....	192
<i>RESUME</i>	203
<i>SUMMARY</i>.....	204

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1.1. Diversité phylogénétique des souches de <i>Escherichia coli</i>	16
Figure 2.1. Sites de colonisation des <i>Escherichia coli</i> pathogènes.....	18
Figure 2.2. Mécanisme de pathogénicité des <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC)	23
Figure 2.3. Représentation schématique des souches AEEC, EHEC et STEC.....	24
Figure 2.4. Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal	33
Figure 2.5. Principaux facteurs de virulence impliqués dans le développement des processus infectieux chez les ExPEC.....	42
Figure 2.6. Structure des fimbriae de type 1 et des fimbriae de type P.....	45
Figure 2.7. Mécanisme de compétition pour le fer entre l'entérobactérie, la lipocaline 2 et la salmochéline	49
Figure 3.1. Les trois modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries.	61
Figure 3.2. Enveloppe de <i>Escherichia coli</i>	65
Figure 3.3. Présentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques par les bactéries	67
Figure 3.4. Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame.....	70
Figure 3.5. Classification phylogénétique des BLSE.....	72
Figure 3.6. Schéma de l'arbre phylogénétique des CTX-M : Origine des gènes codant le groupe CTX-M.....	74
Figure 3.7. Répartition géographique des β -lactamase CTX-M.....	78
Figure 6.1. Schématisation des points de prélèvement des effluents en France	91
Figure 6.2. Points de prélèvement pour la STEP des eaux usées de Dakar.....	93
Figure 6.3. Schéma de la réaction d'immuno séparation magnétique.....	95
Figure 6.4. Démarche expérimentale.....	108
Figure 7.1. Dénombrement mensuel des entérobactéries en fonction des types de prélèvement.	109
Figure 7.2. Dénombrement mensuel des <i>E. coli</i> en fonction des types de prélèvement	110
Figure 7.3. Répartition des sérogroupes en fonction des sites de prélèvement.....	114
Figure 7.4. Association des gènes de virulence et des sérogroupes majeurs.....	114
Figure 7.5. Distribution des groupes phylogénétiques en fonction des points de prélèvement.....	115
Figure 7.6. Répartition des pathotypes dans les différents groupes phylogénétiques.....	115
Figure 7.7. Nombre de souches résistantes en fonction des antibiotiques.....	116
Figure 7.8. Résistance par antibiotique et par point de prélèvement	117
Figure 7.9. Profil de résistance des souches en fonction du nombre d'antibiotique	117
Figure 7.11. Nombre de souches de <i>E. coli</i> possédant au moins un gène de virulence des ExPEC résistantes pour chaque antibiotique testé.....	122
Figure 7.10. Comparaison de la virulence et du groupe phylogénétique des souches d' <i>E. coli</i> portant des gènes de virulence des ExPEC (Autres : < 3 gènes, pExPEC : \geq 3 gènes).....	122
Figure 7.12. Comparaison de la virulence et de la résistance des ExPEC (Autres : < 3 gènes, pExPEC : \geq 3 gènes).....	124

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

Tableau 2.1. Épidémies à EHEC survenues depuis 2006 et publiées dans la littérature internationale (adapté de (6))	41
Tableau 2.2. Les adhésines des ExPEC	47
Tableau 2.3. Réservoirs humain et animal des gènes associés aux ExPEC	57
Tableau 3.1. Classification fonctionnelle et moléculaire des β -lactamases majeures	71
Tableau 6.1. Amorces, taille attendue de l'amplifiat des gènes de virulence <i>eae</i> , <i>stx1</i> et <i>stx2</i> chez les <i>E. coli</i>	98
Tableau 6.2. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes spécifiques EAEC	98
Tableau 6.3. Amorces utilisées pour la détection des gènes de virulence associés aux ExPEC et conditions PCR.	100
Tableau 6.4. Amorces utilisées pour le sous-typage des gènes <i>f17</i> et <i>cnf</i>	101
Tableau 6.5. Les amorces, les souches de références et la taille des l'amplicons attendue pour le sous-typage de <i>stx1</i> et <i>stx2</i>	104
Tableau 6.6. Les amorces, les souches de références, la taille des amplicons attendue et les programmes de PCR	106
Tableau 6.7. Antibiotiques utilisés pour caractériser la résistance phénotypique des souches de <i>E. coli</i> et charge des disques d'antibiotique.	107
Tableau 7.1. <i>E. coli</i> porteuses de gènes <i>stx</i> et/ou <i>eae</i> par point de prélèvement.	111
Tableau 7.2. Répartition des <i>E. coli</i> porteuses de gènes de virulence associés aux EHEC en fonction des saisons	111
Tableau 7.3. Nombre de souches isolées et conservées en fonction des sites de prélèvement	112
Tableau 7.4. Répartition des sérogroupes isolés en fonction des saisons	112
Tableau 7.5. Répartition des variants recherchés du gène <i>eae</i> en fonction des points de prélèvement (nombre de souches (%))	113
Tableau 7.6. Répartition des variants <i>Stx</i> en fonction des points de prélèvement	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 7.7. Caractéristiques des 5 sérotypes majeurs trouvés dans les effluents d'abattoir et le rejet final	118
Tableau 7.8. Prévalence des gènes de virulence en fonction des points de prélèvements.	120
Tableau 7.9. Distribution des souches potentiellement ExPEC (≥ 3 des gènes recherchés) et des souches portant moins de 3 gènes en fonction des points de prélèvement.	120
Tableau 7.10. Classification phylogénétique des souches porteuses de gènes associés aux ExPEC	121
Tableau 7.11. Pourcentage de souches « ExPEC » résistantes par antibiotique et en fonction des points de prélèvement.	123
Tableau 7.12. Pourcentage de souches porteuses du gène de résistance résistantes en fonction des points de prélèvement.	124
Tableau 7.13. Caractérisation des souches ExPEC porteuses d'au moins 5 gènes de virulence	125
Tableau 7.14. Caractéristiques des souches <i>E. coli</i> productrices de BLSE	126
Tableau 7.15. Dénombrement des Enterobacteries et <i>Escherichia coli</i> en fonction du site de prélèvement.	127
Tableau 7.16. Caractérisation des <i>E. coli</i> exprimant des genes de virulence associés aux EHEC	128
Tableau 7.17. Caractérisation des souches <i>E. coli</i> porteuses de genes de virulence associés aux ExPEC	128
Tableau 7.18. Pourcentage (%) de souches résistantes par antibiotique en fonction des points de prélèvement.	130
Tableau 7.19. Pourcentage (%) de souches résistantes en fonction du nombre d'antibiotiques	130

LISTE DES ABREVIATIONS

A/E	Attachement/effacement	<i>esc</i>	« <i>E. coli</i> secretion »
AA	« <i>aggregative adherence</i> »	<i>esp</i>	« <i>EPEC</i> secreted protein »
AAF	« <i>aggregative adherence fimbriae</i> »	<i>ETEC</i>	E. coli entérotoxigéniques
ADN	Acide désoxyribonucléique	ExPEC	« <i>Extraintestinal pathogenic E. coli</i> »
AEEC	« <i>Attaching/effacing E. coli</i> »	FEC	Bêta-lactamase, « <i>fecal Escherichia coli</i> »
Afa	« <i>Afimbrial adhesin</i> »	Gb3	Globotriosylcéramide
ARNt	Acide ribonucléique de transfert	Gb4	Globotétraosylcéramide
ARP2/3	« actin-related protein 2/3 »	GES	Guyana Extended-Spectrum β -lactamases
ATP	Adhénosine triphosphate	GTP	Guanosine triphosphate
BES	Brazilian extended-spectrum β -lactamase	HCP	« <i>haemorrhagic coli pilus</i> »
BET	bromure d'éthidium	HeLa	Cellules tumorales du col utérin d'Henrietta Lacks
<i>bfp</i>	« <i>bundle-forming pili</i> »	HEp-2	« <i>human epithelioma pharynx n°2</i> »
BLSE	Bêta-lactamase à Spectre Elargi	Hly	Hémolysine
C3G	Céphalosporines de troisième génération	HPI	« <i>high pathogenicity island</i> »
CAZ	Ceftazidime	<i>IbeA</i>	« <i>invasion of the brain epithelium</i> »
CDC42	« cell division control protein 42 »	INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
<i>cdt</i>	« <i>cytholethal distening toxin</i> »	Ipa	Antigène du plasmide d'invasion
CF	facteur de colonisation	IR	Integron résistance
CFA	« <i>colonization factor antigen</i> »	IRT	« inhibitor resistant TEM beta-lactamase »
<i>cif</i>	« <i>cycle inhibiting factor</i> »	IRTKS	« <i>Insulin receptor tyrosine kinase substrate</i> »
CLSI	« <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> »	IS	« Insertion sequence »
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice	KDa	Kilodalton (103 daltons)
CMT	Complexe mutant	KPC	« <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase »
<i>cnf</i>	« <i>cytotoxic necrotizing factor</i> »	LA	« <i>Localized adherence</i> »
CT-SMAC	Cefixime-tellurite-sorbitol-MacConkay	LB	Milieu Luria Bertani
CTX	Céfotaxime	LEE	« <i>Locus of enterocyte effacement</i> »
CTX-M	« Bêta-lactamase active on cefotaxim »	ler	« <i>LEE encoded regulator</i> »
DA	« <i>diffuse adherence</i> »	LNERV	Laboratoire National d'Élevage et de Recherches Vétérinaires
DAEC	<i>E. coli</i> d'adhésion diffuse	LPS	Lipopolysaccharide
DBO	Demande biochimique en oxygène	LT	« <i>heat labile enterotoxin</i> »
DCO	Demande chimique en oxygène	Map	« <i>Mitochondrial-associated protein</i> »
DDR	« <i>Cellular DNA-damage response</i> »	MES	Matères en suspension
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate	MH	Mueller-Hinton
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MNEC	« <i>Meningitis associated E. coli</i> »
<i>eae</i>	« <i>EPEC</i> attachement/effacement »	ND	non déterminé
EAF	« <i>EPEC</i> <i>adhesion factor</i> »	Nle	« <i>non LEE-encoded effector</i> »
EAgEC	<i>E. coli</i> enteroagregative	NM	souche non mobile
EAST-1	Toxine ST-1 des <i>E. coli</i> entéro-agrégatifs	NT	non typable
ECP	Effet cytopathique	NTEC	« <i>Entertoxigenic E. coli</i> »
ECP	<i>E. coli</i> common pilus	N-WASP	« <i>Wiskott-Aldrich Syndrom Protein</i> »
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique	ORF	« <i>open reading frame</i> »
Efa	« <i>EHEC</i> <i>factor for adherence</i> »	OXA	Bêta-lactamase, « <i>active on oxacillin</i> »
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique	PAI	« <i>pathogenicity island</i> »
<i>ehx</i>	Entérohémolysine des EHEC	PAP	« <i>pyelonephritis-associated pili</i> »
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasifs	pb	Paire de base
ENVT	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	PC1	« <i>from Staphylococcus aureus strain PC1</i> »
EPEC	<i>E. coli</i> entéro-pathogènes		

LISTE DES ABBREVIATIONS

PCR	« Polymerase Chain Reaction »	<i>Taq</i>	« <i>Thermophilus aquaticus</i> »
per	« plasmidencoded regulator »)	Tccp	« Tir cytoskeleton coupling protein »
PER	« Pseudomonas Extended Resistance »	TccP	«Tir cytoskeleton-coupling protein »
PLP	Protéines de Liaison à la Pénicilline	TEM	Bêta-lactamase, Temoneira
PSE	« Pseudomonas-specific enzyme »	Tir	« Translocated intimin receptor »
RDEC	« Rabbit enteropathogenic E. coli »	TLA	BLSE Tlahuicas, tribu mexicaine
REBECCA	«Rapid Enterobacteria E. coli coliform Agar	TNF α	« Tumor necrosis factor α »
RFLP	« restriction fragment length polymorphism »	TZB	Tazobactame
RTX	«repeats in toxin »	ufc	Unité formant colonie
saa	« STEC autoagglutining adhesin »	UMR	Unité Mixte de Recherche
sat	« secreted autotransporter toxin »	UPEC	« Uropathogenic E. coli »
SEC	Substance extractible au chloroforme	vat	« vacuolating autotransporter toxin »
SFO	BLSE de type Serratia fonticola	VEB	«Vietnam Extended-spectrum β -lactamase »
ShET1	« <i>Shigella</i> enterotoxin 1 »	VTEC	«Verotoxin-Producing Escherichia Coli »
SHU	Syndrome hémolytique et urémique	WXXXE	Motif retrouvé dans des effecteurs du SSTT
SHV	« sulfhydryl reagent variable »		
ST	« heat stable enterotoxin »		
STEC	« Shiga-like toxin producing E. coli »		
STEP	Station d'épuration		
Stx	Shiga-like toxine		
T3SS	Système de sécrétion de type III		
TAE	Tris, Acétate, EDTA		

Avant propos

Laboratoire d'accueil

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été effectués dans l'équipe 11 « Pathogénie moléculaire et cellulaire des infections à *Escherichia coli* » (USC INRA 1360 – INP-ENVT) de l'UMR INSERM 1043, Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan (CPTP). Cette équipe sous la responsabilité du professeur Eric Oswald travaille sur la pathogénicité des souches de *E. coli* représentant un risque majeur pour la santé publique telles que les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), entérotoxigènes (EPEC) ou responsables d'infections extra-intestinales (ExPEC).

Mon travail de thèse s'intègre dans l'axe « Epidémiologie environnementale des souches de *E. coli* pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques » et s'intéresse plus particulièrement à la dissémination des souches EHEC et ExPEC dans l'environnement et à la contamination de l'homme. Ce travail financé par la région Midi-Pyrénées a été réalisé à l'INP-ENVT sous la direction d'Hubert BRUGERE (enseignant chercheur) et Delphine BIBBAL (enseignant chercheur) et en collaboration avec Monique KEROUREDAN (assistant ingénieur).

Thématique de recherche

Les souches de *Escherichia coli* se trouvent dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où elles jouent généralement le rôle des bactéries commensales. Cependant, par acquisition et combinaison de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer une variété de maladies, de la gastro-entérite à des infections extra-intestinales (atteinte de l'appareil urinaire, du sang et du système nerveux central). Ainsi, on peut distinguer deux grands groupes de souches de *E. coli* pathogènes: des souches de *E. coli* pathogènes « intestinales » (EHEC, EPEC, EAEC...) et des souches de *E. coli* pathogènes « extraintestinales » (ExPEC). Les ExPEC sont ensuite classées en pathovars selon le type de troubles qu'elles provoquent et leur mode d'interaction avec l'hôte. On retrouve alors les *UroPathogenic Escherichia coli* (UPEC) qui sont les principales responsables des infections du tractus urinaire (ITU), les NMEC (*NewBorn Meningitis E. coli*) sont associées aux cas de méningites et les SEPEC (*Sepsis Extrapathogenic E. coli*) associées aux septicémies (220).

Les souches des différents pathotypes de *E. coli* décrites chez l'homme sont également présentes dans différentes espèces animales où ils font souvent l'objet de portage asymptomatique. L'excrétion fécale humaine et animale pourrait expliquer la contamination de l'environnement incriminée dans différentes épidémies.

Il apparaît important d'approfondir les connaissances scientifiques sur ces bactéries et établir leur prévalence et leur disémination dans l'environnement qui sont des préalables indispensables à l'estimation et finalement à l'appréciation du risque pour la santé publique lié à l'existence de souches pathogènes dans les effluents des abattoirs d'animaux de boucherie et des effluents urbains.

Le projet de thèse présenté ici s'inscrit dans le programme de recherche visant à étudier l'épidémiologie environnementale des EHEC, des ExPEC et des souches *E. coli* résistantes aux antibiotiques.

**PARTIE I. ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre 1 : GENERALITES SUR LES *ESCHERICHIA COLI*

I.1. Taxonomie et définition

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à coloration de Gram négative, non sporulés, anaérobies facultatifs et qui ne possèdent pas d'oxydase. Le genre *Escherichia* compte 5 espèces : *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. blattae*. L'espèce *E. coli* est considérée comme un hôte normal, c'est-à-dire commensal, de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. La niche écologique de cette bactérie se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon. Etant donné qu'elle est hautement compétitive dans cet environnement, *E. coli* reste la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans le côlon humain, dans celui d'autres mammifères et des oiseaux (142, 227, 388). Les souches commensales de *E. coli* sont donc très bien adaptées à une « coexistence pacifique » avec l'hôte.

Cependant, *E. coli* a été mise en cause pour la première fois dans l'étiologie de l'entérite infantile lorsque Théodore Escherich isola ces micro-organismes lors de cas de diarrhée de nourrissons en 1885. Durant les années 1920 et 1930, plusieurs chercheurs essayèrent d'identifier les types spécifiques de *E. coli* responsables des entéropathies, mais aucun progrès significatif ne fut réalisé jusqu'à la mise au point par Kauffmann, dans les années 1940, d'un schéma de sérotypes précis (470). Ainsi, à partir des années 1950, de nombreuses souches de *E. coli* appartenant à des sérotypes particuliers ont été répertoriées, chez l'homme comme chez l'animal, comme étant des souches pathogènes responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles (227, 267, 326). Le premier système permettant la reconnaissance et une classification des souches de l'espèce *E. coli* fut la détermination des serotypes, c'est-à-dire une combinaison de certains antigènes de surface (229).

I.2. Antigènes et sérotypage

L'antigène somatique O, définissant le séro groupe, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à coloration de gram négative. L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle permettant la mobilité

de la bactérie. L'antigène de surface K est présent de façon inconstante mais bloque l'agglutinabilité de l'antigène O et donc le sérogroupage lorsqu'il est présent.

L'identification des antigènes et sérogroupes a permis de différencier des souches pathogènes des souches commensales. En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment (35, 343, 417).

I.2.1. Les antigènes somatiques O

Les antigènes O sont des composés lipopolysaccharidiques complexes qui contiennent une fraction protéique qui rend l'ensemble antigénique. Plus de 176 antigènes somatiques différents ont été identifiés, la fraction polyosidique contient un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides de 10 à 25 sucres dont la combinaison est responsable de la diversité et de la spécificité des antigènes O (424). Ces antigènes sont agglutinants en présence d'un immun sérum complémentaire et permettent le sérogroupage définissant un séroroupe. La synthèse de l'antigène peut être interrompue en culture avec le passage des colonies du type S (smooth, lisse) au type R (rough, rugueux) n'exprimant plus l'antigène O. L'absence de cet antigène empêche donc le sérotypage par les méthodes classiques mais un typage génétique reste cependant possible ; les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le « cluster de gène *rfb* » (93, 425, 429). L'amplification puis la restriction par l'endonucléase MboII permet l'obtention de profils permettant l'identification du séroroupe de ces souches R (93). Le séroroupe ainsi identifié sera noté par exemple R157 par analogie au séroroupe identique O157 obtenu par agglutination. Ce type d'identification permet en outre une caractérisation plus fine des souches que le sérogroupage classique.

I.2.2. Les antigènes flagellaires H

Le flagelle bactérien permet la mobilité. Cette fonction est clairement définie dans la pathogénie des *E. coli* uropathogènes (UPEC), il a été récemment montré que les flagelles facilitent l'ascension des souches UPEC de la vessie aux reins (257, 258, 477) (cf infra). La diversité des antigènes H tient à la variabilité des sous-unités de flagellines constituant le flagelle par polymérisation. Ces antigènes sont variables entre espèces mais aussi parfois au sein d'une même espèce et contribuent à définir le sérovar. Le typage s'effectue par séro-agglutination mais n'est réalisé que par de rares laboratoires spécialisés. L'antigène H est

utilisé pour l'identification des *E.coli* pathogènes, pour la caractérisation précise des souches d'un même sérotype. Certaines souches peuvent perdre leur mobilité par perte d'expression du flagelle ; elles sont alors classées comme non mobiles (NM ou H-). De façon comparable au sérogroupage par amplification restriction, un sérotypage moléculaire est possible pour les souches H-. Le traitement par amplification et restriction du gène « *fliC* » codant pour l'antigène H permet le typage de la souche et sera noté par exemple F7 correspondant au type H7 obtenu par agglutination (285).

L'espèce *E. coli* peut être subdivisée en sérotypes par la combinaison des deux antigènes somatique O et flagellaire H (ex : O157:H7 ou O111:H8), ou sérogroupes si l'antigène somatique O seul a été déterminé (ex : O157, O111).

I.2.3. Les antigènes de surface K

Les antigènes de surface aussi appelés antigènes de capsule ou d'enveloppe ou encore antigène Vi chez *Salmonella* sont des polyosides acides qui ont été initialement divisés en trois types A, B et L. Ils masquent les antigènes somatiques O et empêchent le sérotypage lorsqu'ils sont présents.

L'antigène L, thermolabile, est le plus fréquent. Le chauffage à 100°C pendant une demi-heure le détruit et démasque l'antigène O le rendant accessible aux techniques de sérogroupage.

L'antigène A est plus rare et correspond véritablement à un antigène capsulaire. Le chauffage à 100°C ne suffit pas à le détruire. Seul un autoclavage à 121°C durant une heure permet de démasquer l'antigène somatique.

L'antigène B possède une thermolabilité intermédiaire entre les Ag L et A. Un chauffage à 100°C permet le sérogroupage mais ne supprime pas totalement l'antigène B. Un chauffage plus prolongé peut permettre de le détruire totalement.

I.3. Plasticité génotypique et clonalité de l'espèce E. coli

Escherichia coli est l'une des espèces bactériennes présentant une très forte plasticité génomique. Elle s'adapte entre son habitat primaire, l'intestin des vertébrés, où elle vit comme commensale (439), et son habitat secondaire, l'eau et les sédiments (401). Cette espèce bactérienne peut également se comporter comme un microbe pathogène à localisation

intestinale et extraintestinale chez l'homme et beaucoup d'autres espèces animales (227). Cette diversité de style de vie est possible grâce à l'instabilité génomique, avec des échanges de gènes par transfert horizontal (376, 447).

Le répertoire total de gènes de l'espèce est supérieur à 10 000 (376, 447). La majorité des souches, porte environ 4 721 gènes, et seulement 1 976 gènes appartiennent au fond commun. Ainsi, la diversité phénotypique observée est le résultat d'un grand nombre de combinaisons de gènes. Outre le flux de gènes important, des études basées sur l'analyse du polymorphisme électrophorétique d'enzymes métaboliques (multilocus enzyme electrophoresis ou MLEE) ont montré que *E. coli* était une espèce clonale. Cette espèce appartient à neuf sous-groupes phylogénétiques avec la délimitation claire au moins de six principaux groupes phylogénétiques (A, B1, B2, D, E et F) (206, 439) (**Figure 1.1**).

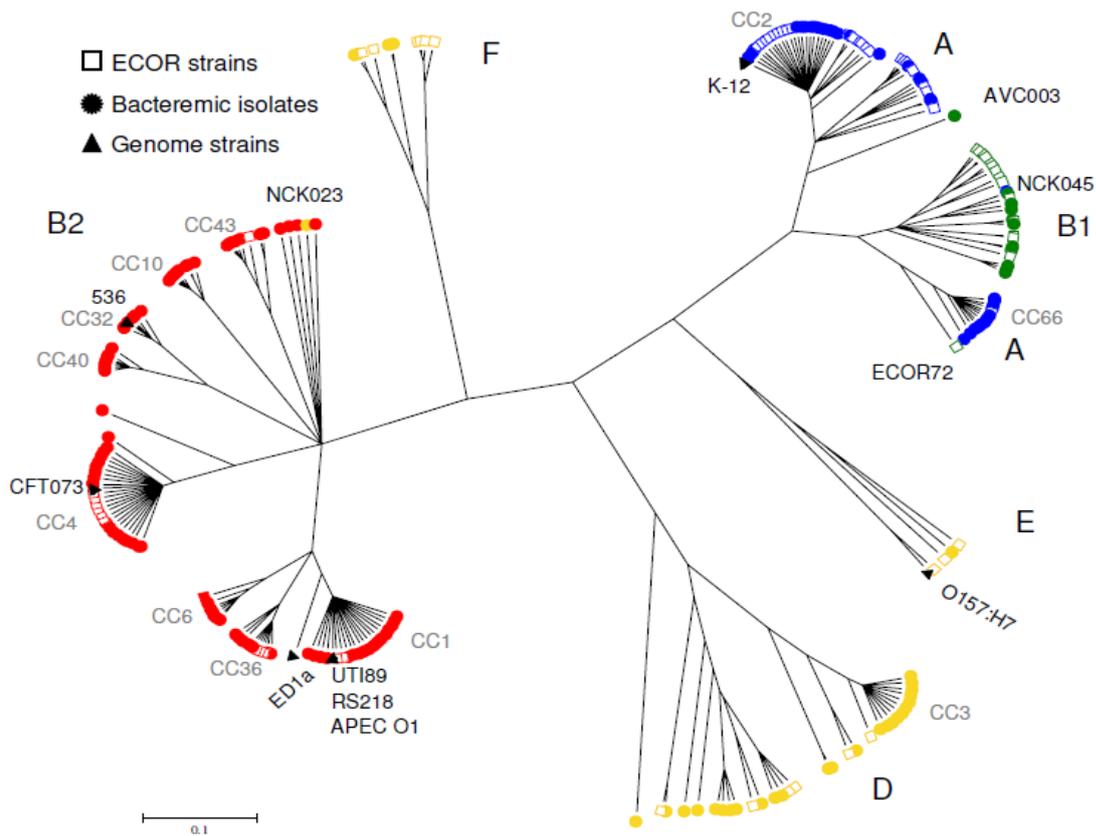


Figure 1.1. Diversité phylogénétique des souches de *Escherichia coli*

Les cercles représentent l'analyse de 161 souches isolées d'une bactériémie ; les carrés représentent 67 souches ECOR ; et les triangles représentent 7 génomes de référence. En rouge le groupe B2, en vert le B1, en jaune le D, et en bleu le groupe A (206). Dans les années 1990s la classification ECOR (*E. coli* Collection Reference) est apparue. En utilisant la méthode MLST (« multilocus sequence typing »), Ochman H. et Sealander RK. ont pu référencer 72 souches de *E. coli* qui représentaient l'espèce totale. Cette classification se fondait sur la séquence nucléotidique de plusieurs gènes de ménage (189, 336).

Chapitre 2 : LES SOUCHES DE *E. COLI* PATHOGENES

II.1. Commensalité et pathogénicité

Les souches *Escherichia coli* sont retrouvées dans le tractus gastrointestinal de nombreux animaux à sang chaud, dont l'homme, où elles jouent communément le rôle de bactérie commensale. Cependant, l'acquisition et la combinaison de facteurs de virulence chez les souches *E. coli* peuvent entraîner des modifications de leur comportement pouvant occasionner diverses infections telles des infections intestinales (268) ou extra-intestinales (365). Les souches de *E. coli* peuvent être regroupées en huit pathovars (**Figure 2.1**).

Les *E. coli* à l'origine de maladies intestinales ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Elles se retrouveront donc dans les fèces et par la suite dans les effluents animaux (élevages et abattoirs) et les effluents d'origine humaine. Ce premier groupe de pathogènes est subdivisé en 6 pathovars majeurs (99) selon le type de maladie engendrée et les facteurs de virulence associés : les ETEC (*E. coli* Entérotoxigènes), les EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques), les EPEC (*E. coli* entéro-pathogènes), les DAEC (*E. coli* à adhérence diffuse), les EAEC (*E. coli* entéro-agrégatives) et les EIEC (*E. coli* entéro-invasives).

Le deuxième groupe de *E. coli* à l'origine de maladies extra-intestinales (ExPEC) a acquis la capacité de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte, et à se propager dans l'organisme (219). Elles peuvent induire chez leurs hôtes des infections du tractus urinaire (ITU) : UPEC, « Urinary Pathogenic *E. coli* » ; des méningites néonatales : NMEC, « Neonatal Meningitis *E. coli* » ; ou des septicémies (314). Elles posent problème autant en médecine humaine, (notamment à cause des multiples résistances acquises portées le plus souvent par des plasmides), qu'en médecine animale.

Cependant, il est important de noter que différentes classifications coexistent. Diverses revues font état de l'existence de groupes distincts ; nous pourrions citer entre-autres le groupe des APEC (« Avian Pathogenic *E. coli* ») rassemblant les *E. coli* qui engendrent des maladies chez la volaille (118, 252) ainsi que le groupe des AIEC (Adherent Invasive *E. coli*) qui est associé avec la maladie de Crohn (102, 297) et des STEAEC (« Shiga-toxin-producing enteroaggregative *E. coli* ») dont la souche *E. coli* O104:H4 responsable de l'épidémie de SHU en 2011 en Allemagne (317).

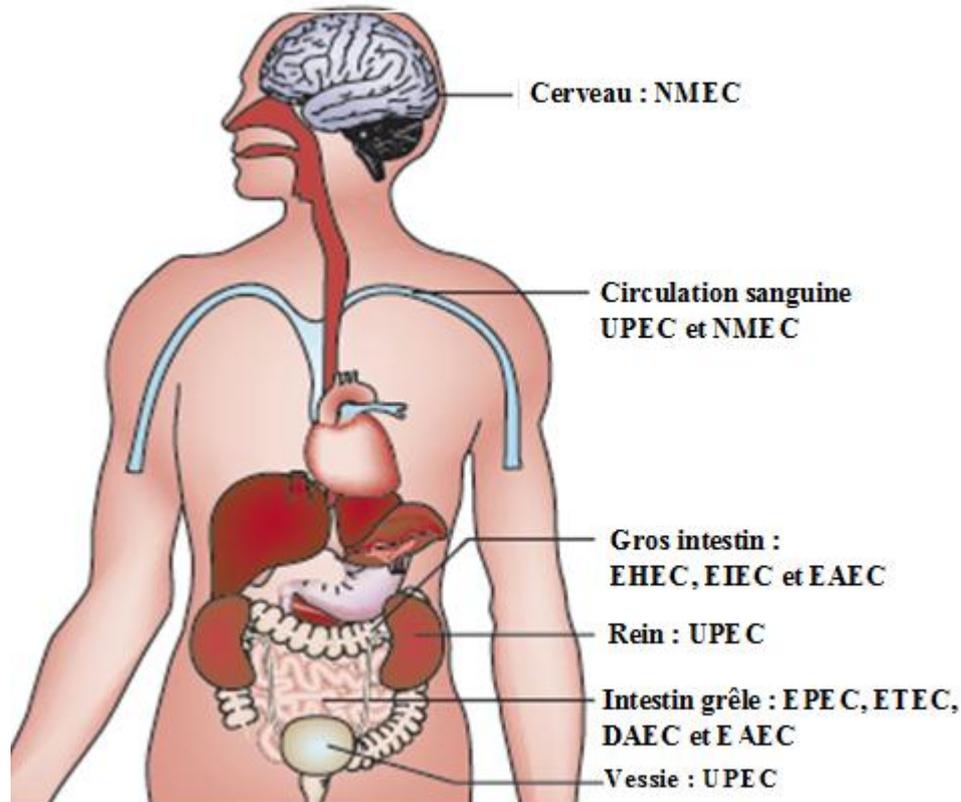


Figure 2.1. Sites de colonisation des *Escherichia coli* pathogènes

E. coli entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhée, alors que *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* entéroinvasive (EIEC) colonisent plutôt le côlon; *E. coli* entéroaggrégative (EAEC) peut coloniser les deux. *E. coli* uropathogène (UPEC) colonise le tractus urinaire jusqu'à la vessie et est à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie (adapté de (99)).

II.2. Les pathogènes intestinaux

Les pathogènes intestinaux de *E. coli* appartiennent pour la plupart aux groupes phylogénétiques A/B1/E (88) et sont reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique. Six principaux pathovars classifiés en fonction des signes cliniques et des facteurs de pathogénicité exprimés sont inclus dans ce groupe.

II.2.1. Les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC sont à l'origine d'épisodes de diarrhée aqueuse, modérée à sévère, peu fébriles, associés à des nausées et à des crampes abdominales. Dans les pays dits en voie de développement, les ETEC sont la cause majeure de cas de diarrhée aqueuse aiguë chez les enfants de moins de 5 ans et de « diarrhée du voyageur » ou

« *turista* » (227, 326). Des souches ETEC sont également importantes dans les fermes, les porcelets en post-sevrage sont fortement susceptibles à l'infection (326). Les ETEC appartiennent aux sérogroupes : O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 et O173 (424).

II.2.2. Les *Escherichia coli* entéroinvasives (EIEC)

Les EIEC et les shigelles sont souvent classés dans le même groupe de pathovar avec des caractères biochimiques, antigéniques, génétiques et fonctionnels très proches, et possèdent une stratégie d'infection similaire. Les EIEC sont responsables de syndrome dysentérique caractérisé par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement vers une dysenterie (diarrhée contenant du sang et du mucus). Cependant, *Shigella* est une bactérie à localisation intra-cellulaire qui n'a ni flagelles ni des facteurs d'adhésion. Elle est fortement infectieuse et est responsable de la dysenterie bacillaire avec diarrhée sanglante (227). Les souches d'EIEC appartiennent aux sérogroupes : O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164 et O167 (424).

II.2.3. Les *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les DAEC sont un groupe hétérogène qui produit une adhérence diffuse sur cellules Hela et HEp-2. Cette adhérence est favorisée par des protéines codées par une famille d'opérons, qui incluent à la fois les adhésines fimbriales (Dr. et F1845) et les adhésines afimbriales réunies sous le nom de Afa-Dr (411). Les isolats de DAEC qui expriment Afa-Dr en colonisant l'intestin grêle, engendrent des cas de diarrhée chez les enfants entre 5 et 18 mois d'âge. Par ailleurs, ils peuvent coloniser le tractus urinaire et être à l'origine d'infection urinaire récurrente chez l'adulte (411).

II.2.4. Les *Escherichia coli* entéro-agrégatives (EaggEC, ou EAEC)

Considérés comme des pathogènes émergents, les EAEC sont la deuxième cause de diarrhée des voyageurs après ETEC dans les pays développés et en voie de développement. Les EAEC sont également reconnues comme une cause de diarrhée endémique et épidémique dans le monde entier. La diarrhée provoquée par les EAEC est souvent aqueuse, mais elle peut être accompagnée de mucus ou de sang. Les sérogroupes qui ont été identifiés dans le groupe des EAEC sont : O3, O7, O15, O44, O77, O86, O104, O111, O126 et O127 (317, 424).

La colonisation des EAEC peuvent se produire dans la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin et évoluer vers une inflammation progressive dans le côlon (326). Les souches EAEC se caractérisent par un type d'adhésion agrégative en " briques empilées " à l'origine de nécrose au pôle apical des villosités avec œdème inflammatoire et hémorragique de la sous muqueuse. Ce modèle d'adhésion est codé par des gènes localisés sur une famille de plasmides de virulence appelés les plasmides de pAA. Ces plasmides de 100 kb codent les gènes nécessaires pour la biogénèse des fimbriae d'adhérence agrégative (AAFs) notamment les adhésines de la famille Dr et favorisent l'adhérence d'EAEC à la muqueuse intestinale. Quatre variants d'AAFs (AAF/I, AAF/II, AAF/III et Hda) ont été identifiés (49, 184). Les récepteurs pour AAFs sont inconnus, mais les données récentes prouvent qu'AAF/II peut lier la fibronectine (132). Deux autres toxines, ShET1 (« *Shigella* enterotoxin 1 ») et EAST1 (« *E. coli* ST1 »), peuvent être trouvées dans d'autres isolats EAEC, mais leur rôle dans la pathogénie n'est pas complètement compris. L'expression de la plupart de ces facteurs de virulence semble être sous la dépendance de l'activateur de transcription AggR. De plus, les enquêtes épidémiologiques relatives aux souches EAEC montrent que la présence du régulon AggR chez les souches incriminées est associée à l'apparition de cas de diarrhée. Aussi, le terme d'EAEC « typique » a été proposé récemment pour désigner les EAEC possédant le gène *aggR* et quelques gènes régulés par celui-ci par opposition aux souches d'EAEC « atypiques » (218).

II.2.5. Les *Escherichia coli* entéro-pathogènes (EPEC)

Les EPEC sont responsables de cas de diarrhée sévère chez les enfants dans les pays en voie de développement (99). Par contre, dans les pays industrialisés, l'incidence des infections dues aux EPEC a fortement diminué. Mais des cas sporadiques sont encore recensés dans les communautés d'enfants. Les sérogroupes des souches EPEC les plus fréquemment associés à la diarrhée chez l'homme sont O111, O128, O86, O55, O125, O127 (72) et chez les bovins, le séro groupe O26 (290). En plus de l'homme et des bovins, les souches EPEC sont retrouvées chez d'autres animaux comme le chien, le chat, le lapin, le porcelet, ou bien encore chez la chèvre et le mouton (245). Les EPEC font parties du groupe des pathogènes entraînant des lésions de type attachement/effacement (A/E) des cellules de l'épithélium intestinal. Dans ce groupe on retrouve aussi les EHEC, les RDEC (« rabbit diarrhoeagenic *E. coli* »), *Citrobacter redentium* pathogène chez la souris et *Escherichia albertii* identifié récemment et autrefois connu comme *Hafnia alvei* (99).

Les lésions d'A/E des microvillosités sont caractérisées par une adhésion intime des bactéries résultant en une désorganisation du cytosquelette de la cellule hôte et en particulier l'accumulation de l'actine polymérisée pour former des piédestaux en regard de la zone d'adhésion de la bactérie (**Figure 2.2**). Ce phénotype caractéristique des EPEC est codé par des gènes regroupés sur un îlot de pathogénicité de 35 Kb, le LEE pour « locus of enterocyte effacement » (307). Le LEE code et régule fortement un système de sécrétion de type 3 (T3SS) qui transfère les protéines effectrices bactériennes dans le cytoplasme de la cellule hôte. Sept effecteurs codés par LEE et plusieurs effecteurs non-LEE (NLe) interviennent dans cette régulation et le rôle de plusieurs de ces effecteurs reste inconnu (107).

L'adhésion initiale des EPEC aux entérocytes de l'intestin grêle est associée à la présence d'un plasmide EAF (pour « EPEC adhesion factor ») qui code les pili BFP (« bundle forming pili »). Ces pilis permettent à la bactérie de se fixer et former des microcolonies sur leur site d'adhésion à partir des récepteurs *N*-acetyl-lactosamine de la surface de la cellule hôte (196). L'attachement intime est favorisé par l'interaction entre l'intimine bactérienne, une protéine extramembranaire et du récepteur d'intimine (le TIR). Les EPEC utilisent le T3SS pour transférer rapidement le TIR dans le cytoplasme des cellules hôtes dans un processus qui est probablement initié par les ions Ca^{2+} (435). Le TIR est alors déposé à la surface de la cellule hôte (230) et agit en tant que récepteur pour l'intimine et sera, après interaction, phosphorylé par la tyrosine kinase (51, 360, 434). Des expériences *in vitro* ont montré que la phosphorylation de TIR recrute la protéine Nck21 à l'emplacement de l'attachement, qui active la protéine N-WASP (« neural wiskott–Aldrich syndrome protein ») et l'ARP2/3 (« actin-related protein 2/3 ») complexe qui entraîne le réarrangement de l'actine et la formation du piédestal (226) (Figure 2.3). Les EPEC ont un grand répertoire d'effecteurs qui sont transférés dans les cellules hôtes par le T3SS et modifient les processus normaux de la cellule hôte. Par exemple, elles causent des réarrangements cytosquelettiques et la modulation de l'immunité et en contribuant ainsi à la diarrhée. Les effecteurs transférés ont des fonctions multiples. Parmi ces effecteurs, l'effecteur multifonctionnel EspF est dirigé contre les mitochondries et déclenche leur voie de mortalité (329). L'effecteur EspF est également impliqué dans l'inhibition de la phagocytose (372) et de la rupture des jonctions serrées (169). L'effecteur EspB (également connu sous le nom d'EaeB) joue un rôle double comme protéine de translocation de T3SS et comme effecteur qui empêche la phagocytose (197). Les protéines de Nle ont également des rôles dans la virulence d'EPEC. Par exemple, NleA

(également connu sous le nom d'EspI) réduit les protéines qui interviennent dans la modification des voies de signalisation (232) et modifie la structure des jonctions serrées (443). L'effecteur EspJ empêche l'opsonisation et la phagocytose des globules rouges du sang (295), et Cif (« cycle inhibiting factor ») est un cyclomodulin qui est capable de déclencher l'arrêt du cycle cellulaire en induisant la stabilisation des protéines (p21 et p27) inhibitrices des machineries qui contrôlent la progression dans le cycle (395) et, plus tard, induit l'apoptose (396). Plusieurs autres protéines de type Nle ont été identifiées (104) ; cependant, leur caractérisation demeure cursive.

II.2.6. Les *Escherichia coli* enterohémorragiques (EHEC)

Les *Escherichia coli* enterohémorragiques (EHEC) sont des bactéries pathogènes et zoonotiques qui se retrouvent dans l'eau et parfois dans les aliments. Elles sont responsables de diarrhée, de colite hémorragique et de syndrome urémique hémolytique chez l'homme mais peu ou pas de maladie perceptible chez les animaux considérés comme des réservoirs. Le sérotype O157:H7 est le plus fréquent pour les souches EHEC chez l'homme, mais d'autres sérotypes comme les O26:H11, O26:H-, O111:H-, O103:H2, O145:H- sont de plus en plus fréquents. A ce jour plusieurs dizaines de sérotypes ont été reconnus et publiés (326, 448). Ils sont regroupés sous le nom générique des souches EHEC non-O157 : O4, O5, O16, O26, O46, O48, O55, O91, O98, O103, O111ab, O113, O117, O118, O119, O125, O126, O128, O145, O172 O177, O178, O179, O180 et O181. En outre, plusieurs des sérogroupes d'EHEC sont également identifiés comme EPEC. Les sérogroupes O5, O26, O111 et O118 associés aux souches EHEC ont été isolés chez les veaux, (289-291, 326). *Escherichia coli* O157:H7, le sérotype le plus souvent incriminé des EHEC a été isolé en 1982 lors d'une épidémie de colites hémorragiques à la suite de consommation de viande pas assez cuite dans des restaurants « fast food » (384). EHEC O157 a été également isolé dans des cas sporadiques de colite hémorragique (384). L'identification de la production de Shigatoxines (Stxs) à partir des souches EHEC O157 a mené à la découverte de leur rôle dans le développement de syndrome hémolytique et urémique (SHU) et une triade pathologique se composant d'une anémie microangiopathique hémolytique, d'une thrombocytopénie et d'une insuffisance rénale aiguë (224, 228, 334).

Bien qu'EHEC O157 soit le sérotype le plus connu et isolé chez des humains aux Etats-Unis, plus de 100 autres sérotypes, caractérisés collectivement comme EHEC non O157, sont

reconnus par l'Organisation mondiale de la santé en tant que microbes pathogènes zoonotiques émergents. Les EHEC non O157 sont responsables d'épidémies associées à des cas de diarrhée, des colites hémorragiques et aux SHU chez l'homme (63, 187). La comparaison du génome d'EHEC O157 avec celui de trois autres sérotypes d'EHEC non O157 cliniquement importants (O26, O111, et O103) a indiqué que tous ont des gènes de virulence très semblables d'où l'évolution parallèle de ces différents EHEC (339).

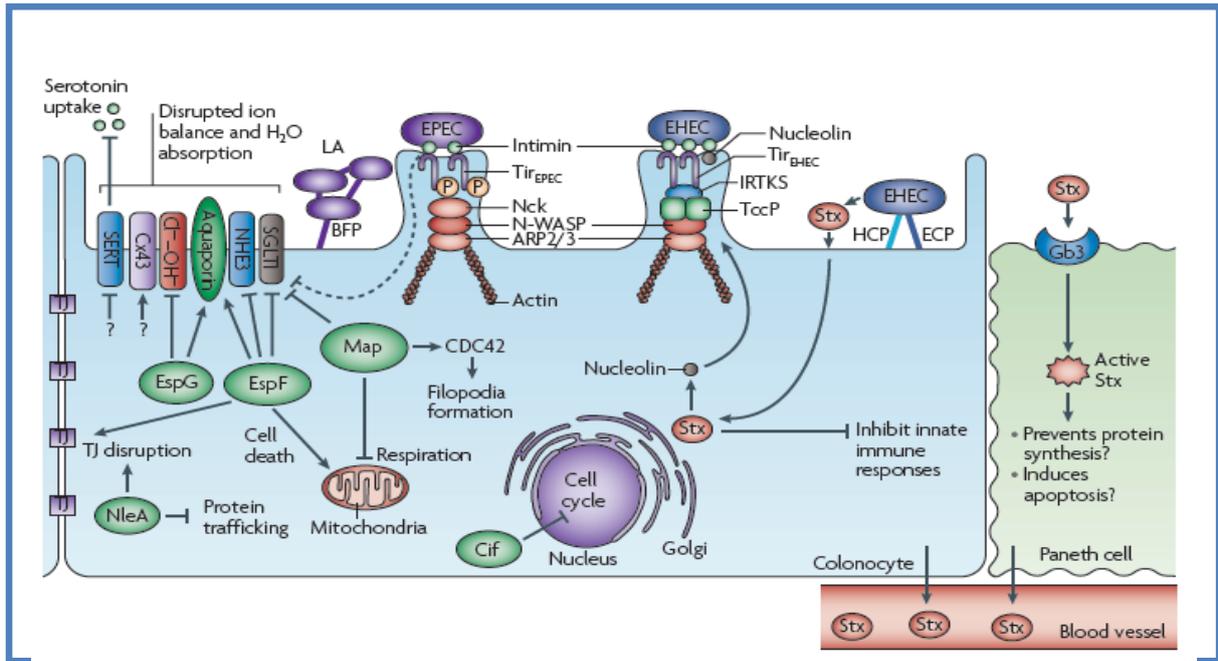


Figure 2.2. Mécanisme de pathogénicité des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques D'après (99)

II.2.6.1. Les facteurs de virulence associées aux EHEC

La presque totalité des EHEC O157:H7 portent un plasmide de virulence pO157 de 92 kb, qui a approximativement 100 ORFs (« Open Reading Frames ») et code pour plusieurs facteurs de virulence. Cependant, le facteur principal de virulence d'EHEC est la Shigatoxine (Stx) (Stx ; également connue comme vérocycytotoxine (Vtx), qui est une caractéristique des *E. coli* du groupe des « Shigatoxin producing *E. coli* » (STEC) auquel EHEC O157:H7 appartient).

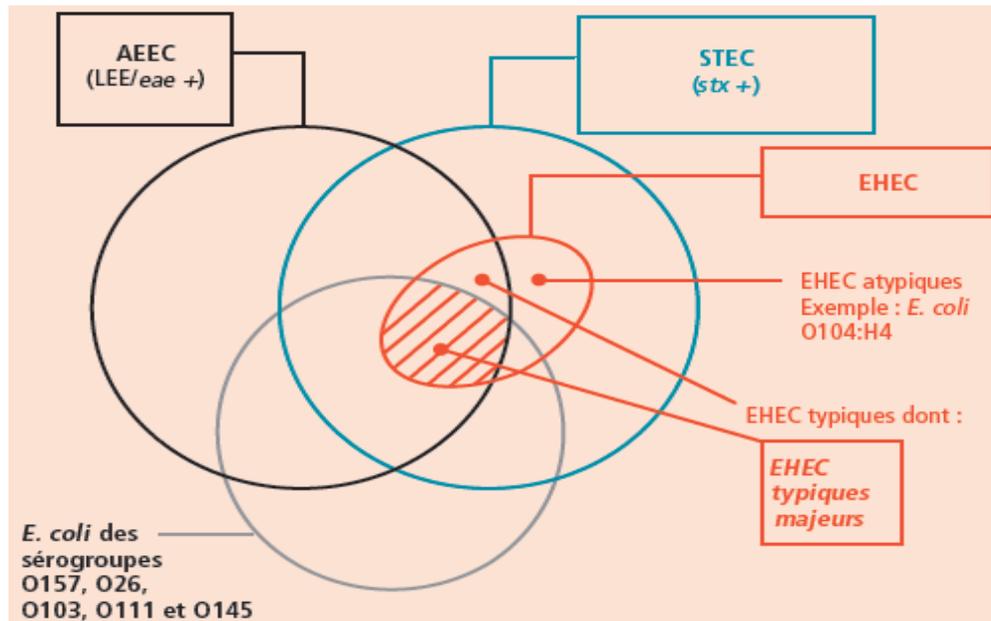


Figure 2.3. Représentation schématique des souches AEEC, EHEC et STEC

Toutes les souches possédant le LEE, incluant le gène *eae*, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des AEEC. Les souches possédant le gène codant les toxines Stx, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC. Les EHEC sont associées chez l'Homme à une colite hémorragique et/ou un syndrome hémolytique et urémique et produisent des toxines Stx. Ainsi, toutes les EHEC sont des STEC mais toutes les souches STEC, mêmes celles qui possèdent le LEE, ne sont pas systématiquement associées à la maladie chez l'Homme. La grande majorité des souches EHEC Possèdent le LEE et les souches EHEC LEE+ sont dénommées EHEC typique. Les souches EHEC typiques appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, et O145:H28 (et leurs dérivés non mobiles) sont les souches les plus souvent associées à des signes cliniques graves (SHU) et aux épidémies et sont dites souches « EHEC typiques majeurs » . Adaptée de (6)

II.2.6.1.1. Shiga-toxines (Stx) ou vérotoxines (Vtx) des EHEC

Les shigatoxines (Stx1 et Stx2) sont des toxines particulières codées par les gènes *stx* et sécrétées par certaines souches de *E. coli* : les STEC (« *Shiga-toxin-Producing Escherichia coli* » ou *E. coli* produisant des shiga-toxines), anciennement connues sous le nom de VTEC (*Verotoxin-Producing Escherichia Coli* ou *E. Coli* produisant des vérotoxines). La shiga-toxine tient son nom du fait de sa grande similitude avec une toxine produite par *Shigella dysenteriae*. Elle est également connue sous le nom de vérotoxine, en raison de sa toxicité pour les cellules Vero, des cellules de reins du singe vert d'Afrique utilisées en culture cellulaire.

a) Structure de la shigatoxine (Stx)

Les shigatoxines sont des hétéropolymères de 70 kDa formés d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7 kDa (141). La sous-unité A est responsable de l'activité enzymatique tandis que la sous-unité B intervient dans la liaison aux récepteurs. Les deux sous unités A et

B sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type I-like qui est retrouvé dans toutes les souches STEC pathogènes. Cet opéron est constitué d'un cistron proximal codant la sous-unité A et d'un cistron distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B. La toxine Stx comporte deux sous-groupes Stx1 et Stx2, le sous-groupe Stx2 est le plus répandu dans les cas de colite hémorragique et de SHU (326). À côté, quelques isolats produisant en même temps Stx1 et Stx2, ou plus rarement seulement Stx1 (198, 318, 427) ont été identifiés.

b) Classification des shiga-toxines

Deux grandes classes de shigatoxine sont aujourd'hui identifiées : les toxines Stx1, qui sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (69, 428). En dépit de l'homologie des séquences d'acides aminés primaires, Stx1 et Stx2 sont immunologiquement distincts (333). En outre, Stx1 et Stx2 ne visent pas exactement les mêmes tissus et organes bien que les deux liés au récepteur Gb3, sont capables de causer une colite hémorragique et un SHU (84, 389, 437). Ces propriétés ont été montrées chez le modèle animal où Stx2 est beaucoup plus efficace que Stx1 chez les souris mais l'inverse est observé chez les lapins (441). Cependant, les données épidémiologiques montrent que les souches produisant la toxine Stx2 sont responsables des troubles les plus sévères chez l'homme (48).

Par ailleurs, tous les variants ont les mêmes particularités génétiques que les gènes de référence, *stx1* et *stx2*. Il n'est pas rare, suite à l'insertion de plusieurs phages dans le chromosome bactérien, d'observer des souches possédant plusieurs variants.

- **Le variant *stx1a*** correspond à la séquence nucléotidique du gène *stx1* porté par le phage 933J (428) et représente le variant de référence ou variant « sauvage » de la souche O157-EDL933.

- **Le variant *stx1c***, tout d'abord mis en évidence chez des souches d'origine ovine et nommé *stx1OX3* (350), a été retrouvé plus tardivement, chez des souches humaines et rebaptisé *stx1c* (483). Chez l'homme, il n'est associé qu'à des cas de diarrhée sans complication, ou bien n'entraîne aucun symptôme. Ses pourcentages d'homologie avec le gène *stx1* sont respectivement de 97 et 95% pour les séquences des sous-unités A et B. Les

protéines, quant à elles, ne diffèrent que de 9 et 3 acides aminés correspondant à 97,1 et 96,6% d'homologie entre les sous-unités A et B respectivement.

- **Le variant *stx1a*** a été mis en évidence chez une souche d'origine bovine (65). Un séquençage du gène a montré que les régions codant les sous-unités A et B possédait 93 et 92% d'homologie respectivement avec la séquence de référence *stx1*. Ce résultat correspond à une différence de 20 acides aminés pour la sous-unité A et de 7 acides aminés pour la sous-unité B.

Les variants *stx2* sont quant à eux beaucoup plus nombreux. Sept variants ont été identifiés à ce jour: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*

- **Le variant *stx2a*** « sauvage » correspond au gène de la souche de référence EDL 933 qui porte le phage 933W (428).

- **Le variant *stx2b*** est rarement associé à la maladie chez l'homme (146)

- **Le groupe de variant *stx2c*** comporte deux sous-variants : *stx2vh-a* et *stx2vh-b*. Ils ont été mis en évidence dans une même souche de *E.coli* O91:H21 isolée d'un patient atteint d'un SHU. Le clonage et le séquençage des gènes de la souche ont ainsi mis en évidence deux gènes distincts capables de produire une shigatoxine similaire à Stx2 (200). Le gène *stx2vh-a* présente respectivement 98,6 et 95,5% d'homologie avec les régions de *stx2* codant les sous-unités A et B. *stx2vh-b* présente 99% d'homologie avec *stx2vh-a* sur la totalité de la séquence d'ADN. La souche *E.coli* O91:H21 constitue donc aujourd'hui, la souche de référence lors d'études sur les variants *stx2c*.

- **Le groupe de variant *stx2a*** est constitué des sous-groupes *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111*. Ils ont été mis en évidence chez des souches humaines ou animales (362). Les toxines Stx_{2d} semblent moins pathogènes chez l'homme puisqu'elles sont le plus souvent associées à des souches isolées d'humains n'ayant pas développé de maladies graves (143). La partie codant la sous-unité A chez ces variants présente environ 95% d'homologie avec *stx2* contre 88% seulement pour la sous-unité B. Les sous-groupes *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111* présentent entre 96,6 et 99,9% d'homologie entre eux (362).

- **La protéine codée par le variant *stx_{2e}*** possède globalement la même structure que toutes les autres shigatoxines, mais elle diffère de celles-ci par sa fixation préférentielle au récepteur Gb4 au lieu de Gb3 (200). Les souches possédant ce variant sont donc peu pathogènes pour l'homme (puisque possédant le récepteur Gb3 sur ses cellules) et sont impliquées dans la maladie de l'œdème du porc (espèce possédant à la surface de ses cellules le récepteur Gb4). Le gène *stx_{2e}* est relativement éloigné de *stx₂* puisqu'il ne possède que 94% et 78% d'identité respectivement avec les parties codant les sous-unités A et B (148). La différence de spécificité vis-à-vis du récepteur est attribuée à ces variations.

- **Le variant *stx_{2f}*** présente 70,6% et 98% d'homologie respectivement avec les parties codant les sous-unités A et B du gène *stx₂*. Cependant, de récentes études ont montré que les souches possédant *stx_{2f}* ne sont retrouvées que dans des fèces de pigeons (320, 404). Ces animaux représenteraient donc le réservoir naturel de ces souches mais il est encore difficile d'évaluer le danger lié à celles-ci pour l'homme.

- **Le variant *stx_{2g}***, mis en évidence chez une souche d'origine bovine, présente des pourcentages d'homologie compris entre 63 et 94,9% avec les gènes précédemment décrits. La comparaison des séquences de *stx_{2g}* et *stx₂* montre que la région la plus conservée correspond à celle codant la partie centrale de la sous-unité A (266). La faible prévalence des souches possédant ce variant suggère qu'il s'agit certainement de souches émergentes encore peu présentes dans les élevages. Cependant, une forte homologie de séquence en acides aminés avec les toxines produites de souches associées à des maladies humaines et une conservation des sites actifs de la protéine confèrent aux souches produisant le toxine Stx_{2g} un caractère potentiellement pathogène pour l'homme (266).

Enfin la séquence nucléotidique du variant *stx_{2NV206}*, mis en évidence chez une souche d'origine bovine, a été comparée à celles connues et montre 94,5 à 99% d'homologie avec la sous-unité A et 81,5 à 96% d'homologie pour la sous-unité B. Les séquences protéiques présentent, quant à elles, respectivement 94 à 99% et 87 à 98% d'homologie pour les sous-unités A et B (30).

c) Les récepteurs Gb3s

Les récepteurs de Stx sont les globotriosyl céramides Gb3 (galactose- α (1-4)-galactose- β (1-4)-glucosyl-céramide) trouvés sur les cellules endothéliales vasculaires humaines, les cellules

de Paneth dans la muqueuse intestinale humaine (409), à la surface des cellules épithéliales rénales (326), et au niveau du système nerveux central, expliquant les manifestations cliniques observées (diarrhée, insuffisance rénale, troubles neurologiques) (351). Le récepteur Gb3 est synthétisé dans l'appareil de Golgi des cellules eucaryotes cibles et transporté jusqu'à la membrane plasmique où il se localise dans le feuillet externe avec sa partie trisaccharidique faisant face à l'extérieur et la partie céramide de l'hydrocarbure (C-16 à C-24) dans la membrane plasmique.

La sous-unité StxB de la shigatoxine identifie spécifiquement la liaison α 1-4 du di-galactose terminal du trisaccharide. Une molécule de Stx contient 5 sous-unités B, chacune capable de lier une ou plusieurs molécules de Gb3 (278, 358). L'importance de Gb3 dans l'action des Stx est évidente, dans des études sur des animaux et en cultures cellulaires, l'absence de Gb3 élimine la réponse à Stx (3, 340).

Par ailleurs, les cytokines induiraient la production de récepteurs Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'action de Stx (137). L'absence de ces récepteurs Gb3s dans l'appareil gastro-intestinal chez les animaux peut expliquer pourquoi la colonisation d'EHEC chez les animaux est asymptomatique (370). La toxine Stx peut être retrouvée dans les cellules intestinales humaines Gb3-négative, probablement après avoir été transportée dans la cellule par macropinocytose (292).

d) Mécanisme d'action des shigatoxines

Procédé d'internalisation de la shigatoxine

La sous-unité StxB interagit avec le récepteur Gb3 et induit des invaginations de la membrane de la cellule eucaryote cible. Le complexe Stx-récepteur est internalisé et placé dans les endosomes. Au lieu d'être dirigé vers les lysosomes pour la dégradation, le complexe est transporté d'une façon rétrograde à travers l'appareil de Golgi jusqu'au réticulum endoplasmique (400).

Activation enzymatique et réponses cellulaires,

Après clivage de StxA par une protéase, l'activateur enzymatique A1 est libéré dans le cytoplasme où il exerce son effet sur les ribosomes (249) en entraînant la nécrose et la mort cellulaire (326). Les dommages des cellules endothéliales entraînent une activation de la

coagulation, l'inhibition de la fibrinolyse, l'accumulation de la fibrine et à la formation de thrombose (438). Par ailleurs, La combinaison de Stx et des lipopolysaccharides (LPS) induit l'agrégation plaquettaires et leucocytaires et une altération du tissu contribuant ainsi à un état prothrombotique (421). Les shigatoxines seraient également impliquées dans l'apoptose des cellules endothéliales par inhibition de l'expression cellulaire du facteur anti-apoptotique Mcl-1 (125). À l'intérieur des cellules intestinales humaines Gb3-negative, Stx n'empêche pas la synthèse de protéine ou n'induit pas d'apoptose (408) mais plutôt, réduit l'expression de chemokines pour supprimer les réponses inflammatoires (161).

II.2.6.5. Les facteurs d'adhésion des EHEC

a) Les fimbriae ou adhésines des EHEC

L'adhésion aux cellules épithéliales est un préalable au développement de nombreuses maladies. Cette adhésion se fait par l'intermédiaire d'un ligand bactérien appelé adhésine qui interagit avec un récepteur sur la cellule eucaryote. L'attachement initial des souches EHEC aux colonocytes reste encore mal défini. Les EHEC possèdent 16 fimbriae potentiels (281) ; cependant, ceux-ci n'ont pas été largement étudiés. Les travaux récents ont identifié un pili de type IV, « the haemorrhagic coli pilus » (478), qui est impliqué dans l'adhérence et la formation de biofilm ; certains flagelles et le « *E. coli* common pilus » pourraient également être impliqués dans l'adhésion aux cellules hôtes (123, 378).

b) L'intimine

L'intimine est une protéine d'adhésion de la membrane externe associée aux lésions d'attachement-effacement, qui est codée par le gène chromosomique *eae*. L'analyse de la partie variable C-terminale que code le gène *eae* définit au moins 29 types distincts d'intimine ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \gamma 1, \theta 1, \kappa, \delta, \epsilon 1, \epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4, \epsilon 5, \zeta 1, \zeta 3, \eta 1, \eta 2, \iota 1-A, \iota 1-B, \iota 1-C, \iota 2, \lambda, \mu, \nu, \omicron, \pi, \rho, \sigma$) (45, 152, 315). Comme avec les EPEC, l'attachement des souches EHEC aux cellules hôtes se produit par interaction entre l'intimine et le TIR (Figure 2.2). L'attachement peut également être augmenté par l'interaction de l'intimine avec la nucleoline, un récepteur à l'intimine localisé à la surface des cellules hôtes dont l'expression est augmentée par Stx2 (385). L'expression de la nucleoline augmente avec la libération de la toxine Stx favorisant l'attachement des souches EHEC sur la cellule hôte (99).

c) Le mécanisme d'attachement et d'effacement

Ce mécanisme, qui a lieu en 2 temps, l'attachement aux entérocytes puis l'effacement des microvillosités, repose sur des modifications du cytosquelette des entérocytes qui consistent essentiellement en une accumulation de microfilaments d'actine, constitutifs des microvillosités (199), microfilaments, plus ou moins dépolymérisée dans la zone apicale du cytoplasme cellulaire en contact étroit avec la bactérie. Cette accumulation de microfilaments d'actine est induite par la phosphorylation d'une protéine cellulaire Hp 90 et sa localisation est déterminée par la fixation d'une protéine bactérienne de 97 kDa (intimine) sur un récepteur cellulaire. L'attachement entre la cellule et la bactérie est alors très fort. Peu de temps après, il est observé une disparition des microvillosités : c'est l'effacement.

d) Mécanisme de formation du piédestal :

Le mécanisme de formation du piédestal par les EHEC est légèrement différent de celui des EPEC. Bien que les piédestaux eux-mêmes soient fortement semblables, la subversion de l'actine du cytosquelette de la cellule hôte est due à une protéine homologue d'EspF appelée « Tir cytoskeleton-coupling protein » (TccP ; également connu comme EspF_U) (71, 151), lié à TIR par une protéine, « insulin receptor tyrosine kinase substrate » (IRTKS ; également connu comme BAIAP2L1) (461, 468). TccP interagit avec N-WASP pour activer efficacement le complexe ARP2/3 qui intervient dans l'assemblage de l'actine. Il est important de noter que les mécanismes décrits ci-dessus pour la formation de piédestal chez les EPEC et EHEC sont classiques des souches prototypiques ; par contre les souches de la lignée 2 des EPEC et les souches non-O157 EHEC emploient une combinaison des mécanismes Nck-dépendants et Nck-indépendants (140).

II.2.6.2. Manifestations cliniques des infections à EHEC

L'infection par une souche EHEC chez l'homme peut revêtir plusieurs aspects allant du portage asymptomatique à l'infection mortelle. La manifestation clinique la plus fréquente est la colite hémorragique, évoluant parfois, en particulier chez l'enfant et le sujet âgé, vers un syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) (57, 337).

II.2.6.2.1. La colite hémorragique

Au-delà d'une diarrhée banale, Elle constitue la forme la plus fréquente des affections humaines dues aux EHEC (57). Elle survient généralement après une période d'incubation variant de 3 à 7 jours (438). Les cas de diarrhée hémorragique sont associés à des douleurs abdominales particulièrement sévères qui précèdent le plus souvent de quelques jours la survenue de la diarrhée elle-même dont le caractère hémorragique n'est pas strictement obligatoire. Ces entérocolites hémorragiques nécessitent le plus souvent une hospitalisation en raison de la sévérité des douleurs abdominales et de la grande quantité de sang émise dans les selles. Les formes non hémorragiques de gravité moindre ne sont classiquement pas dépistées. Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la suppression des apports alimentaires et de la mise en route d'une nutrition parentérale jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé du patient. A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour controversée.

Il peut survenir à la suite de cette infection, dans 5 à 10 % des cas, un syndrome hémolytique et urémique ou SHU qui constitue la deuxième grande manifestation due aux EHEC.

II.2.6.2.2. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Bien que longtemps considéré comme idiopathique, le SHU est actuellement reconnu comme « une complication d'entérocolite liée aux EHEC chez l'enfant de moins de cinq ans et chez les individus âgés ». Deux types de SHU ont été décrits. Le SHU dit typique apparaît classiquement après un épisode de diarrhée aiguë prodromique, souvent sanglante. Les symptômes associés au SHU débutent brutalement. Le SHU typique survient surtout en été, quelque fois par épidémies. Le tableau clinique est caractéristique et ne pose généralement pas de problème de diagnostic. Le SHU atypique, quant à lui, survient sans prodrome diarrhéique et sans prédominance saisonnière. Il apparaît après des symptômes respiratoires, de la fièvre ou des vomissements et son diagnostic n'est pas aussi aisé que pour la forme typique (12). Il n'est pas associé à une infection par une souche EHEC.

La manifestation clinique consiste en une atteinte rénale avec oligurie ou même anurie accompagnée d'une anémie hémolytique microangiopathique et d'une thrombopénie. La gravité de l'affection entraîne presque toujours une hospitalisation et une dialyse dans un cas sur deux.

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (277). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre une enquête Française dans laquelle 4 parmi 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996 sont décédés suite à une atteinte du système nerveux central (105).

II.2.6.2.3. Purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT)

Le PTT est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925 (59). Cette affection touche essentiellement l'adulte et se caractérise par des symptômes comparables au SHU avec des lésions rénales de moindre importance, une anémie hémolytique micro-angiopathique, une thrombocytopenie, une fièvre, une atteinte neurologique prédominante mais des signes neurologiques beaucoup plus prononcés avec des tremblements généralisés, des myoclonies ou des troubles du comportement. La découverte du lien entre l'infection par une souche EHEC et l'apparition de ce syndrome est relativement récente (244) et il semble que les EHEC ne soient pas la cause la plus fréquente des PTT (366).

La durée du PTT est habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais il peut parfois se prolonger pendant des mois. Quand la maladie progresse, elle peut toucher le système nerveux central et les reins, et leur atteinte est, dans la plupart des cas, la cause principale de la mort. Des signes neurologiques sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale.

II.2.6.3. Sources et mode de transmission des EHEC.

Ces vingt dernières années, les connaissances sur la complexité de l'épidémiologie et de l'écologie des EHEC ont évolué. Les infections à EHEC peuvent être sporadiques, se manifester en nombre réduit ou en une grande épidémie. Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources d'infections à EHEC. Ainsi, il paraît évident que *E. coli* O157:H7, et plus généralement les STEC, peuvent se transmettre par voie féco-orale et que la contamination se produit fréquemment par l'ingestion d'aliment ou d'eau souillée, par le contact direct avec les animaux, les humains porteurs, ou des objets contaminés, ou plus rarement par inhalation (100, 163, 433, 457) (**Figure 2.3**).



Figure 2.4. Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal

La principale voie de transmission est indirecte par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eau de boisson contaminés par un environnement souillé le plus souvent par les matières fécales d'animaux infectés. Aux États-Unis, les études épidémiologiques montrent que, quand la source de contamination peut être identifiée, la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec les animaux (notamment les bovins) représentent respectivement 66 %, 20 %, 12 % et 2 % des modes de contamination.

(<http://www.dangersalimentaires.com/2011/06/steaks-haches-lidl-ecoli-enfants-contamines/>)

II.2.6.3.1. Produits d'origine animale

De nombreux véhicules alimentaires de STEC ont été mis en cause au cours des différentes épidémies rapportées. Les plus fréquents sont d'origine bovine : viande de boeuf hachée ou préparation à base de viande de boeuf, rôti de boeuf. Les carcasses sont contaminées à l'abattoir lors de l'habillage, la manipulation par le personnel. Des règles d'hygiène doivent être appliquées de manière stricte à l'abattoir pour éviter la contamination des carcasses. *E. coli* O157:H7 a aussi été isolée à partir de viande de porc, de mouton, de dinde, de caribou. Certains produits laitiers ont aussi été incriminés dans la transmission de STEC : lait cru, beurre, yaourts, fromages frais ou à base de lait non pasteurisé... Une mauvaise hygiène de traite peut expliquer la contamination du lait.

II.2.6.3.2. Produits d'origine non animale

D'autres sources non animales ont été identifiées comme étant à l'origine de cas d'infection à STEC chez l'homme tel que le cidre et les jus de fruits (jus de pomme non pasteurisé), ainsi

que les légumes consommés crus ou peu cuits: laitue, jeunes pousses (radis) et graines germées (luzerne, fenugrec, ...).

L'application d'engrais et de fumier sur les productions végétales est souvent à l'origine de la contamination. Le respect de règles d'hygiène simples est primordial dans la lutte contre ces infections. D'autres sources non alimentaires peuvent également être incriminées.

II.2.6.3.3. Absorption d'eau contaminée

La contamination des réseaux de distribution d'eau potable a été évoquée lors de plusieurs investigations d'épidémie ou de cas isolés. Suite à une épidémie de diarrhée hémorragique à *E. coli* O157 survenue au Swaziland en 1982, Effler et ses collaborateurs (121), se sont penchés sur les facteurs de risque et les circonstances d'apparition de l'épidémie. Il apparaît, dans cette étude rétrospective, que le pic de cas de diarrhée hémorragique est survenu concomitamment à une période de fortes pluies. Ces pluies faisaient suite à une sécheresse prolongée pendant laquelle les zones de pâtures des troupeaux de bovins porteurs d'*E. coli* s'étaient rapprochées des points d'eau. Ainsi, La sécheresse, le portage animal d'*E. coli* et la contamination de la ressource en eau par des fécès de bovins après de fortes pluies ont selon toute vraisemblance provoqué l'épidémie.

Licence *et al.* (270) rapportent une épidémie à *E. coli* O157:H7 où la même souche a été isolée chez les personnes infectées, dans l'eau d'une source privée et chez des animaux présents à proximité de la source. Etant donné la faible dose infectieuse de *E. coli* O157:H7, le risque lié à la consommation d'une eau de source privée qui ne répond qu'aux normes concernant les germes d'indication de contamination fécale peut être significatif. La présence de *E. coli* O157:H7 peut être sous-estimée si des tests spécifiques ne sont pas pratiqués.

En effet, rappelons ici qu'*E. coli* O157:H7 ne cultive pas à 44°C et n'est donc pas dénombré avec les coliformes. Vernozy-Rozand *et al.* (458) rappellent que la première épidémie rapportée de *E. coli* O157:H7 impliquant deux cas humains était certainement liée à l'eau. La consommation d'eau de puits, d'eau de sources privées et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés et d'épidémies. L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignade ou dans une piscine a aussi été mise en cause. La contamination par des matières fécales bovines, humaines ou des boues de stations d'épuration est toujours en cause.

II.2.6.3.4. Contact avec des animaux de ferme et leur environnement

Le contact direct avec des animaux de ferme ou avec leurs déjections peut être à l'origine de cas isolés, sporadiques ou d'épidémies. En Suède, en 1997, une exploitation laitière a été impliquée dans un cas d'infection à STEC. La même souche a été isolée sur un échantillon fécal de la personne malade et des bovins. La visite occasionnelle de fermes a été associée à de nombreux cas d'infections sporadiques à O157 en Angleterre (335). Le risque est notable chez les personnes qui sont en contact non régulier avec une ferme ou son environnement, que ce soit pour une visite occasionnelle, des vacances, des visites professionnelles.

II.2.6.3.5. Transmission inter-humaine

Ce mode de transmission peut intervenir en milieu familial ou en collectivités (crèches, maisons de retraite ou institutions médico-sociales), par contact avec des personnes malades. Les individus infectés sont fortement contagieux et peuvent être considérés comme un risque pour la santé publique (7). Lors d'épidémie, environ 20% des cas d'infections à *Escherichia coli* O157:H7 diagnostiqués sont le résultat de la transmission secondaire ; les taux d'une telle transmission sont particulièrement élevés dans les épidémies qui affectent des enfants avec un âge médian de moins de 6 ans (414).

La dose infectante d' EHEC O157 chez l'homme a été estimée de 4 à 24 bactéries, ce qui est similaire à *Shigella sp.*(426).

II.2.6.4. Réservoir animal

Les ruminants ont été identifiés comme le principal réservoir des STEC O157:H7 et non-O157. Des souches STEC ont été isolées chez les bovins, les moutons, les chèvres, et occasionnellement chez d'autres animaux domestiques et sauvages, cependant, il semble que la présence des STEC chez ces animaux soit transitoire, acquis par la nourriture ou l'eau souillée par les fèces des ruminants. Dans tous les cas, ces animaux peuvent être des vecteurs de l'infection pour les humains.

II.2.6.4.1. Les ruminants domestiques

Le principal réservoir animal est représenté par les ruminants domestiques particulièrement les bovins (172) et, à un moindre degré, les moutons et probablement les chèvres (250). Les

bovins sont la principale source des infections humaines (viande de bœuf hachée, produits laitiers, contamination fécale des végétaux et de l'eau) par les souches STEC O157 ou non-O157. Ces souches STEC ne sont pas pathogènes chez les ruminants, exceptés quand les infections se produisent chez de jeunes animaux avant le sevrage pouvant entraîner des cas de diarrhée néonatale (42, 172).

Une étude portant sur la prévalence des STEC O157 et non-O157 dans des cheptels bovins a montré que la prévalence de STEC O157 était de 0.3-19.7% dans les parcs d'engraissement et de 0.7-27.3% sur le pâturage, tandis que la prévalence de non-O157 était 4.6-55.9% et 4.7-44.8%, respectivement (194). Une autre étude évaluant la prévalence des STEC dans les fèces des bovins laitiers a également montré des éventails de taux de prévalence qui sont de 0.2-48.8% pour O157 et de 0.4-74% pour les non-O157 (195). Les données sur la prévalence des STEC O157 et non-O157 varient considérablement en fonction des cheptels laitiers (0.4-74%) et des bovins à viande (2.1-70.1%) suivant différents pays (317). Environ plus de 435 sérotypes de STEC ont été retrouvés chez les bovins. Sur les 470 sérotypes rapportés chez les humains (34, 36, 43), la plupart provenait du bétail et plus particulièrement des bovins.

En Amérique du Nord, les bovins restent le principal réservoir de STEC. Par contre dans les pays tels que l'Australie, les moutons sont le réservoir principal de STEC.

Une étude réalisée en Allemagne montre une corrélation positive entre les infections provoquées par différents sérotypes de STEC et la densité des bovins par secteur. Ainsi, à partir des données issues de plus de 3000 cas d'infections à STEC, les analyses ont montré que le risque pour la survenue de l'infection augmente de 68% par 100 bovins additionnels/km² (144).

II.2.6.4.2. Les non ruminants

Un portage de STEC ou de souches O157 a été observé chez les porcs, les chiens, les chats, les chevaux et les oiseaux. Les porcs sont connus comme étant des réservoirs de STEC et peuvent être colonisés par des souches *E. coli* O157. Des porcs inoculés sont capables d'héberger les souches *E. coli* O157 pour une durée allant jusqu'à 2 mois (54). Cependant, EHEC O157:H7 est rarement trouvé chez ces animaux. Une enquête de deux ans menée dans plusieurs fermes aux Etats-Unis n'a rapporté aucun isolat (382). Aucune souche O157:H7 n'a été détectée parmi 106 souches de *E. coli* O157 isolées de porcs sains (133).

En France, 48 souches STEC isolées de porcs étaient non O157:H7, *ehx*⁻, *eae*⁻ et *stx2*⁺ (56). En Italie sur 5 souches de *E. coli* O157 isolées chez les porcs 4 étaient *stx* et *eae* négatives (56). En Suède, la prévalence de *E. coli* O157:H7 dans cinq abattoirs porcins était inférieur à 0,01% (2/2446) (124). Contrairement aux résultats précédents, une étude menée aux États-Unis sur quatre fermes de porcs montre la présence de *E. coli* O157:H7 dans 8,9% des écouvillons rectaux (109), mais l'étude n'a indiqué aucune morbidité, et les bactéries pourraient être non virulentes. Une forte présence de *E. coli* O157 a été notée dans les fèces de porc en Afrique du Sud (26,3%, 20/76), mais aucun des 20 isolats était *stx*⁺ et seuls les 5/20 étaient *eae*⁺ (21). *E. coli* O157:H7 typique a été trouvé dans 1.5% des échantillons de porc au Canada (113), 1% de carcasses de porcs en Nouvelle Zélande (473), et dans 1/50 d'échantillons de viande de porcs en Grèce (112). En Italy, pour une première fois, une épidémie d'EHEC O157 a été identifiée à la suite d'une consommation de viande et du salami de porc en Italie (94). Contrairement au bétail, les porcs peuvent être une source peu probable d'infection humaine, ceci peut être dû à leur sensibilité aux souches d'EHEC virulent, dont le traitement ou la mise en quarantaine des animaux morbides, limiterait la transmission du microbe pathogène.

Par ailleurs, une étude montre la présence de *E. coli* O157 sorbitol-négative dans 1 sur 90 des échantillons de chevaux et dans 2 sur 65 échantillons de chiens (181). Dans des circonstances facilitant la transmission d'EHEC (promiscuité et mouvements intenses) les bactéries peuvent être hébergées par les porteurs non habituels.

La souche EHEC O157:H7 est rare chez les poulets, mais fréquemment isolé chez les dindes. Au Royaume-Uni, chez des poulets (n=1000) aucune *E. coli* O157 n'a été isolé (83) de même qu'en Hollande (n=501, pool d'échantillons fécaux), cependant 1/6 des isolats de *E. coli* O157 des dindes (n=459) étaient virulents (190). Schoeni et Doyle montre que des poulets inoculés avec *E. coli* O157:H7 peuvent être colonisés et devenir des excréteurs pour une durée allant jusqu'à 11 mois (406), indiquant que la faible possibilité de transmission, plutôt que l'incompatibilité avec la cellule hôte, crée une barrière à l'infection.

II.2.6.4.3. Animaux sauvages

La faune sauvage ne constitue pas une source significative d'EHEC O157; en revanche, l'isolement sporadique des bactéries chez ces animaux reflète probablement la transmission

environnementale via des réservoirs d'humain et animaux. Les EHEC O157 ont été trouvés dans la faune autre que les cerfs (381). une analyse de fèces d'un grand nombre de ruminants et d'oiseaux sauvages (n= 2228) a montré la présence de 5 isolats de *E. coli* O157:H7 dans 0.8% d'échantillons provenant des cerfs et un isolat de *E. coli* O157 : H7 dans 0.3% des fèces d'oiseau poolés (381). En Espagne, des souches EHEC O157:H7 ont été retrouvées dans 1.5% (3/206) des cerfs rouges (elaphus de Cervus) (150). Au Missouri une contamination humaine à O157:H7 via de la saucisse de cerfs fermentée a été identifiée (8). Une prévalence de 3.3% (7/212) de souches EHEC O157:H7 a été trouvé chez les sangliers en Espagne (398).

II.2.6.5. Présence des souches EHEC dans l'environnement

La matière fécale est la principale source de contamination de l'environnement et l'apport régulier de STEC par le biais des fèces explique la persistance de ces pathogènes dans l'environnement. Les hommes et les animaux peuvent ensuite se recontaminer via le sol, les cultures, les eaux et les sédiments.

Ce risque potentiel nécessite de prendre en compte le comportement des STEC dans l'environnement. En effet, étant donné la faible dose infectieuse, toute survie ou toute croissance dans l'environnement peut avoir des conséquences majeures en termes de santé publique.

II.2.6.5.1. Dans les fèces

Le temps de survie des STEC dans les fèces varie en fonction du niveau de contamination initial, de la température de stockage, de l'activité en eau (A_w). Fukushima *et al* (145) ont étudié la survie de STEC dans des fèces de bovins artificiellement contaminés stockés à différentes températures. Les *E. coli* ont été retrouvés pendant 126 jours dans les échantillons après stockage à +15°C. La survie est plus longue pour des stockages à 5°C et 15°C qu'à 25°C.

II.2.6.5.2. Dans les fumiers et les lisiers

Les fumiers et les lisiers sont largement valorisés par épandage, ce qui est un bon moyen de recycler l'azote et le phosphore. Cependant, ces matières peuvent contenir des STEC. Ainsi, plusieurs cas d'infection ont été rapportés suite à l'ingestion de légumes fertilisés avec du fumier de bovin ou à des sources d'eau proches de champs fraîchement épandus.

Il semble que le fumier de bovins constitue un milieu favorable à la survie de ces organismes. D'après Bolton (50), les *E. coli* O157:H7 y résistent pendant plus de 20 jours à des pH < 4. Leur survie est de plusieurs mois dans le fumier et sur des prairies contaminées par du fumier.

Dans les conditions naturelles, l'élévation de température suite à la dégradation aérobie de la matière organique par les microorganismes joue un rôle important dans l'inactivation des bactéries pathogènes. L'intérêt du compostage est donc évident. Quand une température de 45°C est atteinte, les bactéries ne sont plus isolées dans le compost au bout de 3 à 4 mois (283).

Kudva *et al.* (247) montrent que les *E. coli* O157:H7 survivent plus d'un an dans du fumier d'ovins. Des actions menées au niveau de l'élevage et des pratiques d'utilisation du fumier en valorisation agricole peuvent permettre de réduire l'exposition des personnes au risque présenté par les *E. coli* O157:H7. De même, l'application de règles d'hygiène strictes dans la production de légumes consommés crus et l'utilisation d'engrais animaux est nécessaire pour réduire la contamination des légumes.

II.2.6.5.3. Sur ou dans le sol

Plusieurs facteurs entrent en jeu dans la survie et la multiplication de *E. coli* O157:H7 dans le sol. C'est le cas de la température, de l'activité en eau, de la flore de compétition... Plusieurs études ont été menées sur la capacité de survie de *E. coli* O157:H7 sur le sol. Dans l'étude de Bolton (50), des fécès de bovins contaminés (108 ufc/g) ont été déposés à la surface d'un pré. Le nombre de *E. coli* O157:H7 a diminué de 4 à 5 RD au bout de 50 jours mais les bactéries étaient encore détectables dans le sol après 99 jours. La persistance de *E. coli* O157:H7 dans le sol et dans les fécès est un facteur important dans l'infection ou la ré-infection des bovins. Jiang *et al.* (208) ont montré que des souches d'*E. coli* O157 pouvaient survivre pendant des durées de 77, 226 et 231 jours dans des échantillons de sol auxquels a été rajouté du fumier contaminé, stockés à 5, 15 et 21°C. Les facteurs contribuant à cette survie sont le ratio sol/fumier, la température du sol et la présence d'autres organismes. Dans leur étude, Natvig *et al.* (327) isolent *E. coli* O157 dans des sols 21 semaines après application de fumier soit, après la récolte des légumes. Ils recommandent de fertiliser les sols avec du fumier par temps frais en début de printemps.

La survie et la multiplication d'EHEC O157 dans un protozoaire du sol (*Acanthamoeba polyphaga*) semble être un réservoir environnemental potentiel pour la transmission (25).

II.2.6.5.4. Les eaux usées

Des souches STEC potentiellement pathogènes pourraient également être présentes dans les eaux usées des élevages ou des agglomérations urbaines. Une étude française portant sur des eaux usées urbaines naturellement contaminées a révélé la présence de souches de *E. coli* O157:H7 potentiellement pathogènes (458). Bien que les eaux usées urbaines ayant subi des traitements soient significativement moins contaminées (458), certaines souches de *E. coli* O157 semblent pouvoir survivre à certains traitements comme l'exposition aux rayons ultraviolets (418), la dessiccation (22), ou la chloration (273). Une étude réalisée sur 12 abattoirs en France montre sur une collection de 5.001 *E. coli*, 25% des échantillons étaient *stx*-positifs et *eae*-positifs ; ils ont été trouvés dans 13% et 3% des échantillons d'effluents traités et des boues respectivement ; et aucune souche STEC O157:H7 n'a été détectée parmi ces isolats (279). Ce pendant, dans cette même étude, des échantillons enrichis et analysés par IMS ont permis de détecter 31 *E. coli* O157 dont 2 STEC O157:H7 potentiellement pathogènes à l'homme. Par ailleurs, une étude montre que la probabilité de présence de *E. coli* O157:H7 des eaux usées des installations laitières était très basse après traitement (101).

II.2.7. Les « Shiga-toxin producing enteroaggregative *E. coli* » (STEAEC)

Les STEAEC sont des *Escherichia coli* producteur de shigatoxine qui ont des facteurs de virulence caractéristiques des STEC et des EAEC. Ce pathovar appartenant au sérotype O104:H4, au groupe phylogénétique B1 et à la séquence type ST678, a été identifié récemment lors de l'épidémie d'infections à EHEC en 2011 en Allemagne et en France (318). La souche épidémique avait la particularité d'avoir plusieurs facteurs de virulence et d'être résistante à un large éventail d'antibiotiques. De très rares rapports font état du sérotype O104:H4 chez les humains. Ce sérotype n'a jamais été détecté chez des animaux ou dans des aliments. Plusieurs groupes de recherche ont obtenu la séquence complète du génome à partir des isolats de la souche épidémique allemande ainsi que les séquences du génome du sérotype O104:H4 souches EAEC d'Afrique. Ces résultats suggèrent que le transfert génétique horizontal a permis l'émergence de la souche STEAEC O104:H4.

Tableau 2.1. Épidémies à EHEC survenues depuis 2006 et publiées dans la littérature internationale (adapté de (6))				
Sérogroupe/sérotype	Pays (année)	Mode de transmission	Nombre de cas	Référence
O104:H4 <i>stx2</i>	France (2011)	Alimentaire (graines germées de fenugrec)	15	(153)
O104:H4 <i>stx2</i>	Allemagne (2011)	Alimentaire (graines germées de fenugrec)	3816	(138)
O145:H28 <i>stx1 eae</i>	Norvège (2009)	Personne à personne (crèche)	16	(462)
O157	Angleterre (2009)	Contact avec des animaux de ferme (ferme pédagogique)	36	(6)
O157: H- <i>stx1 stx2 eae</i>	Pays-Bas (2008-2009)	Alimentaire (viande de boeuf crue)	20	(6)
O157	États-Unis (2008)	Alimentaire (viande de boeuf)	99	(80)
O111	États-Unis (2008)	Alimentaire (aliment non précisé)	341	(68)
O157:H-	États-Unis (2008)	Alimentaire (lait cru)	14	(166)
O157:H-	États-Unis (2007)	Contact avec des animaux de ferme (ferme pédagogique)	7	(6)
O157:H- <i>stx1 stx2 eae</i>	Pays-Bas ; Islande (2007)	Alimentaire (salade verte)	50	(6)
O26:H11 <i>stx1 stx2 eae</i>	Danemark (2007)	Alimentaire (saucisse de viande bovine biologique)	20	(6)
O26 <i>stx2 eae</i> / O145 <i>stx1 eae</i>	Belgique (2007)	Alimentaire (glace au lait pasteurisé)	12	(6)
O157 <i>stx1 stx2</i>	Angleterre (2007)	Alimentaire (sandwich au poulet et herbes)	12	(6)
O157:H7 <i>stx2</i>	États-Unis (2006)	Alimentaire (salade verte)	77	(416)
O157:H7 <i>stx1 stx2</i>	Japon (2006)	Contact avec des animaux de ferme (ferme laitière)	4	(6)
O157:H7 <i>stx2</i>	États-Unis (2006)	Alimentaire (épinards)	205	(6)
O103 <i>stx1</i>	Japon (2006)	Personne à personne (crèche)	8	(6)
O103:H25 <i>stx2</i>	Norvège (2006)	Alimentaire (saucisse de viande ovine)	17	(6)
O26:H11 <i>stx1</i>	Japon (2006)	Personne à personne (crèche)	6	(6)

II.3. Les *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC)

Les souches ExPEC se caractérisent par leur pouvoir de coloniser d'autres systèmes en dehors du système gastro-intestinal (388) et elles représentent un risque sanitaire plus élevé que celui des *E. coli* pathogènes intestinales. Ce groupe comprend les *E. coli* uropathogènes (UPEC) responsables d'infections urinaires (cystites, pyélonéphrites), les *E. coli* associées à des méningites et des septicémies (neonatal meningitis *E. coli* ou NMEC) ainsi que le pathovar aviaire « *Avian Pathogenic E. coli* » (APEC).

Les UPEC sont les bactéries les plus impliquées dans les infections du tractus urinaire (ITU) (70% des cas). Les infections urinaires sont très fréquentes, environ 150 millions de cas par an dans le monde (422) dont près de 2 millions en France, représentant ainsi une préoccupation de Santé Publique (446).

A côté des UPEC, les NMEC sont la première cause de méningites (465). Le processus infectieux se fait en plusieurs étapes, de la colonisation et l'invasion des muqueuses jusqu'à la traversée de la barrière hémato-méningée. Les NMEC sont protégées du système immunitaire de l'hôte par une capsule de type K1. L'invasion des macrophages conduit à une niche de réplication pour les bactéries qui pourront par la suite traverser la barrière hémato-méningée afin d'atteindre le système nerveux central.

Ainsi, le pouvoir pathogène des ExPEC est caractérisé par de nombreux facteurs de virulence principalement codés par des gènes se trouvant dans des « pathogenicity islands » (PAIs). Ces facteurs de virulence codent des systèmes de captation du fer, des adhésines, les antigènes de capsules et des toxines (**Figure 2.5**).

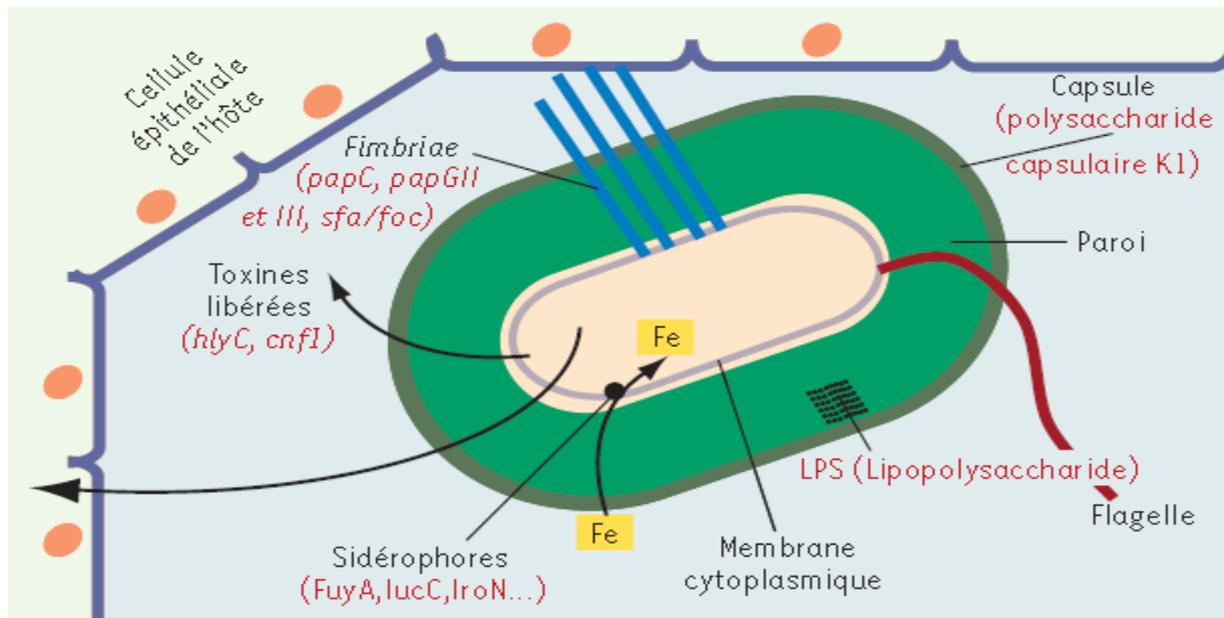


Figure 2.5. Principaux facteurs de virulence impliqués dans le développement des processus infectieux chez les ExPEC
D'après (205)

II.3.1. Les facteurs de virulence des ExPEC

Les ExPEC s'opposent aux bactéries pathogènes intestinales par la possession de facteurs de virulence qui leur sont propres (210). Les ExPEC sont distribués principalement dans le

groupe phylogénétique B2, et dans une moindre mesure dans le groupe D. La virulence des souches ExPEC est un processus basé sur de multiples facteurs génétiques, c'est la combinaison de plusieurs de ces facteurs de virulence qui confère le niveau de virulence à chaque souche. La définition des facteurs de virulence et la compréhension des mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène des ExPEC sont des préalables indispensables pour l'évaluation du risque pour la santé publique liés à l'existence de ces pathogènes, en particulier dans l'environnement.

II.3.1.1. Les facteurs de colonisation des muqueuses

La première étape des infections par les ExPEC est la colonisation des surfaces de l'hôte, c'est-à-dire les muqueuses et la peau. L'adhésion de ces bactéries aux muqueuses est médiée par des structures présentes à la surface de la cellule bactérienne, appelées adhésines, qui interagissent avec des composants présents à la surface de la cellule eucaryote ou à hauteur de la matrice extra-cellulaire, appelés récepteurs. Aujourd'hui des dizaines d'adhésines bactériennes sont connues (291).

II.3.1.1.1. Les fimbriae de type 1

Les *fimbriae* de type 1 sont constituées d'environ 100 sous unités protéiques (238). Elles sont codées par un cluster de 9 gènes ; FimA est la sous unité principale alors que FimH est située à la partie terminale (**Figure 2.6**). Il a été démontré que l'adhésine FimH (codée par le gène *fimH*) présente à la partie terminale de la fimbriae est responsable de la spécificité pour les récepteurs de type mannose portés par les cellules hôtes (246).

Les preuves de son implication dans l'étape d'adhésion lors d'une ITU sont nombreuses. Tout d'abord, il a été démontré lors d'une manipulation *in vitro* que la capacité d'*E. coli* isolées à partir de patients atteints d'ITU à adhérer à des cellules épithéliales humaine du tractus urinaire était due à la présence de pili de type 1 (120). Dans un modèle murin *in vivo*, l'injection d'un vaccin anti-FimH empêchait à 99% la colonisation de la vessie par des *E. coli* ; preuve de l'implication de *fimH* dans l'étape d'adhésion (259). Enfin plus récemment, deux études brésiliennes ont mis en évidence respectivement que 95% et 97,5% des souches d'*E. coli* isolées de patients septicémiques et atteints de cystite détenaient le gène *fimH* (13, 444). Cependant il est estimé que 50 à 70% des *E. coli* sont porteuses du cluster de gènes pour la production du pili de type 1 et qu'elles serviraient également à l'adhésion au mucus intestinal

(238). Il semblerait que les fimbriae de type 1 soient indispensables au processus d'adhérence lors des ITU mais compte tenu du fait que de nombreuses bactéries commensales le portent *fimH* ne constitue pas un marqueur spécifique des souches uropathogènes.

II.3.1.1.2. Les fimbriae de type P

Les P fimbriae sont morphologiquement très proches des fimbriae de type 1 (193). Elles sont codées par l'opéron *pap* et ce sont des hétéropolymères composés notamment d'une sous unité principale *papA* (codée par *papA*) dont il existe de nombreux variants (**Figure 2.6**). En revanche *papG* code pour la sous unité placée en extrémité du pili et impliquée dans la reconnaissance spécifique des récepteurs de type galabiose de l'hôte (272). Il existe des preuves de l'implication de *pap* dans le développement d'ITU. Une étude a mis en évidence que 80% des souches responsables de pyélonéphrites exprimaient *papG* (442). Dans cette même étude, il a été démontré que les fimbriae P permettaient d'échapper à l'action des neutrophiles mobilisés lors des infections et que cette action était due à *papG* (442). Enfin, il existe trois allèles (variants) pour le gène *papG* et il a été démontré que l'allèle III prédomine chez les patients atteints de cystite (il s'agit du variant qui a le plus d'affinité pour les récepteurs portés par les cellules de la vessie) alors que l'allèle II se retrouve majoritairement chez ceux atteints de pyélonéphrite (affinité pour les récepteurs portés par les cellules épithéliales du rein) (128). Dans les deux études brésiliennes citées précédemment 81% (allèles II+III) des souches isolées chez les patients septicémiques et 33% (allèles II+III) des souches isolées chez les patients atteints de cystite exprimaient le gène *papG* (13, 444).

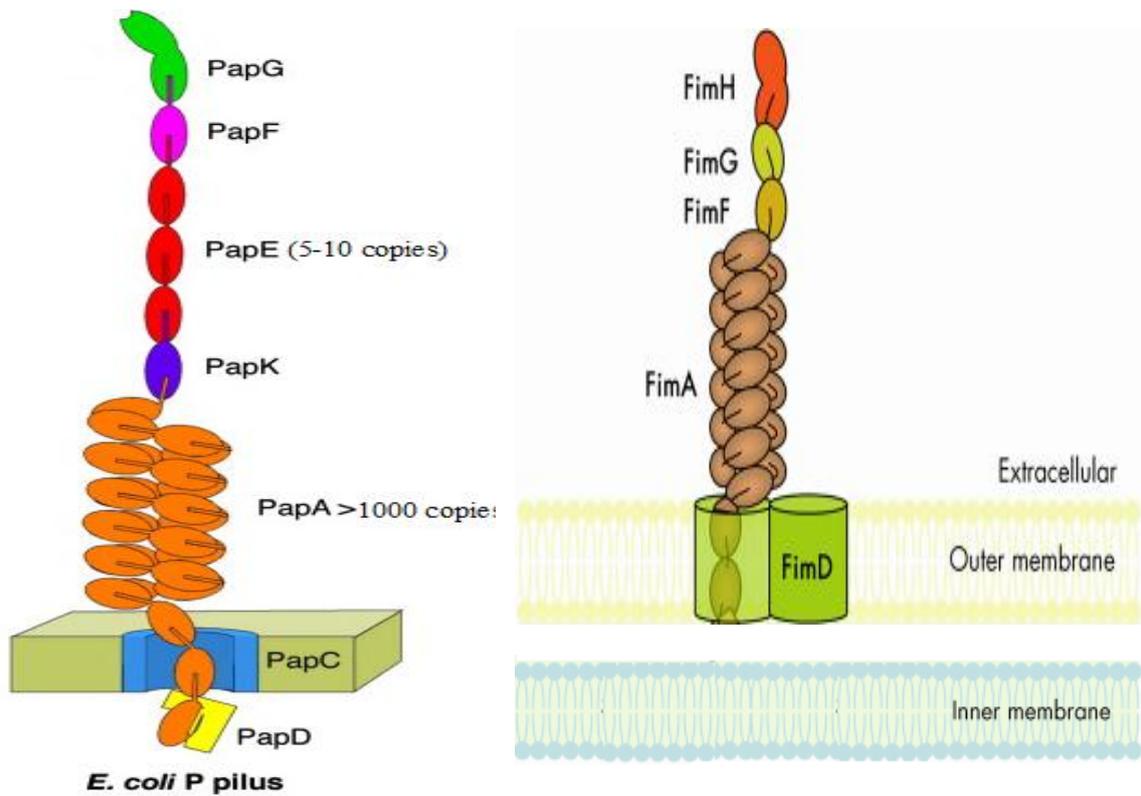


Figure 2.6. Structure des fimbriae de type 1 et des fimbriae de type P

Modifiée de (394) et (162)

II.3.1.1.3. Les fimbriae de types S et F1C

Les S *fimbriae* ont été observées parmi des souches responsables de pyélonéphrites et reconnaissent les récepteurs à acide neuraminique (347). Tout comme les autres types de fimbriae, elles sont composées de différentes sous unités codées par un cluster de gènes *sfa*. *sfaA* est la sous unité principale, *sfaG* et *H* sont les sous unité mineures et *sfaS* est la sous unité distale impliquée dans la reconnaissance des récepteurs hôtes (174). Dans une étude de prévalence, il a été démontré que 50% de souches uropathogènes humaines et animales exprimaient *sfa* (129). Dans l'étude brésilienne, environ 30% des souches isolées de patients atteints de cystite exprimaient ce même gène (444). Il est estimé qu'environ 20% des souches uropathogènes expriment des *fimbriae* de type S et que ces *fimbriae* sont plus associées aux souches bactériémiques (288). Les *fimbriae* F1C sont de structure analogue aux *fimbriae* de type 1 ; ce sont des polymères d'environ 1µm de long (237). C'est le cluster de gènes *foc* qui code pour ces dernières. Six gènes différents codent pour sa formation ; *focA* est la sous-unité principale *focC* et *D* sont impliquées dans le transport et *focG* est la sous-unité distale

impliquée dans la reconnaissance des récepteurs lactosyl-céramide (237, 383). Il est important de préciser que *foc* partage un haut degré d'homologie avec *sfa* au niveau génétique. Ces deux clusters de gènes sont d'ailleurs souvent associés. Dans la même étude de prévalence que citée précédemment, 50% de souches uropathogènes humaines et animales exprimaient *foc* (129). Par ailleurs, une étude réalisée par Picard (361) a montré que les souches uropathogènes exprimant les gènes *sfa* et *foc* appartiennent strictement au groupe phylogénétique B2.

II.3.1.1.4. Les adhésines afimbriales et Dr

Les adhésines afimbriales AFAI pèsent 16 kDa et sont codées par un cluster de 5 gènes *afa* (A à E) (253). De plus il existe au moins quatre autres opérons *afa* 1 à 4 codant pour AFA 1 à 4 ; AFA 1 et 3 appartenant à la famille des adhésines Dr (*afa/dr*). Nowicki (332) avait proposé 13 adhésines de la famille des adhésines *afa/Dr* dont les adhésines trouvées chez les humains : AfaE-I, AfaE-II, AfaE-III, AfaE-V, Dr, Dr-II, F1845, Nfa-I, AAF-I, AAF-II, et AAF-III, celles trouvées chez les bovins : AfaE-VII et les adhésines retrouvées aussi bien chez les humains que chez les animaux : AfaE-VIII.

Un opéron de cinq gènes (*draA* à *E*) code pour les adhésines Dr et *draE* est impliqué dans la reconnaissance des récepteurs DAF (Decay accelerating factor) qui sont des glycoprotéines membranaires dont le rôle est de réguler la cascade du complément (236). Dans l'étude d'Ewers 6% des souches uropathogènes exprimaient ce gène ce qui est peu par rapport aux autres fimbriae. Cependant, seules 3% des souches responsables de méningite l'exprimaient (129).

Les adhésines sont principalement codées par des opérons de plusieurs gènes et possèdent une structure similaire. Ces opérons se trouvent pour la plupart sur le chromosome bactérien au niveau d'îlots de pathogénicité qui sont des éléments génétiques mobiles. Ils peuvent donc être transmis d'une souche à une autre par transfert horizontal de gènes (390).

Tableau.2.2. Les adhésines des ExPEC				
Adhésines	gènes	Récepteurs spécifiques des genes	Adhérence cellulaire: modèles d'infections in vitro et in vivo	Références
Type 1 fimbriae	<i>fim</i>	Mannose oligosaccharides (Mono- and Tri-mannose)	Human bladder epithelium, Chicken tracheal and gut explants, colonic and ileal enterocytes	(5, 86, 120, 251, 476)
P fimbriae	<i>pap</i>	P-blood group antigen-specific glycosphingolipids (α -D-Galp-(1-4)- β -D-Galp)	Human kidney, colonic and ileal enterocytes	(5, 241, 248)
Curli	<i>csg</i>	Matrix and Plasma Proteins (Fibronectin, Laminin, Plasminogen, H-Kininogen)	Chicken tracheal and gut explants	(5, 251, 341)
S fimbriae	<i>sfa</i>	Neuraminic acid (Sialyl galactosides)	Human bladder and kidney epithelium, Brain endothelium, colonic and ileal enterocytes	(5, 347, 392, 476)
FIC fimbriae	<i>foc</i>	Lactosylceramide containing glycolipids	Buccal epithelium, Collecting ducts and distal tubules of human kidney, renal tubulus cells	(24, 237, 383, 476)
Dr fimbriae	<i>dra</i>	Dr blood group antigen, Decay accelerating factor (DAF)	Basement membranes of human and canine kidneys, Bowman's capsule, Bladder epithelium, colonic and ileal enterocytes	(5, 236, 331)
Afimbrial adhesins	<i>afa</i>	DAF	Uroepithelial cells	(254, 476)
Temperature sensitive haemagglutinin	<i>tsh</i>	Haemoglobin, Fibronectin, Collagen IV	Chicken erythrocytes	(243, 423)

Modifié de (18)

II.3.1.2. Survie des ExPEC dans les tissus hôtes

Une fois l'étape d'adhésion effectuée, les ExPEC doivent être capables de survivre dans les tissus hôtes afin d'enclencher l'infection. Pour cela des facteurs de nutrition et de protection interviennent.

II.3.1.2.1. Les sidérophores, complexes d'acquisition du fer

Les ressources nutritives sont limitées dans la plupart des milieux biologiques et les bactéries qui s'y développent doivent donc posséder des moyens de les utiliser. L'un des éléments fondamentaux pour la croissance bactérienne est le fer et pour la croissance, les bactéries exigent une concentration cytoplasmique en fer de $\sim 10^{-6}$ M (16). En conséquence, les

bactéries pathogènes, y compris ExPEC et plus spécifiquement UPEC, ont développé des stratégies multiples pour s'approvisionner en fer à partir de la cellule hôte. Parmi ces stratégies, l'expression des systèmes d'acquisition de fer qui utilisent des siderophores (*FuYA*, *IucC*, *IroN*) qui chélatent le fer de l'environnement de la bactérie pour le transporter à l'intérieure de la bactérie. Les siderophores sont des molécules de faible poids moléculaire sécrétées par la bactérie et qui ont une affinité élevée aux ions ferriques (Fe^{+3}). Pour effectuer cette tâche, la bactérie synthétise un récepteur spécifique sur sa membrane externe. Le complexe sidérophore-fer reconnaît spécifiquement ce récepteur dans l'espace périplasmique, créant un pore permettant le passage du complexe dans le périplasme et la libération des ions ferriques (209). La limitation de la disponibilité de fer est une réaction de défense mise en place par l'hôte contre les bactéries pathogènes. De la même manière, les bactéries utilisent des siderophores pour lier et transporter le fer, les cellules eucaryotes utilisent les protéines de chélation de fer pour séquestrer le fer et le transporter hors des cellules hôtes. La transferrine, protéine de transport qui est conservée parmi des mammifères, des oiseaux, des poissons, et des amphibiens, a une affinité forte pour le fer ($K_d \sim 10^{-20}$) (135).

Cependant, la lipocaline 2 sécrétée par les polynucléaires neutrophiles activés est capable de se lier aux sidérophores pour les rendre inaccessibles aux bactéries qui les ont sécrétés (472). C'est ainsi, lorsque des bactéries possédant l'entérobactine comme seul sidérophore sont injectées dans le péritoine de souris, elles sont rapidement éliminées. En revanche, les souris dont on a détruit le gène de la lipocaline 2 (souris « knock out ») sont incapables d'éliminer les bactéries injectées dans leur péritoine. Il a été montré que les UPEC possèdent le plus souvent plusieurs sidérophores leur permettant de contourner la lipocaline. Le gène bactérien *iroA* code pour une glucosyltransférase qui peut glycosyler l'entérobactine (alors appelée salmochéline) qui ne peut plus être captée par la lipocaline 2 (**Figure 2.7**).

Le génome de la souche CFT073 de *E. coli* responsable de pyélonéphrite code 14 récepteurs extra-membranaires fixant le complexe sidérophore-fer, 3 systèmes de biosynthèse de siderophore, et un certain nombre de récepteurs putatifs TonB-dépendant qui peuvent également être impliqués dans l'acquisition de fer (51). Les gènes codant ces derniers sont fortement régulés chez la souche CFT073 pendant l'infection expérimentale de l'appareil urinaire murin (46).

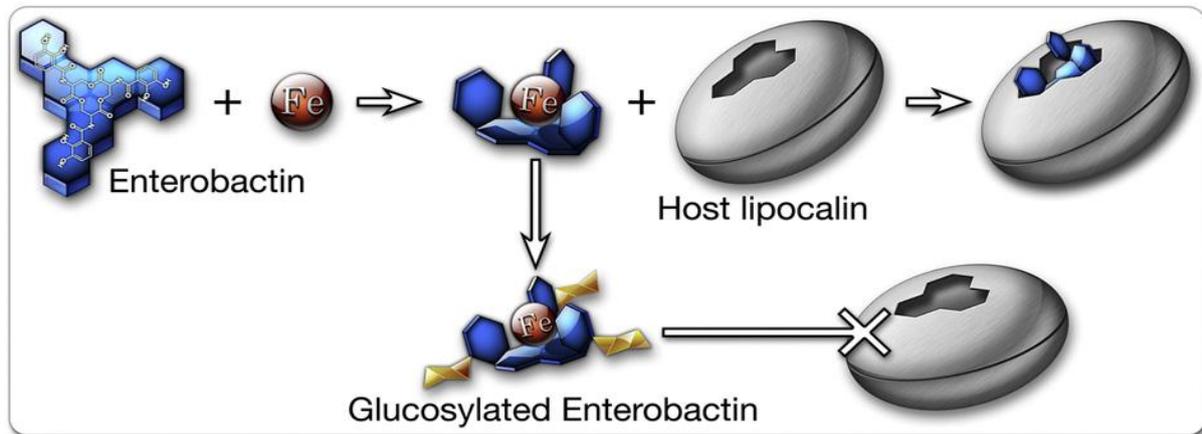


Figure 2.7. Mécanisme de compétition pour le fer entre l'entérobactine, la lipocaline 2 et la salmochéline
 Lorsque l'entérobactine est liée au fer, elle est séquestrée par la lipocaline et n'est alors plus disponible pour les bactéries qui l'ont secrétée. En revanche, la forme glycosylée de l'entérobactine, la salmochéline, ne peut être captée par la lipocaline 2 et reste donc un sidérophore efficace pour les bactéries. Adaptée de (472)

II.3.1.2.2. Les capsules, outil de protection des ExPEC

Certaines bactéries afin d'échapper à la réponse immunitaire sont capables de synthétiser les polysaccharides capsulaires K1, 2 et 3 (codées respectivement par *kpsMTI* ou *neuC*, *II* et *III*). De nombreuses études montrent que ce sont de bons marqueurs de l'uropathogénicité. Les souches ExPEC et tout particulièrement les souches « Newborn Meningitis *E. coli* » (MNEC) sont fréquemment encapsulées. Il a été montré que l'expression de la capsule K1 chez les NMEC permet à ces microbes pathogènes, d'interférer avec l'action du complément et également des bactériophages, de faciliter l'évasion bactérienne de la phagocytose et par conséquent d'augmenter la survie bactérienne dans les cellules endothéliales des vaisseaux du cerveau (10, 233, 364, 407, 455). Malgré la présence forte des antigènes somatiques spécifiques parmi certains ExPEC comme les UPEC, l'antigène O45 est pareillement exprimé en pathotypes d'UPEC et de NMEC et fournit un avantage de survie chez les deux types de souches (39, 129).

Lors des phases de septicémie 82% des souches expriment *kpsMTII* contre 53% pour les souches issues des patients atteints de cystite (13, 444). Les travaux de Johnson, montrent que 80% des souches ITU expriment *kpsMTII* contre seulement 45% des souches commensales humaines (222).

II.3.1.3. Implication des toxines dans la pathogénicité des ExPEC

De nombreuses UPEC ont la propriété de synthétiser des protéines qui une fois captées ou injectées dans le cytoplasme de la cellule hôte entraineront sa mort (apoptose, lyse ou nécrose). Parmi les mieux étudiées, il y a le facteur cytotoxique nécrosant 1 (codé par *cnf1*), un facteur de vacuolisation (*sat/vat*) et l'hémolysine a (codée par *hlyA*).

II.3.1.3.1. Facteur cytotoxique nécrosant 1 (CNF1)

CNF est une toxine découverte en 1983 par le groupe de Caprioli en Italie (75). Les toxines de type CNF comprennent une chaîne polypeptidique unique d'environ 115 kDa organisée en trois domaines (265). La région N-terminale de la protéine contient un domaine de liaison aux récepteurs cellulaires (131, 264). La partie médiane formerait un domaine central constitué par deux hélices hydrophobes pouvant initier la translocation du domaine enzymatique dans le cytosol des cellules (352). La partie carboxy-terminale contient le domaine enzymatique qui porte la triade catalytique Val833, Cys866 et His881 (64, 264, 403). Le domaine carboxy-terminal de CNF1, véritable composant enzymatique de la toxine, catalyse alors la désamidation de la glutamine 63 de Rho (ou 61 de Rac et CDC42) en acide glutamique (136). Les protéines Rho appartiennent à la super-famille des petites protéines GTPasiques Ras, régulatrices de l'homéostasie cellulaire (175). La glutamine est essentielle à l'hydrolyse du GTP et sa modification par CNF1 produit donc l'activation permanente des GTPases Rho (282) (Figure 4.5). Les protéines Rho semblent être en amont de cascades moléculaires commandant les remaniements du cytosquelette d'actine nécessaires à la phagocytose, à la migration et à la différenciation cellulaire (175).

L'activation de Rac et de CDC42 produit la formation de projections membranaires notamment impliquées dans la phagocytose de type Fcy alors que le contrôle de l'état de contraction de l'actine par Rho participe à la phagocytose de type complément (79).

Par ailleurs, CNF1 facilite la survie d'UPEC pendant la réponse inflammatoire aiguë par la modulation de la fonction des polynucléaires et par conséquent la baisse de l'activité phagocytaire. CNF peut également entrainer la mort des cellules uroépithéliales humaines par apoptose. Trois variants de CNF1 ont été caractérisés : CNF2 et CNF3 chez *E. coli*, CNFY chez *Yersinia pseudotuberculosis* (103, 342). Les gènes *cnf1* et *cnfy* sont chromosomiques, alors que *cnf2* est plasmidique (plasmide Vir) (46, 223, 276). L'essentiel

des études a porté sur le gène *cnf1*. CNF1 active la protéine de transport p21 Rho-GTP, induisant une réorganisation profonde de l'actine au niveau du cytosquelette de la cellule hôte (95). Comme son nom l'indique, l'injection intradermique de la toxine, partiellement purifiée, induit une nécrose des tissus, elle fait à ce titre partie de la famille des toxines dermonécrotiques. Les souches de *E. coli* *cnf1*+ (« Necrotoxic *E. coli* 1 » ou NTEC-1) sont issues de l'homme et de nombreuses espèces de mammifères domestiques. Ces souches NTEC-1 appartiennent majoritairement au phylogroupe B2 (52, 222). Les souches *cnf2*+ (NTEC-2) ont été isolées le plus souvent d'animaux (103, 225, 453). Récemment décrit, CNF3 n'a été mise en évidence que dans des souches d'origine animale (115). La présence du gène codant pour le CNF1 a pu être détectée chez environ un tiers des souches d'*E. coli* uropathogènes et dans certains *E. coli* de sérotype K1 impliqués dans les méningites du nouveau-né (44, 231, 256). Dans les souches uropathogènes, le gène *cnf1* est localisé dans le PAI-II (47) et est systématiquement associé à l'opéron *hly* comprenant une région intergénique entre *hlyD* et *cnf1* très conservée (*igs*).

II.3.1.3.2. Hémolysine α .

L'Hémolysine α , d'origine chromosomique est fréquente pour des souches uro-pathogènes ou responsables d'autres infections extraintestinales humaines. Elle est produite très tôt lors de la croissance bactérienne et forme des pores dans la membrane de la cellule infectée provoquant la fuite ionique puis l'éclatement de la cellule. L'hémolysine α est codée par le cluster *hly*. Les trois gènes qui codent pour le système de sécrétion de type I et la toxine sont principalement réunis dans des PAI. Elle fait partie de la famille des toxines RTX qui forment des pores au niveau de la membrane cellulaire. La toxine HlyA sécrétée par le système de sécrétion de type I, s'insère dans la membrane cellulaire et y forme un pore. Outre la destruction cellulaire, l'une des fonctions plausibles de l'hémolysine alpha est l'obtention des nutriments, libérés soit par la destruction cellulaire soit via les pores membranaires. HlyA peut aussi inhiber l'activation d'Akt (protéine kinase B) et provoquer des oscillations de la concentration de calcium intracellulaire, ce qui module la survie de la cellule hôte, la réponse inflammatoire, la prolifération et le métabolisme (173, 179, 471, 472). Des études précédentes rapportent que HlyA a été souvent associé au PAP, au Sfa, et/ou au CNF1, mais pas à AfaI (440, 479). En effet 25% des souches isolées des patients atteints de cystite expriment *hlyA* et 19% d'entre elles expriment *cnf1* (444).

II.3.1.3.3. Les toxines Sat et Vat.

Récemment, Sat (« secreted autotransporter toxin »), un facteur de virulence potentiel d'UPEC, a été identifiée comme l'est aussi Vat (« vacuolating autotransporter toxin ») qui entraînent une altération de l'épithélium rénal lors d'infections ascendantes du tractus urinaire (171). Sat, comme d'autres toxines, a été associée plus fréquemment aux isolats de pyélonéphrite qu'aux isolats fécaux (170).

II.3.1.3.4. La Colibactine.

La colibactine est une toxine codée par un îlot génomique « *pks* » pour polyketide- synthase, initialement décrit en 2006 par Nougayrède *et al.* (330). Ce composé (ou mélange de composés) n'a pas été purifié à ce jour, mais sa structure a été modélisée *in silico*. La Colibactine induit des cassures double brins de l'ADN dans plusieurs lignées cellulaires *in vitro*. Le dommage à l'ADN déclenche la « Cellular DNA-damage Response » (DDR), puis le cycle cellulaire s'arrête dans la transition G2/M et la cellule développe une mégalocytose. Les gènes marqueurs de l'îlot *pks clbA*, *clbB*, *clbN* et *clbQ* étaient significativement associés à une bactériémie, et principalement identifiés chez des bactéries du groupe phylogénétique B2 avec une virulence élevée.

D'autres toxines comme IbeA codée par *IbeA* (*invasion of the brain epithelium*) sont plutôt associées aux cas de méningites.

II.3.2. Un réservoir animal d'ExPEC

Ces dernières années, beaucoup d'efforts de recherches ont été orientés sur la possible transmission de l'animal vers l'homme des souches ExPEC. La volaille est considérée comme la principale source animale de contamination des humains par les souches ExPEC (202, 345). Les APEC (« *Avian Pathogenic E. coli* ») possèdent le plus souvent des gènes de virulence semblables à ceux d'ExPEC humain pouvant occasionner des infections chez l'homme. La contamination du porc par les souches ExPEC a été également rapportée ; cependant, peu d'études ont été entreprises jusqu'ici (201, 204, 294, 460).

II.3.2.1. Une source aviaire

Plusieurs travaux de recherche portant sur la comparaison génétique de souches humaines UPEC et NMEC avec des souches APEC ont été décrits. Ces études sont basées sur le classement dans des arbres phylogénétiques de différentes souches ExPEC isolées de cas cliniques humains et animaux par screening des principaux gènes de virulence. Des souches de *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) : *E. coli* O25:H4-B2-ST131 ont été identifiées chez un cas humain d'infection du tractus urinaire (ITU) et un échantillon de viande de poulet au Canada (460). Mora et ses collaborateurs ont également démontré la similitude par « pulsed-field gel electrophoresis » (PFGE) entre une souche *E. coli* O25:H4-B2-ST131 d'origine humaine et une souche *E. coli* O25:H4-B2-ST131 isolée chez le poulet (316).

Les souches ExPEC du groupe O11/O17/O77:K52:H18-D-ST69 dont les principaux réservoirs sont la volaille, le porc (201, 460), et plus rarement les bovins (375) ont été identifiés pour une première fois chez des patients lors d'une épidémie d'ITU aux Etats-Unis (293). Plus tard, ce groupe d'ExPEC a été isolé partout dans le monde et était fréquemment associé à des maladies humaines sporadiques (216). Plusieurs études ont confirmé que ce groupe est responsable d'environ 10% à 20% des infections humaines à *E. coli* (108, 214, 216).

La lignée de *Escherichia coli* de sequence type 117 (ST117) identifiée chez les APEC plus particulièrement O111 H4-D-ST117 a été isolée chez un humain septicémique (319). Par ailleurs, O114 H4-ST117 a également été identifié dans un cas humain d'ITU et de la viande de poulet au Canada (460).

Escherichia coli O1/O2/O18:K1:H7-B2-ST95 est un groupe clonal identifié chez les APEC (17). Une étude montre que ce groupe est responsable de maladies humaines et que 6% d'infections extraintestinales sont dues à ce groupe de pathogènes (156).

Dans le modèle animal, les isolats de *E. coli* O18-B2-ST95 de méningite du nouveau-né pourraient causer une septicémie à *E. coli* chez la volaille (321) ; réciproquement, les isolats O18-B2-ST95 des cas de colibacillose aviaire (APEC) pourraient entraîner la méningite néonatale dans un modèle de rat (445). Ainsi, les APEC et le groupe ST95 des *E. coli* associés à la méningite néonatale sont de potentiels agents de zoonoses.

A partir de 102 isolats cliniques dont 51 souches ExPEC isolées de cas cliniques humains et 39 souches APEC et quelques souches commensales, l'équipe Moulin-Schouler a bâti un arbre phylogénétique à partir de six gènes de ménage. Vingt huit souches aviaires et 25 souches humaines de groupe B2 ont été retrouvées dans une même branche témoignant d'une forte homologie génétique (321). En criblant divers facteurs de virulence ils ont démontré que les 5 gènes *iutA*, *hlyF*, *ibeA*, *fimA* et *neuC* (codant pour la capsule de protection de type K1) étaient plus fréquemment exprimés dans ce groupe que dans les autres branches ; ces facteurs de virulence se sont respectivement exprimés dans 94%, 94%, 70%, 83% et 100% de ces souches. Même si dans cette étude les souches ExPEC humaine situées dans ce cluster sont issues de patients atteints de méningite ou septicémiques, il a été démontré que les souches ExPEC pathogènes pour l'homme et les APEC portent des facteurs de virulence communs, ce qui pose la question de la transmission vers l'homme (321). Par ailleurs, dans cette même étude, l'inoculation de souches humaines appartenant à cette branche s'est avérée létale pour des poulets. Même si la transmission de l'animal vers l'homme ne peut être mise en évidence, cela montre que des souches hautement virulentes responsables d'ITU, méningites, septicémie chez l'homme ne sont pas spécifiques d'un seul hôte (à savoir l'homme) puisqu'elles ont pu être transmises à l'animal. Dans une autre étude 436 APEC, 65 UPEC et 25 NMEC toutes isolées de cas cliniques ont été sérotypées pour l'antigène O et criblées pour 33 gènes de virulence. 54% des APEC partageaient le même sérotype que les UPEC (à savoir les groupes O2, O13, O21, O78) alors que 73% d'entre eux partageaient des sérogroupes communs avec les NMEC (O1, O18).

Certaines souches APEC possèdent des gènes de virulence associés aux ITU (80% possèdent *iucD*, 83% *iroN*), souvent portés par un plasmide chez les APEC. L'étude n'a cependant pas pu mettre en évidence de grandes similitudes entre ces trois pathovars si ce n'est que les souches APEC seraient plus proches des souches NMEC par la possession de facteurs de virulence communs : comme *neuC*, *ibeA* (129). Dans d'autres études, parmi les souches APEC criblées, 51% arboraient *kpsMTII*, 40% *papGII* (128), la comparaison de souches UPEC et APEC a révélé qu'elles partageaient 20 des 37 facteurs de virulence recherchés avec une forte expression de facteurs de virulence associés à l'uropathogénicité chez les souches APEC (484). De manière générale, il semblerait que les souches APEC et UPEC partagent des sérogroupes impliqués dans les pathologies humaines (O1, O2, O8, O18) ainsi que de nombreux facteurs de virulence. Parmi ces facteurs de virulence, on retrouve les gènes codant

pour les sidérophores et l'aérobactine *iutA* et son récepteur *iroN* dont on sait qu'ils sont portés par un plasmide chez les APEC (386) ; ces gènes seraient donc facilement transmissibles d'une souche à l'autre. Les volailles semblent donc être un réservoir de souches potentiellement uropathogènes pour l'homme car elles arborent des facteurs de virulence commun parmi lesquels les fimbriae de type P, les sidérophores, la capsule de protection K2 et dans une moindre mesure les fimbriae S et F1C.

II.3.2.2. Les autres réservoirs animaux

De la même sorte, il a été mis en évidence de grandes similitudes entre souches ExPEC humaines et canines par la possession de facteurs de virulence communs comme par exemple *papGIII* (211, 213). Les preuves du potentiel zoonotique des souches ExPEC portées par les volailles, oiseaux et animaux de compagnie (chien, chat) sont relativement nombreuses. En revanche peu d'études se sont intéressées aux autres animaux d'élevage (ruminants, porcs). Il a été tout de même démontré la présence d'adhésines afimbriales de type *afa7* et *afa8* codées par les opérons *afa7* et *afa8* chez des bovins septicémiques. Par ailleurs des études épidémiologiques ont relevées des souches *afa8* positives chez des patients atteints de pyélonéphrite ; c'est ainsi qu'a été touché du doigt pour la première fois le possible potentiel zoonotique des souches ExPEC bovines (261). Dans cette même étude il a été mis en évidence que 75% des isolats responsables de septicémie et 56% de ceux responsables de pyélonéphrite possédaient le sous type *afaE8* (codant pour la sous unité distale AFAE8) (261). L'opéron *afa8* est situé sur un îlot de pathogénicité ; il est homologue à *afa1* mais contrairement à AFA1, AFA8 ne reconnaît pas les récepteurs de type DAF (il est Dr négatif) (158). En comparant des souches porteuses de *afa8* isolées de patients atteints de pyélonéphrite et d'animaux (bovins, veaux, porcs) atteints de bactériémie cette même équipe a mis en évidence d'autres facteurs de virulence communs. En effet 78% des premières contre 61% des secondes exprimaient les fimbriae de type P (opéron *pap*), 70% des premières contre 78% des secondes produisaient l'aérobactine (*iutA*) et enfin 31% des premières contre 28% des secondes exprimaient les deux toxines *hlyA* et *cnf1*. En revanche les souches animales n'ont pas de capsule de type K2 alors que 38% des souches responsables de pyélonéphrite l'expriment. Enfin il a été mis en évidence que 55% des souches humaines expriment une fimbriae de type F17/*gaf* (158). Les fimbriae de type F17 sont codées par un cluster de quatre gènes : la sous unité A étant la sous unité principale alors que G est impliquée dans la

reconnaissance des récepteurs à N acétyl glucosamine. En outre il existe plusieurs sous types de F17 : F17a et b sont associées aux maladies extraintestinales chez les bovins et les porcs alors que F17/gaf (ou encore fimbriae G) peut se trouver aussi bien chez les bovins que chez les patients atteints d'ITU. Les souches humaines et bovines ont donc certains facteurs de virulence en commun parmi lesquels AFA8, F17 qui sont souvent associés aux toxines cnf1 et hlyA.

Les souches isolées de cas cliniques humain et animal de maladies extraintestinales partagent de nombreux facteurs de virulence. De manière générale les souches humaines et aviaires possèdent des adhésines, des complexes d'acquisition du fer et des protectines communes. Les souches bovines peuvent exprimer (cas sporadiques) les toxines hlyA et cnf1 présentes chez les souches UPEC ; de plus les adhésines AFA8 et F17 d'abord trouvées chez les bovins (forte prévalence) peuvent intervenir dans les ITU humaines. L'animal pourrait donc être un réservoir de gènes de virulence de type uropathogènes et les souches ExPEC qu'ils portent pourraient avoir un potentiel zoonotique.

Les souches isolées de cas cliniques humain et animal de maladies extraintestinales partagent de nombreux facteurs de virulence. De manière générale les souches humaines et aviaires possèdent des adhésines, des complexes d'acquisition du fer et des protectines communes. Les souches bovines peuvent exprimer (cas sporadiques) les toxines hlyA et cnf1 présentes chez les souches UPEC ; de plus les adhésines AFA8 et F17 d'abord trouvées chez les bovins (forte prévalence) peuvent intervenir dans les ITU humaines. L'animal pourrait donc être un réservoir de gènes de virulence de type uropathogènes et les souches ExPEC qu'ils portent pourraient avoir un potentiel zoonotique.

Tableau 2.3. Réservoirs humain et animal des gènes associés aux ExPEC				
Famille	Principaux gènes de virulence	Homme (UPEC)	Volaille (APEC)	Ruminants Porcs
Adhésines	<i>fim</i>	+	+	+
	<i>afa/dra</i>	+	+	-
	<i>Pap</i>	+	+	+
	<i>Sfa/foc</i>	+	+	+
	<i>afa8</i>	+	-	+
	<i>f17/gaf</i>	+	-	+
Complexe d'acquisition du fer	<i>iucD, iutA, fyuA, iroN</i>	+	+	+
Toxines	<i>cnf</i>	+	-	+
	<i>hlyA</i>	+	-	+
	<i>sat</i>	+	-	?
Protectines	<i>kpsMTII</i>	+	+	-
	<i>ompT</i>	+	+	-

(+) Présence (-) absence du gène d'après (158, 303)

II.3.3. Les voies de transmission possibles des ExPEC vers l'homme

II.3.3.1 La voie alimentaire

Comme nous l'avons vu, l'apparition d'épidémies d'ITU a fait jaillir l'hypothèse d'un vecteur de souches uropathogènes. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à la recherche de souches ExPEC dans les aliments et plus particulièrement la viande. Parmi celles là, une étude a été effectuée aux Etats-Unis où 1648 échantillons de nourriture pris au hasard dans divers supermarchés, marchés, superettes bio (de différente nature : viande, légumes...) ont été analysées. En considérant qu'une souche ExPEC possède au moins 2 des 5 gènes suivants : *sfa/foc*, *afa/dr*, *iutA*, *kpsMTII* et *papA/papC* ont été dénombrés les *E.coli* totaux ainsi que les ExPEC dans ces aliments. 24% de tous les échantillons étaient contaminés par des *E.coli* avec de grandes différences par classe d'aliments : 9% pour les produits non carnés, 69% pour la viande de porc et boeuf et 92% des volailles. En outre, respectivement 4%, 19% et 46% des échantillons de produits non carnés de viande de porc et boeuf et de volaille étaient contaminés par des ExPEC. De plus 5% des souches isolées des volailles appartenaient à des sérogroupes souvent associés aux ITU (219). Cette étude fait suite à une autre similaire où 38% des échantillons de poulet recueillis dans un marché aux Etats-Unis étaient contaminés par des ExPEC (215). Il semble donc y avoir une forte prévalence d'ExPEC potentiellement pathogènes (car exhibant des antigènes O associés aux ITU et des facteurs de virulence) dans les produits carnés et plus particulièrement chez la volaille.

Enfin, en phylotypant des souches de *E. coli* de différente source au Canada (cas cliniques ITU, viande, restauration rapide) il a été montré que les isolats de poulet et ceux de restaurants étaient très proches génétiquement des isolats de cas cliniques ITU (profil génétique presque identique pour certaines souches). Il semblerait que les ExPEC retrouvés dans la viande puissent provoquer des pathologies chez l'homme (460).

II.3.3.2. La voie environnementale

Nous avons vu que l'aliment et plus particulièrement la viande semble être un vecteur potentiel de souches ExPEC pathogènes pour l'homme. Il serait donc tout à fait possible d'en retrouver dans différentes matrices environnementales. En effet une dissémination dans l'environnement via les effluents d'élevage, d'abattoir, urbains est tout à fait envisageable compte tenu du fait que ces souches sont excrétées *via* les fèces.

Une étude a analysé 308 souches *E.coli* recueillies dans une rivière et un lac dans la région de Detroit. Ainsi ils ont pu démontrer la prévalence de *E.coli* pathogènes dont les ExPEC dans des eaux urbaines, agricoles et des eaux éloignés de toute activité humaine. 42% des *E.coli* récoltées dans les eaux urbaines étaient des ExPEC (6% d'UPEC) et un nombre important a été trouvé dans un lieu relativement éloigné de zones urbaines (embouchure d'une rivière) (178). A noter que les ExPEC ont été trouvés en plus grand nombre que les autres pathovars recherchés (EHEC, EPEC, EAEC). La présence d'ExPEC dans différents écosystèmes montre que la dissémination de ces pathogènes dans l'environnement est possible même dans des zones relativement isolées (178).

Une autre étude semblable a été effectuée sur 11 échantillons issus d'effluents d'élevages de poulets, porcs, bovins et sur un effluent urbain et a montré que des marqueurs de pathogénicité ExPEC étaient présents dans environ 30% des souches isolées (390).

Chapitre 3 : LA RESISTANCE BACTERIENNE

La résistance bactérienne se définit comme la capacité de continuer à croître ou à survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant.

Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance et suivant son caractère inné ou acquis : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle est programmée sur le génome et constante à l'intérieur du taxon ; elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce. Les résistances acquises sont quant à elles consécutives à des modifications de l'équipement génétique.

III.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est essentiellement due à la présence de gènes chromosomiques ; elle est donc commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle peut être due à des particularités structurales s'opposant à l'action de l'antibiotique sur sa cible comme la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif les rendant naturellement résistantes aux antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides. Elle peut être aussi due à des particularités métaboliques spécifiques : le bacille de la tuberculose par exemple n'est sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques en raison de son métabolisme original. La résistance naturelle peut enfin être médiée par l'expression constitutive ou induite d'une enzyme d'inactivation ou par la mise en oeuvre d'un processus d'échappement vis à vis de l'antibiotique.

Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce ; elle détermine le niveau de sensibilité « basal » des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce. C'est la résistance de classe. Elle est constitutive et touche toute une famille d'antibiotiques.

III.2. Résistance acquise

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques.

L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition « de novo » de gènes de résistance exogènes.

La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'évènements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaines leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu. L'évolution des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et notamment aux β lactamines illustre parfaitement ce phénomène.

III.3. Supports génétiques de la résistance (149)

L'intérêt suscité par les enjeux liés à la résistance aux antibiotiques a mené de plus en plus de chercheurs à travailler sur le sujet, aboutissant à la découverte de nombreux mécanismes d'adaptation bactérienne. Parmi les modalités d'acquisition de la résistance aux antibiotiques, le transfert horizontal de gènes est un élément-clé. Ce type de transfert a probablement lieu dans tous les écosystèmes terrestres colonisés par les bactéries. Ainsi ces transferts ont été mis en évidence dans de nombreux écosystèmes, tels les sols, les rivières, les environnements marins, mais aussi les tubes digestifs d'insectes ou de mammifère (419). Différents éléments génétiques sont impliqués dans ce transfert de gènes.

III.3.1. Le chromosome

III.3.1.1. Résistance naturelle

Le chromosome bactérien est porteur des informations génétiques nécessaires à l'existence même de la bactérie et contient aussi les gènes responsables de sa résistance naturelle intrinsèque (liée à sa structure ou à son métabolisme). Les gènes de résistance codant pour des enzymes d'inactivation ou des systèmes d'échappement s'expriment de façon constitutive lorsqu'ils sont portés par le chromosome conférant les caractères de résistance naturelle de la bactérie.

III.3.1.2. Résistance acquise

La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation. La fréquence de ces mutations est faible et variable (10^{-6} à 10^{-9}) mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler.

La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurelle responsable de la résistance ; elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale. En absence d'antibiotiques dans le milieu exerçant une pression de sélection, la plupart des mutants naturels vont disparaître.

III.3.2. Les éléments génétiques mobiles

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégrons (28, 298, 464). Ce type de résistance est transmissible d'une souche ou d'une espèce à une autre selon trois modes de transmission, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bacteriophages) (**Figure 3.1**).

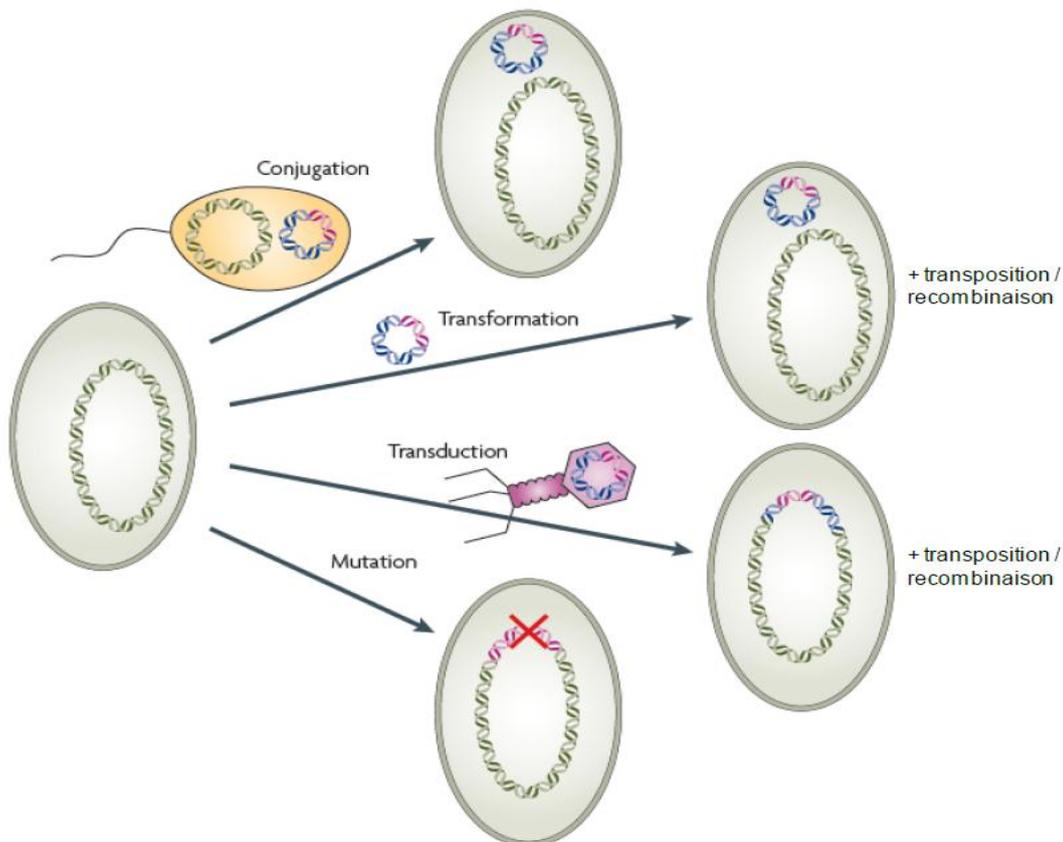


Figure 3.1. Les trois modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries.

Modifiée de (15)

III.3.2.1. Les plasmides

Les plasmides bactériens revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique. Comme les chromosomes, les plasmides codent pour des protéines et des molécules d'ARN et se répliquent durant la croissance bactérienne (415). Les plasmides partagent certaines fonctions de partition et quelques recombinaisons spécifiques de site avec le chromosome de l'hôte (415). Contrairement aux chromosomes, les plasmides ne portent toutefois pas de gènes essentiels à la croissance bactérienne. Ils codent plutôt pour des protéines dont la fonction est de conférer un avantage sélectif comme la résistance aux antibiotiques ou encore des facteurs de virulence.

III.3.2.2. Séquences d'insertion et transposons

Les séquences d'insertion, aussi appelées éléments IS, sont de courtes séquences d'ADN (0,2 à 6 kpb) qui portent uniquement le gène codant pour la protéine responsable de la transposition, la transposase, et les sites reconnus par cette enzyme. Ces sites sont des séquences inversées répétées situées à chaque extrémité de la séquence d'insertion. Généralement d'une taille de 15 à 25 pb, elles varient de manière à ce que chaque type d'IS ait des séquences inversées répétées caractéristiques. Contrairement à d'autres mécanismes qui réorganisent l'ADN, la transposition de ces éléments génétiques ne requiert pas de régions d'homologie étendues pour que la recombinaison puisse s'effectuer. Ces éléments transposables jouent un rôle très important dans l'évolution des bactéries puisqu'ils sont à l'origine de multiples réarrangements de leur génome.

Les transposons (2-20 kpb) sont composés de séquences d'ADN qui fonctionnent comme des sites de recombinaison et de gènes codants pour des protéines qui participent à la réaction de recombinaison. Les sites de recombinaison sont situés aux deux extrémités du transposon et organisés en séquences inversées répétées. La taille de ces répétitions inversées terminales varie entre ~25 et quelques centaines de paires de bases. Les sites de recombinaison ne sont pas des répétitions exactes et portent les séquences de reconnaissance des transposases.

III.3.2.3. Les intégrons

Les intégrons, plus récemment décrits vers la fin des années 80, jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment chez les bactéries à coloration de Gram négative. Aujourd'hui, alors que l'implication des intégrons

dans l'adaptation bactérienne au-delà de la résistance aux antibiotiques est avérée, le rôle d'une partie de ces intégrons, parfois nommés intégrons de résistance (IR), est majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques et notamment chez des souches d'intérêt clinique.

Les intégrons ont une organisation commune et sont composés par trois éléments clés : un gène *intI*, un site primaire de recombinaison (*attI*) et un promoteur (Pc) permettant la transcription des gènes capturés ou cassettes. Les intégrons, supports majeurs de la multi-résistance aux antibiotiques, peuvent contenir jusqu'à 8 cassettes (70, 323). Toutefois, des intégrons sans cassette ont également été retrouvés (419). Pour les intégrons de classe 1, 2 et 3, il a été montré que les cassettes étaient majoritairement composées de gènes de résistances aux β -lactamines, aminosides (gènes *aad*) et au triméthoprim (gènes *dfr*) (348, 456).

Plusieurs intégrases d'intégrons (IntI) ont été décrites chez des souches bactériennes cliniques et environnementales. Les intégrases des souches cliniques sont généralement codées par des gènes portés par des plasmides alors que celles des souches environnementales sont codées par des gènes situés sur des chromosomes.

Les intégrases appartenant aux intégrons de classe 1, 2 et 3 (19, 176, 183) de même que les intégrases VchlntIA (306) et IntI9 (191) sont les seules à être associées à des gènes de résistance aux antibiotiques.

III.4. Mécanismes de la résistance (149)

Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques est apparu rapidement après leur introduction en thérapeutique avec comme conséquence une diminution d'activité voire une inefficacité totale des molécules habituellement actives.

Aujourd'hui le risque d'échec thérapeutique, la variété des résistances, la vitesse de leur évolution ainsi que leur capacité de dissémination sont des paramètres majeurs à prendre en compte dans la lutte contre ce phénomène. Trois mécanismes essentiels président aux « stratégies de la résistance bactérienne ». Tous permettent à la bactérie de se soustraire à l'action de l'antibiotique présent dans le milieu et peuvent s'observer séparément ou de manière concomitante. Ce sont les stratégies de « désarmement, de blindage ou d'échappement », terminologie imagée parfois retrouvée dans la littérature.

Les deux premiers mécanismes tendent à diminuer l'efficacité de la molécule en minimisant sa concentration aux abords directs de la bactérie ou dans l'espace péri plasmique. Cet

objectif est rempli aussi bien par la destruction de la molécule que par la modification de structures particulières (porines) aboutissant à minimiser la pénétration de l'antibiotique ou même à le rejeter (pompes d'efflux actif).

L'échappement est obtenu par modification de la cible de l'antibiotique le rendant inopérant par défaut de substrat.

Ces principes de résistances sont communs à toutes les classes d'antibiotiques bien que les enzymes ou les structures mises en oeuvre soient spécifiques pour chaque famille de molécule

III.4.1. Désarmement

Le désarmement consiste en la destruction de la molécule ou en son inactivation supprimant ainsi l'interaction avec sa cible. C'est l'expression d'enzymes spécifiques d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques qui permet leur destruction ou leur modification. Ce mode de résistance est très répandu dans le monde bactérien et touche essentiellement deux familles d'antibiotiques majeures que sont les lactamines (lactamases) et les aminosides (aminoside-O-phosphotransférases (APH), aminoside-O-nucléotidyltransférases (ANT), aminoside-N-acétyltransférases (AAC)).

III.4.2. Blindage

Le blindage permet de soustraire la cible de l'antibiotique à son action sans détruire la molécule mais en diminuant sa concentration aux abords direct de la cible.

Deux mécanismes principaux permettent d'atteindre ce but :

III.4.2.1. La diminution de perméabilité

L'imperméabilisation est un phénomène observé chez les bactéries à coloration de Gram négative. La structure même de leur paroi et plus particulièrement la présence d'éléments dédiés à la pénétration de molécules exogènes est à l'origine de ce type de résistance. La perméabilité membranaire intervient dans le contrôle de la concentration de différentes classes d'antibiotiques comme les β -lactamines ou les quinolones *via* l'expression des porines ou des transporteurs-pompes (182, 328).

Les structures en cause sont les porines (Omp ou Opr) qui sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques (**Figure 3.2**). Le dysfonctionnement ou la perte de l'une d'entre elles peut entraîner une augmentation de CMI d'un facteur 4 à 8 de divers antibiotiques comme β -lactamines, acide nalidixique (NA), triméthoprim (TMP), fosfomycine, tétracycline (TE) ou encore chloramphénicol (C).

La régulation rapide de l'expression de la porine d'*E. aerogenes* a été montrée chez un patient traité par l'imipénème. La prise de cet antibiotique s'accompagne de la disparition de la porine associée à la résistance de la souche aux β -lactamines, alors que l'arrêt du traitement entraîne sa réapparition chez la bactérie, redevenue sensible (55). Dans plusieurs bactéries, la disparition des porines fait intervenir l'opéron *mar*, qui, via le petit ARN antisens *micF*, déstabilise l'ARNm de la porine et ce, conjointement à l'expression des pompes d'efflux (9, 106). Le système d'osmorégulation à deux composants *ompR-envZ*, qui règle l'expression de OmpC-OmpF chez *E. coli* (369), pourrait également jouer un rôle dans des isolats résistants.

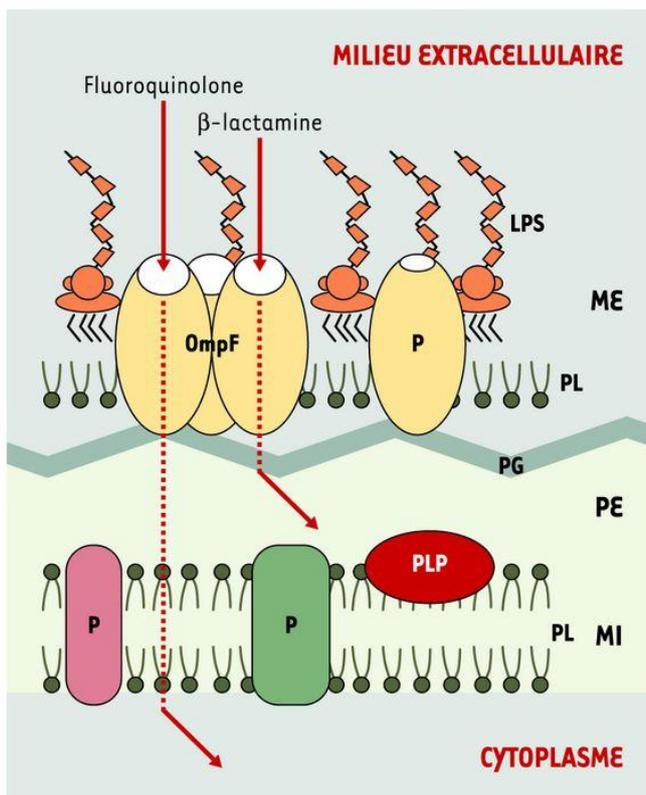


Figure 3.2. Enveloppe de *Escherichia coli*

L'enveloppe des bactéries à coloration de Gram négative comprend deux membranes: la membrane interne (MI) et la membrane externe (ME) séparées par le périplasme (PE). La membrane interne est un double feuillet phospholipidique contenant diverses protéines (transporteurs, enzymes...). La membrane externe est une bicouche asymétrique constituée du lipopolysaccharide (LPS) et de phospholipides (PL) où s'insèrent de nombreuses protéines. Cette représentation simplifie la barrière que constitue la membrane externe pour les molécules hydrophiles (ici, β -lactamine ou fluoroquinolone) qui utilisent la porine OmpF.

P: protéines; PG: peptidoglycane; PLP: protéine de liaison aux pénicillines (d'après (346))

La diffusion est fonction de la charge, de la masse moléculaire et de la polarité des molécules. Toute modification du nombre ou de la structure de ces porines affecte la pénétration des antibiotiques et donc leur efficacité en modifiant leur concentration au site d'action. Les antibiotiques touchés diffèrent selon la porine absente ou modifiée ; une mutation modifiant la structure des porine affecte le type d'élément pouvant la traverser tandis que la diminution du nombre de porines incluses dans la paroi limite l'importance du flux les traversant.

III.4.2.2. Efflux actif

Les systèmes d'efflux actifs sont constitués de protéines transmembranaires capables de transporter activement du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur une variété de substrats suivant le type de pompe impliquée. Ces systèmes sont plus ou moins spécifiques et sont classés en cinq grandes familles en fonction de leur structure en acides aminés et de l'énergie utilisée pour le transport. Cette énergie peut provenir de l'hydrolyse de l'ATP ou d'un gradient électrochimique membranaire couplé à un système d'antiport.

On note que si la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative s'oppose à la pénétration de grosses molécules ou de molécules hydrophobes nocives, elle constitue également un obstacle pour les systèmes d'efflux de ces bactéries.

Les systèmes de type RDS dont la spécificité est variable suivant le type jouent un rôle particulier chez les bactéries à coloration de Gram négative. Ces systèmes complexes à trois composants permettent le rejet des molécules depuis l'espace péri plasmique ou cytoplasmique vers le milieu extérieur. Ils sont composés d'une protéine d'efflux cytoplasmique, d'une protéine de fusion membranaire et d'une protéine de membrane externe.

La protéine d'efflux enchâssée dans la membrane interne est responsable de la prise en charge du substrat et constitue l'élément de pompage actif du système en couplant l'entrée de proton à l'évacuation du toxique. Les autres parties jouent essentiellement le rôle de canaux permettant d'évacuer les substrats vers le milieu extérieur.

Ces complexes protéiques sont plus ou moins spécifiques d'un substrat ou d'un groupe de molécules de structure similaire. Le complexe AcrAB-TolC retrouvé chez *E.coli* est capable de prendre en charge une grande variété d'antibiotiques (β -lactamines, quinolones, tétracyclines entre autres), MexAB-OprM est plus spécifiquement impliqué dans la résistance aux carbapénèmes de certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* (371). Dans tous les cas

le résultat est une diminution de la concentration de l'antibiotique au contact de sa cible et la perte de l'effet toxique sur le germe.

III.4.3. Camouflage

Le mécanisme de la résistance par « camouflage » se manifeste par une diminution de l'affinité entre la cible et son antibiotique consécutive à la modification de ladite cible (255, 299). Ce mode de résistance touche plusieurs classes d'antibiotiques et notamment les β -lactamines, les quinolones et les macrolides respectivement par modification des protéines liant les pénicillines ou PLPs, des gyrases ou des ribosomes bactériens.

Il s'agit là d'une résistance par échappement puisque l'antibiotique n'est ni soustrait ni détruit mais simplement rendu inefficace. Ce type de résistance est à l'origine de problèmes majeurs en bactériologie clinique en particulier pour certains germes à coloration de Gram positive (pneumocoque, entérocoque).

III.4.4. L'induction de résistance

La résistance est dite « résistance inductible » lorsque la présence de l'antibiotique est nécessaire à l'expression de cette résistance. Bien qu'inductible, la résistance peut être considérée comme naturelle si son expression est constante ; il est à noter que certaines résistances acquises peuvent également nécessiter une induction pour s'exprimer.

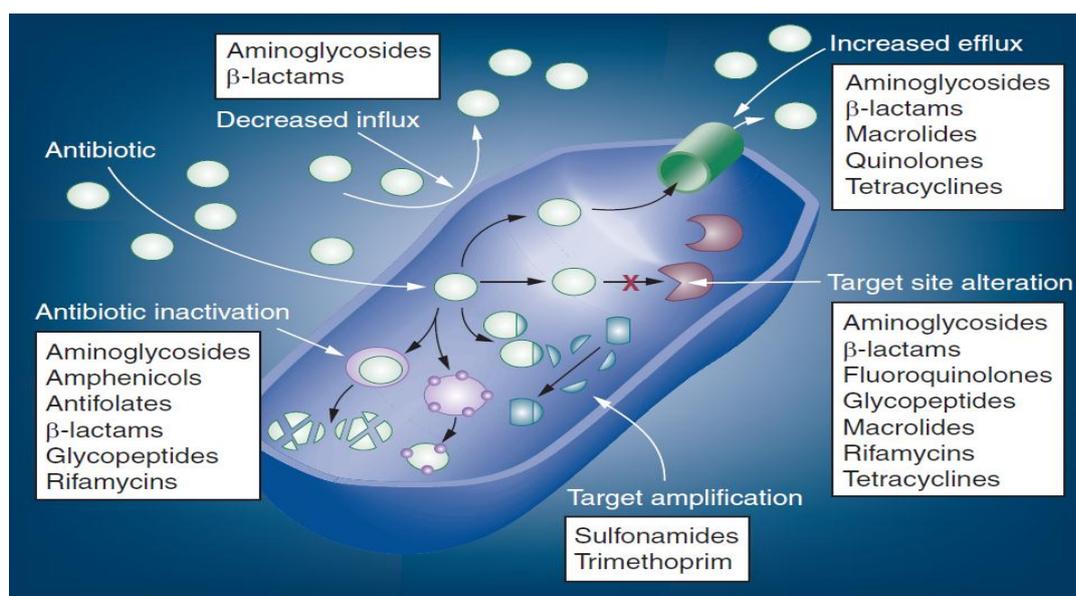


Figure 3.3. Présentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques par les bactéries
D'après (405)

III.5. Le cas des β -lactamines

Les différents mécanismes de résistance aux β -lactamines peuvent s'exprimer seuls ou de façon concomitante agissant alors de façon synergique. Il peut s'agir d'une diminution d'affinité de la cible, d'une diminution de la perméabilité de la membrane, de l'expression d'une pompe d'efflux actif ou de la production d'enzyme de type lactamase (**Figure 3.3**).

III.5.1. Modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP)

Ces PLP modifiées présentent une affinité plus faible pour les β -lactamines. Elles sont relativement résistantes à l'inactivation par les pénicillines et sont capables de remplir les fonctions des PLP lorsque ces dernières sont inactivées. Ce mécanisme de résistance est majeur pour les bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et les entérocoques (482).

III.5.2. Systèmes d'efflux actif

Les systèmes d'efflux éliminent activement les β -lactamines dans le milieu extérieur en utilisant la force proton-motrice. Ainsi, ils diminuent la concentration d'antibiotique au contact de sa cible et donc son efficacité. Ce type de mécanisme de résistance a été mis en évidence chez *Pseudomonas aeruginosa* (269, 367).

III.5.3. Production de β -lactamases

C'est le mécanisme qui nous intéresse le plus dans notre étude. Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent la fonction amine du cycle β -lactamine et qui rendent l'antibiotique inactif avant qu'il n'atteigne sa cible : les « protéines de liaison à la pénicilline » (PLP). La parenté structurale que les β -lactamases partagent avec les PLP leur permet de lier, acétyler et hydrolyser donc inactiver les β -lactamines (300). Les β -lactamases sont exportées dans le milieu extracellulaire (bactéries à coloration de Gram positive telles que *Staphylococcus aureus*) ou périplasmiques (bactéries à coloration de Gram négative). Plus de 500 β -lactamases ont été répertoriées (23). La destruction des β -lactamines par les β -lactamases est le mécanisme de résistance majeur des bactéries à coloration de Gram négative. Afin d'augmenter son taux d'hydrolyse, une cellule peut exprimer le gène de la β -lactamase sous le contrôle d'un promoteur fort, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse de l'enzyme (420). La dissémination de ces caractères de résistance représente un

risque accru pour la population. Les gènes de résistance sont souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles, *e.g.* des plasmides et des transposons, et le transfert de ce matériel chez les bactéries n'est pas limité à une espèce en particulier (27).

Finalement, afin d'acquérir un large spectre de résistance contre une multitude d'antibiotiques, certaines souches expriment différentes β -lactamases, chacune avec une spécificité qui leur est caractéristique. Ainsi, il n'est pas rare que l'identification d'isolats cliniques révèle non seulement la présence d'une β -lactamase chromosomique spécifique à la souche, mais aussi de plusieurs enzymes plasmidiques, dont parfois à large spectre d'action (extended-spectrum β -lactamases, BLSE) (11, 466).

III.5.4. Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines à l'exception des céphamycines (céfoxitine, céfotétan) du moxalactam et des carbapénèmes. La capacité d'inactivation des céphalosporines de troisième génération et notamment des oximino-céphalosporines (ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime) est surtout associée à une inhibition par les inhibiteurs de bêta-lactamases et est à la base de leur détection en laboratoire.

Les premières BLSE dérivait des pénicillinases de type TEM ou SHV-1 par mutation ponctuelle. Plus récemment, de nouvelles BLSE non dérivées des pénicillinases ont émergé : les céfotaximases de type CTX-M et les ceftazidimases de type PER, GES et VEB. Elles sont inhibées partiellement par les inhibiteurs de bêta-lactamase (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam), et portées par des plasmides conjugatifs, donc transférables. Les premières BLSE ont été mises en évidence en Allemagne et en France en 1984 (359). La présence de bêta-lactamase à spectre étendu a été signalée ensuite dans le monde entier, chez des patients hospitalisés et chez des animaux, en corrélation avec une importante utilisation des céphalosporines de troisième génération (C3G) en médecine humaine et animale et avec la nature plasmidique des BLSE (239, 359). La distribution des espèces bactériennes au sein de ces souches a également évolué : *K. pneumoniae* qui représentait environ 60 % de ces souches en 1995, n'en représente plus que 20 %. C'est chez *Escherichia coli* que la progression est la plus nette, passant de moins de 10 % en 1995 à 55 % en 2008 (111).

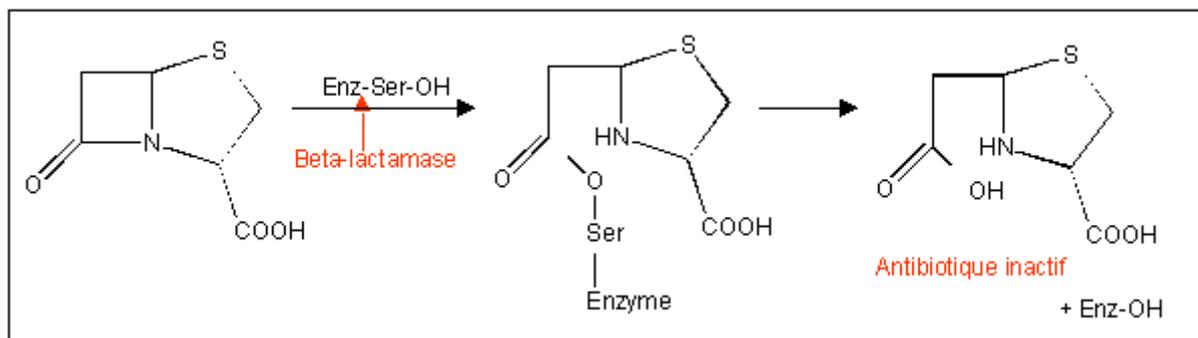


Figure 3.4. Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame

III.5.5. Classification des β -lactamases

La classification des β -lactamases est de deux types : une classification fonctionnelle (67) reposant sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des β -lactamases aux inhibiteurs comme le clavulanate et l'EDTA et une classification moléculaire basée sur la structure primaire des β -lactamases (11) (**Tableau 3.1**).

La classification de Bush rend compte de la diversité fonctionnelle des bêta-lactamases au sein des quatre classes structurales (A, B, C et D) de la classification d'Ambler. Les bêta-lactamases de la classe A sont ainsi subdivisées en 8 groupes fonctionnels 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2e et 2f (66). Dans la suite de la thèse, nous nous sommes focalisés sur cette classe et plus particulièrement sur les BLSE de type TEM, SHV et CTX-M du groupe 2be qui sont les plus diversifiés et les plus répandus.

Tableau 3.1. Classification fonctionnelle et moléculaire des β-lactamases majeures			
Groupe fonctionnel (Bush-Jacoby-Medeiros)	Classe structurale (Ambler)	Caractéristiques	Enzymes
1	C	hydrolyse Céphalosporines et Céphamycines	AmpC (<i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>), CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99
		Valeurs k_{cat} plus élevées que les pénicillines	
		Pas d'inhibition par TLA et TZB	
		Forte affinité Aztréonam	
1e	C	Hydrolyse Pénicillines, Céphamycines, BLSE, Monobactames	GC1, CMY-37
		Pas d'inhibition par TLA et TZB	
2a	A	Forte hydrolyse Pénicillines	PC1 et autres penicillinases des staphylocoques
		Inhibée par CLA et TZB	
2b	A	Forte hydrolyse Pénicillines et moins pour les Céphalosporines (céphaloridine, céfazoline, céphalotine)	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TLE-1 (TEM-90)
		Inhibée par CLA et TZB	
2be	A	Hydrolyse Pénicillines, BLSE, Monobactames	BLSE: CTX-M-15, CTX-M-44 (Toho-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1
		Inhibée par CLA et TZB	
2br	A	Forte hydrolyse Pénicillines et moins pour les Céphalosporines;	IRTs: TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
		pas d'inhibition nette par TLA	
2ber	A	Hydrolyse Pénicillines, BLSE, Monobactames	CMTs: TEM-50, TEM-68, TEM-89
		Faiblement inhibée par CLA et TZB	
2c	A	Forte hydrolyse des Carbénicillines	PSE-1, CARB-3
		Inhibée par CLA	
2d	D	Forte hydrolyse pour Cloxacilline ou Oxacilline	OXA-1, OXA-10
		Pas toujours inhibé par CLA	
2de	D	Hydrolyse Pénicillines et BLSE	BLSEs: OXA-1, OXA-15
		Pas toujours inhibé par CLA	
2df	D	hydrolyse Carbapénèmes et Cloxacillines ou Oxacillines	OXA-23, OXA-48
		Pas toujours inhibé par CLA	
2e	A	Forte hydrolyse des céphalosporines	CepA
		Inhibée par CLA et TZB mais pas avec Aztréoname	
2f	A	Hydrolyse Carbapénèmes, Céphalosporines, Pénicillines et Céphamycines	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2
		Faiblement inhibée par CLA et TZB	
3a	B	Hydrolyse tous les béta-lactames sauf les Monobactames;	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1
		Inhibé par EDTA et chélateurs d'ions en métal. Pas inhibé par CLA et TZB	
3b	B	Hdrolyse préférentiellement les Carbapénèmes	CphA, Sfh-1
		Inhibé par EDTA et Chélateurs d'ions en métal. Pas inhibé par CLA et TZB	

CLA : acide clavulanique, CMT : complexe mutant TEM, BLSE : β -Lactamase à Spectre Etendu, IRT : inhibitor-resistant TEM et TZB : tazobactame. (adapté (66, 67)).

III.5.6. Classification phylogénétique des BLSE

A ce jour, plus de 600 variantes de BLSE ont été décrites à travers le Monde représentant un problème majeur de santé publique (154). En fonction de leur séquence en acides aminés, ces enzymes ont été classées dans 11 familles différentes: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA (**Figure 3.5**). Les BLSE les plus anciennes dérivent de TEM-1,2 et de SHV-1.

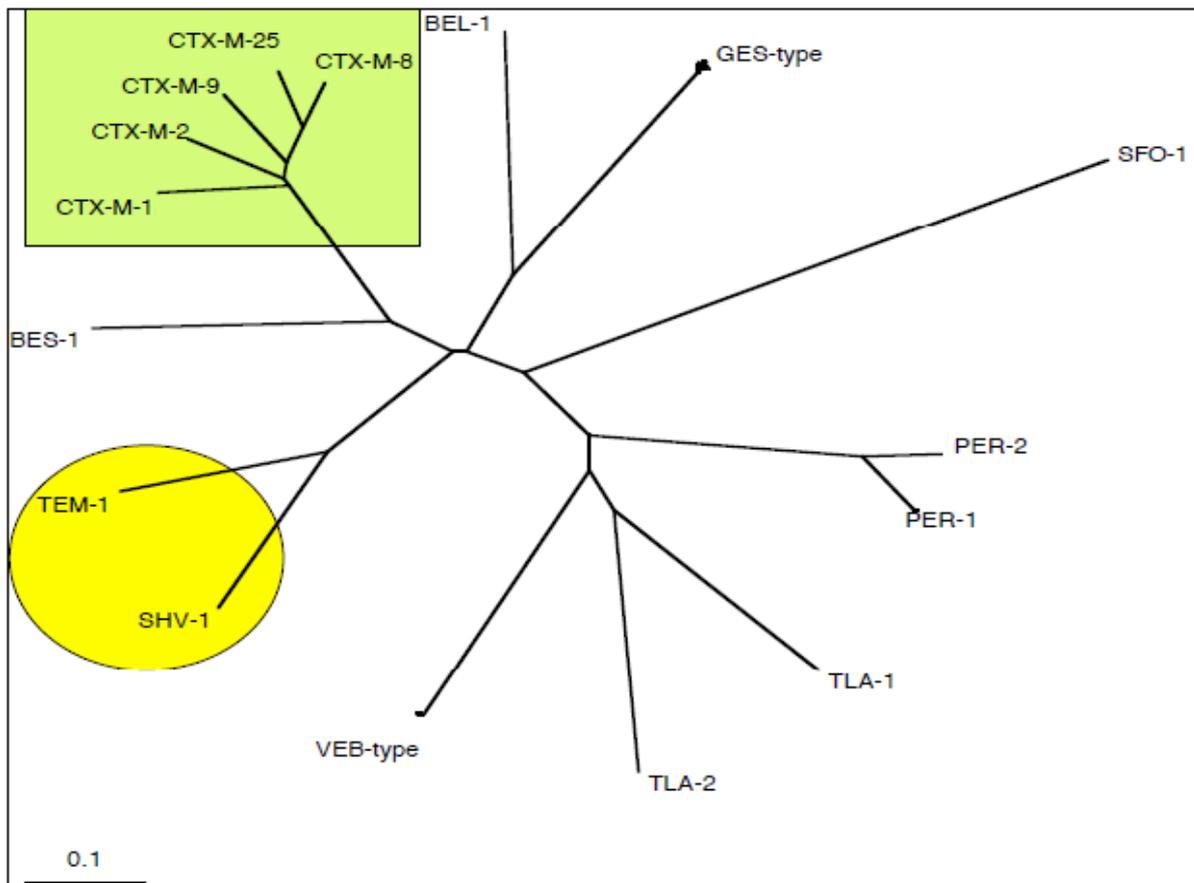


Figure 3.5. Classification phylogénétique des BLSE
D'après (147)

Dans la suite de l'étude bibliographique, nous allons nous focaliser sur les trois grandes familles de BLSE de type TEM, SHV et CTX-M illustrées en couleur dans le schéma de la classification phylogénétique des BLSE.

III.5.6.1. Bêta-lactamases de type TEM

Les BLSE de type TEM dérivent de TEM-1, qui a été détecté pour la première fois sur une souche de *E. coli* isolée chez un patient à Athènes en Grèce en 1965 et de TEM-2. Elles comptent actuellement plus de 150 dérivés dont plus de 100 avec un phénotype BLSE. A noter que certains dérivés de TEM (environ 30) ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux IBL, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (58). TEM-1, TEM-2 et TEM-13 qui ont une capacité d'hydrolyse limitée aux dérivés de pénicilline, ne sont pas considérés ainsi comme des BLSEs (274).

Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des Entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* (58, 349). En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli* (74).

III.5.6.2. Bêta-lactamases de type SHV

Tout comme les enzymes de type TEM, la majorité des enzymes SHV identifiées actuellement sont des BLSEs et dérivent toutes de SHV-1 et de SHV-2. La majorité des dérivés de SHV-1, plus de 60 dérivés, ont un phénotype BLSE, avec SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe (74). La résistance induite par SHV-1 est limitée aux pénicillines. Par contre, SHV-2, qui a été décrite pour la première fois en 1983 chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne, est capable d'hydrolyser le céfotaxime (168). Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses Entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. (58, 349).

III.5.6.3. Les BLSE de type CTX-M

Ces enzymes représentent actuellement les BLSE les plus fréquentes au sein des Entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (53, 58, 275, 349). Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime parmi les C3G, d'où leur nom de céfotaximases (53). En effet, les bactéries productrices de CTX-M sont résistantes au céfotaxime (CMI > 64 µg/mL) et plus ou moins sensibles à la ceftazidime (CMI de 2 à 8 µg/mL), tandis que les CMI de l'aztréonam sont variables (349). La provenance du gène des CTX-M serait sur le chromosome de *Kluyvera* spp. qui est une entérobactérie environnementale très rarement rapportée comme responsable d'infections humaines. En effet, la provenance des gènes codant pour les CTX-M des groupes 1 et 2 et pour celles des groupes 8 et 9 sont respectivement *K. ascorbata* et *K. georgiana*, tandis que les sources des CTX-M des groupes 25 et 45 restent inconnues (387) (**Figure 5.3**). Les enzymes de type CTX-M comportent actuellement de plus de 70 enzymes différentes divisées en cinq groupes selon leurs séquences d'acide aminé (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, and CTX-M-25) (186, 325, 363). Les enzymes Toho-1/2, décrites au Japon, sont très proches structurellement des CTX-M et sont donc classées parmi celles-ci (53).

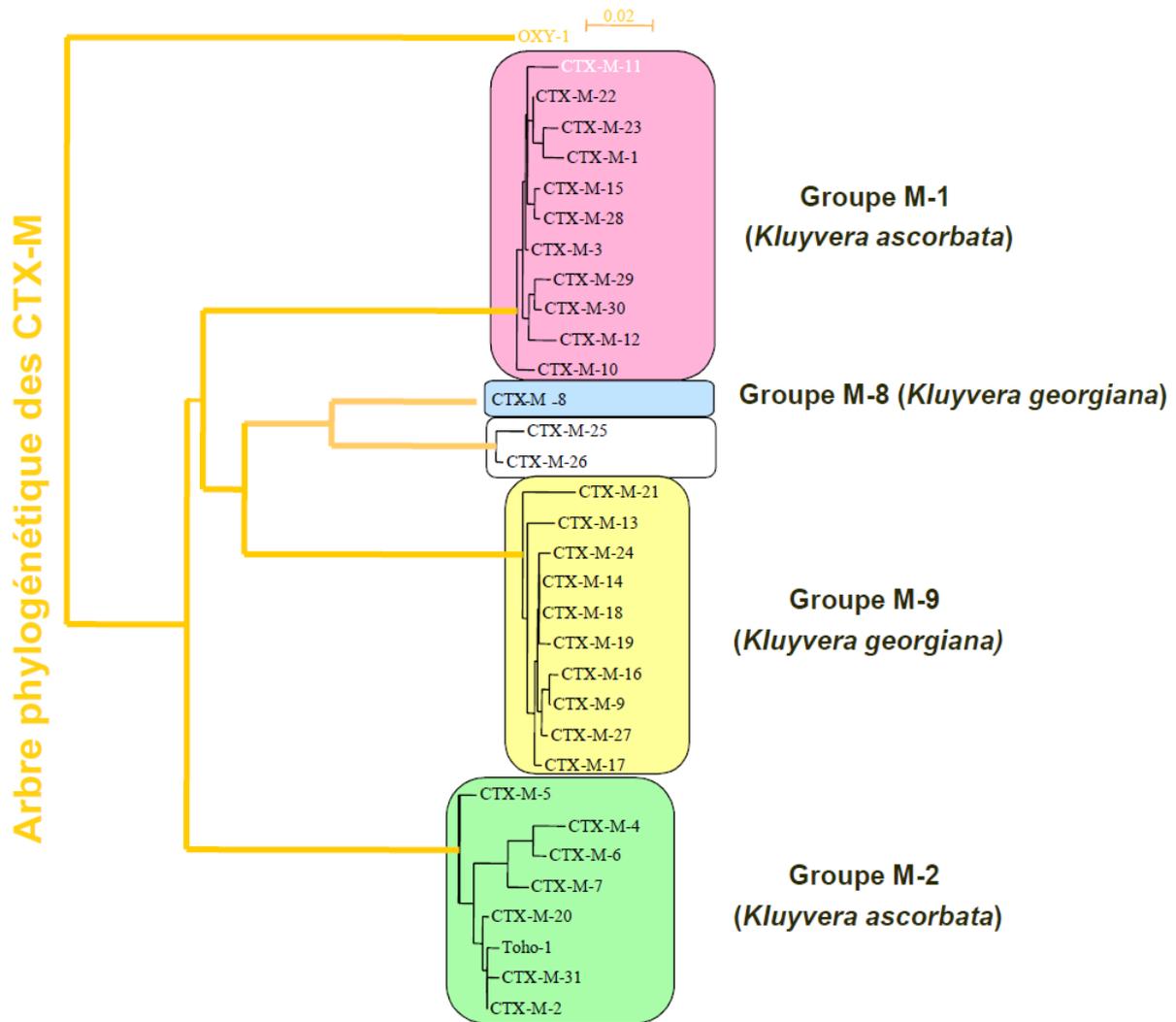


Figure 3.6. Schéma de l'arbre phylogénétique des CTX-M : Origine des gènes codant le groupe CTX-M D'après (147)

III.5.7. Les animaux réservoirs de BLSE

La présence constante de *E. coli* dans la flore digestive des mammifères implique une très large distribution de ce germe et donc une répartition étendue des souches résistantes. Les animaux d'élevage en particulier sont soumis à une forte exposition aux antibiotiques pour le traitement des maladies bactériennes. En conséquence, la flore intestinale des animaux est devenue un réservoir de bactéries résistantes. Une majeure partie des BLSE isolées chez les patients à l'hôpital ont été retrouvées dans des isolats d'origine animale.

III.5.7.1. Les enzymes CTX-M

Des isolats de *E. coli* CTX-M-1⁺ ont été rapportés pour la première fois chez un chien sain au Portugal (98). Mais récemment une apparition significative des *E. coli* producteurs CTX-M-1

en Italie a été observée dans une collection de 298 isolats de *E. coli*, isolées des animaux de compagnie sains et malades (204 chiens et 61 chats). Dans cette collection, 7% des isolats étaient résistantes au céfotaxime dont 76% étaient CTX-M-1 positives et 23% exprimaient le gène *bla_{SHV-12}* (76). CTX-M-1 a été également identifié dans des produits d'origine animale au Danemark, en Espagne et en France (1, 60, 159).

En 1999 au Japon, la présence de CTX-M-2 a été détectée dans des produits d'origine animale. Sur une collection de 2 747 souches de *E. coli* isolées de 1999 à 2002 (bétail, porc et volaille), 18 souches étaient céfazoline-résistantes dont 4 produisaient CTX-M-2 (412). Une autre étude menée au Japon sur 396 échantillons fécaux de bétail et 270 écouvillons de surface de carcasses de bétail collectés entre 2000 et 2001, a confirmé la présence de *E. coli* productrices de CTX-M-2 (240). En Europe, *Salmonella enterica* et *S. Virchow* productrices de CTX-M-2 ont été isolées chez la volaille aux Pays Bas, en Irlande et en Belgique ces dernières années (33, 185).

L'enzyme CTX-M-14 a été détectée chez un poulet sain en Espagne en 2000 (380). Plus tard dans une autre étude espagnole réalisée en 2003 sur une collection de 619 isolats de *E. coli*, huit portaient le variant CTX-M-14 et deux le variant CTX-M-9 (60). Deux souches de *S. Virchow* productrices de CTX-M-9 ont été isolées chez la volaille (380). Une étude réalisée en France sur des isolats de volaille et d'humains, durant la période 2002-2003, révèle la présence dans les fermes de souches de *S. Virchow* productrices de CTX-M-9. Ces dernières étaient responsables de gastroentérite chez un enfant de 4 ans (467). Récemment en Danemark des souches *S. Virchow* productrices de l'enzyme CTX-M-9 ont été isolées sur des cailles importées de France (2). En novembre 2004, des *E. coli* productrices de CTX-M-14 ont été isolées chez des veaux dans une ferme au Royaume-Uni. Une étude longitudinale exécutée entre décembre 2004 et juillet 2005 a démontré la diffusion rapide des BLSE à la ferme (271). Ainsi, la proportion d'échantillons positifs de veau a augmenté de 64,6% à la première visite à 92,7% à la troisième visite (2). Les isolats étaient génétiquement indépendants, et la diffusion du gène *bla_{CTX-M-14}* était liée à la fois à la promiscuité des plasmides dans la flore intestinale et à la contamination de l'environnement de la ferme par les déjections des animaux (2). En France, une étude récente a rapporté la présence de souches de *E. coli* enterohémorragiques productrices de l'enzyme CTX-M-15 chez des vaches

malades (286). Par ailleurs, chez les espèces animales, les BLSE du groupe CTX-M-1 étaient le plus souvent des enzymes de type CTX-M-15 (235, 452).

III.5.7.2. SHV-12

En 2000 au Sénégal, des souches de *Salmonella* d'un sérotype peu commun [35: c : 1.2] productrices de l'enzyme SHV-12 ont été détectées chez des patients à l'hôpital et chez la volaille, suggérant une épidémie liée à la consommation d'aliments souillés (77). En Europe, une souche de *E. coli* productrices de l'enzyme SHV-12 a été rapportée en 2001 en Espagne chez un chien souffrant d'infections urinaires récurrentes (61). Des souches de *E. coli* productrices de l'enzyme SHV-12, ont été retrouvées dans des échantillons fécaux de poulets sains collectés entre 2000-2001 dans les abattoirs en Espagne (62), et dans des échantillons cliniques d'animaux de compagnie collectés entre 2000-2003 en Italie mais à des fréquences faibles (76).

III.5.7.3. TEM-52

Généralement très peu de souches productrices de TEM-52 sont rapportés chez les animaux : trois souches productrices de TEM-52 chez des chiens sains au Portugal, trois souches dont une chez le lapin et deux chez la volaille en Espagne, et une souche productrice de TEM-52 sur une collection de 732 isolats de *E. coli* de volaille, de bovins et de porcs au Danemark (41, 89, 98). Une étude réalisée aux Pays-Bas durant la période 2001-2002 sur les salmonelles amoxicilline résistantes isolées chez la volaille, des viandes de volaille et chez des patients humains a révélé que l'enzyme TEM-52 était la plus répandue (185).

En 1988 au Japon, un isolat de *E. coli* producteur de BLSE de type FEC-1 a été isolé pour la première fois chez un chien de laboratoire (302). En Europe (Espagne, Allemagne et Royaume-Uni) et aux Etats-Unis, des souches *E. coli* et *Salmonella* spp. productrices de BLSE de type SHV-1-, TEM-1- et OXA- ont été fréquemment isolées chez les animaux ou des produits d'origine animale. TEM-1 était la variante la plus fréquente parmi ces isolats (26, 313).

III.5.8. Distribution géographique des BLSE

La plupart des antibiotiques actuellement en service sont produits à partir de processus naturels par des bactéries du sol comme les streptomycètes. La présence de bactéries

résistantes et des gènes de résistance dans l'environnement est un phénomène antique qui est la conséquence de l'origine des antibiotiques. Depuis leurs origines, les gènes ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles comme des séquences d'insertion (ex. *ISEcpI*, *ISCR1*) ou grâce à des phages, et transférés sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes pour l'homme (74, 387). Les souches productrices de CTX-M ont été initialement rapportées de façon sporadique à la fin des années 80 au Japon (FEC-1), en Europe (MEN-1, CTX-M-1) et en Argentine (CTX-M-2) (53). Dans le début des années 90, une diffusion massive des souches productrices de CTX-M (*S. enterica*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *E. aerogenes*) a été décrite en Argentine et dans les pays voisins, impliquant pour la plupart les CTX-M du groupe 2 (53, 387).

En 15 ans, la diffusion mondiale des BLSE de type CTX-M chez les entérobactéries a explosé de façon extrêmement rapide, d'où le terme de «pandémie CTX-M» (387). Les études épidémiologiques récentes rapportent que la situation est endémique dans la plupart des pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud avec de forts taux de prévalence de CTX-M parmi les souches productrices de BLSE : *E. coli* (de 30 à 90%) et de *K. pneumoniae* (de 10 à 60 %) (275, 387). A noter que quelques CTX-M sont retrouvées spécifiquement dans certains pays (comme CTX-M-9 et CTX-M-14 en Espagne, CTX-M-1 en Italie ou CTX-M-2 en Amérique du Sud, au Japon et en Israël) tandis que CTX-M-15 est mondialement distribuée et est responsable chez les humains des cas d'infections nosocomiales et communautaires (387).

En Espagne, la prévalence des CTX-M parmi les souches de *E. coli* et de *K. pneumoniae* productrices de BLSE était respectivement de 52,3 % et 12,5 % tandis qu'en Italie, les taux respectifs étaient de 54,8 % et 12,3 % (387). En France, dans l'étude d'Arpin *et al.*, les BLSE sont des CTX-M chez seulement 2,9 % des entérobactéries en 1999, contre 24,5 % en 2004 (20). Cette évolution est confirmée par d'autres études françaises, avec des niveaux encore plus élevés quelquefois comme dans l'étude de Naas *et al.* qui démontre que 92 % des BLSE isolées chez *E. coli* sont des CTX-M en 2004 parmi lesquelles 84 % sont des CTX-M-15 (324).

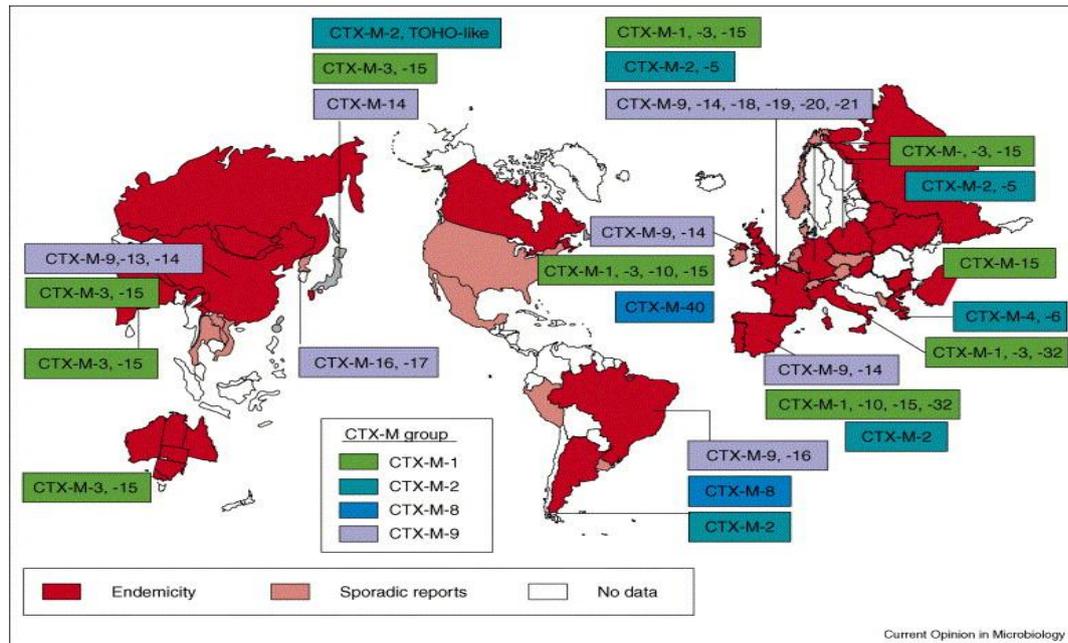


Figure 3.7. Répartition géographique des β -lactamase CTX-M D'après (73)

La large diffusion des CTX-M a changé considérablement l'épidémiologie des BLSE chez l'homme avec l'émergence de souches productrices de BLSE, principalement des souches de *E. coli* productrices de CTX-M (notamment CTX-M-15) non seulement à l'hôpital mais aussi dans toute la population. De plus, le portage digestif de souches productrices de BLSE est devenu non négligeable avec un réservoir de BLSE animal important (387). Dans une étude récente espagnole, les taux de portage de souches de *E. coli* productrices de BLSE étaient de 11,8 % chez les patients hospitalisés et de 5,5 % chez les patients de ville, avec 42 % et 69 % de CTX-M, respectivement (387).

Par ailleurs, les plasmides CTX-M portent souvent d'autres gènes de résistance et par conséquent, la résistance provoquée par les BLSE est souvent associée à la résistance à d'autres classes d'antibiotiques comme des fluoroquinolones, des aminoglycosides et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (96, 160). Enfin, à noter que les BLSE de type CTX-M peuvent être associées à d'autres β -lactamases, comme CTX-M-15 avec l'oxacilline OXA-1 ou des céphalosporinases plasmidiques et souvent des pénicillinases TEM (275).

Chapitre 4 : LES EAUX USEES ET LEUR EPURATION

Engendrée majoritairement par les eaux usées et les épandages, l'essentiel de la contamination des eaux superficielles est causé par l'homme et les animaux d'élevage. Les eaux usées sont constituées d'eaux vannes (matières fécales, urine etc...), d'eaux de lavage (linge, vaisselle, véhicule, etc..) et d'eaux utilisées pour l'hygiène dans les industries agroalimentaires en particulier les abattoirs.

L'ensemble des effluents urbains (domestiques et hospitaliers) et des effluents industriels sont traités dans une station d'épuration. Le rôle de cette usine consiste à rendre ces effluents propres à être rejetés dans le milieu naturel (rivière par exemple).

IV.1. Eaux usées et contamination microbiologique

IV.1.1. Les effluents d'abattoirs

Les effluents d'abattoirs correspondent à l'ensemble des rejets liquides produits sur le site de l'abattoir, c'est-à-dire les eaux résultant de l'activité d'abattage (procédé, lavage) et les eaux vannes (sanitaires) (308).

Les activités d'abattage sont à l'origine d'effluents bruts, liquides d'aspect rougeâtre comprenant de nombreux débris organiques. La fraction liquide de ces effluents bruts est principalement constituée de l'eau issue du réseau urbain et utilisée à de nombreux postes de lavage tout au long de l'activité d'abattage (lavage des véhicules, des aires de stabulations, du hall d'abattage, des locaux et du matériel, des cuves à sang, des bacs d'échaudage, des viscères...). Mais les effluents d'abattoirs contiennent également du sang, du jus de pressage ou d'essorage des matières stercoraires, ainsi que de l'eau des sanitaires et des fosses septiques destinés au personnel. En général, afin de limiter le volume des effluents d'abattoir, l'eau utilisée dans les systèmes frigorifiques est recyclée et les eaux de pluie sont rejetées directement dans le milieu extérieur. D'autres liquides entrent également dans la composition de l'effluent, comme le lisier lorsque les cuves sont lavées ou lorsque les quantités stockées dépassent la capacité de stockage de la fosse (trop plein). La fraction solide macroscopique des effluents bruts issus des abattoirs est généralement constituée de poils, de soies, de morceaux de cornes ou d'onglons, de déchets de parage (graisse), de débris végétaux

entraînés au cours des lavages, d'excréments humains (sanitaires pour le personnel) et animaux et parfois d'autres éléments comme des chiffons ou des débris métalliques.

Contamination microbiologique des effluents d'abattoirs (188, 263): La flore digestive des animaux de rente représente la source la plus importante quantitativement et qualitativement de micro-organismes banals ou pathogènes retrouvés dans les effluents bruts des abattoirs (protozoaires, champignons, bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatives). Les flores de la peau, du tractus uro-génital et du tractus respiratoire peuvent également, mais dans une moindre mesure, participer à la contamination des effluents.

La flore environnementale présente dans l'eau, le sol ou l'air constitue également une source de contamination. L'eau du réseau urbain utilisée au cours des activités d'abattage des animaux de boucherie est dite potable et ne contient donc pas (sauf en cas de contamination accidentelle du réseau) de bactéries en quantité suffisante pour influencer sur la composition microbiologique de l'effluent brut. Enfin, l'air peut contenir des bactéries mais l'impact de cette flore dans la composition microbiologique des effluents semble limité.

IV.1.2. Les effluents domestiques

Ils sont constitués des eaux grises et des eaux « vannes ». Les eaux grises sont les eaux des baignoires, douches, lavabos, éviers, machines à laver. Les eaux-vannes ou eaux ménagères font références aux sous-produits de la digestion tels que les matières fécales et l'urine. Elles peuvent être un danger pour la santé car elles peuvent véhiculer des agents microbiens pouvant être responsables de maladies virales ou bactériennes.

IV.1.3. Les effluents hospitaliers

L'hôpital est un lieu où sont concentrées des personnes potentiellement porteuses de germes pathogènes et où peuvent se développer des infections nosocomiales. Il se pose alors la problématique de savoir si l'hôpital peut-être générateur d'une pollution bactériologique.

En effet, il peut exister plusieurs sources de rejet d'éléments pathogènes à l'hôpital. Des bactéries, des virus ou des parasites peuvent être évacués avec les eaux vannes et avec les produits d'analyses des laboratoires s'il n'existe pas de systèmes de récupération ou de traitement spécifiques.

De plus, du fait de l'utilisation quelquefois intensive d'antibiotiques à l'hôpital certaines souches bactériennes peuvent développer des facultés de polyrésistance aux antibiotiques. Le danger de pollution peut donc être accentué par la présence de ces germes dans le réseau d'assainissement public.

IV.1.4. Les eaux pluviales

Aussi appelées eaux de ruissellement, elles sont constituées des eaux d'écoulement de surfaces imperméables. Ce sont les eaux de lavages de voiries, les eaux de pluies des toits, voiries et parkings, les eaux de drainage qui ne se sont pas infiltrées dans la partie superficielles du sol. Elles lessivent le sol et entraînent avec elles des pollutions liées à la qualité des sols et à leur usage.

IV.2. Propriétés physico-chimiques des effluents

Les eaux usées forment en général un milieu très complexe. La charge en agents polluants dans un effluent peut être évaluée à partir de certains paramètres (373). La demande biochimique en oxygène ou DBO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation des matières organiques fermentescibles présentes dans l'effluent par des bactéries aérobies. Elle correspond à une mesure de la pollution des eaux par la matière organique dégradable par des voies biologiques naturelles (microflore présente dans le milieu récepteur) ou anthropiques (installations de traitement biologique des eaux usées). La durée de la mesure de la DBO est en général de cinq jours (DBO₅) et le résultat obtenu est le volume d'oxygène dissous consommé par les bactéries aérobies durant ces cinq jours. La demande chimique en oxygène ou DCO désigne la quantité globale d'oxygène nécessaire à l'oxydation des polluants organiques et inorganiques qui ne peuvent être dégradés par les micro-organismes des biotopes aquatiques. Le rapport DBO₅/DCO permet d'évaluer l'efficacité épuratoire d'un éventuel traitement biologique des effluents.

Les matières en suspension ou MES sont représentées par l'ensemble des particules minérales ou organiques non dissoutes dans les effluents. La mesure des MES permet d'évaluer la turbidité des effluents. Les MES se déclinent en deux types : les matières décantables qui se déposent au repos en une durée communément fixée à 2 heures et les matières colloïdales (particules de 10⁻² à 10⁻⁸ mm) qu'il n'est pas possible de décanter.

Le taux de substances extractibles au chloroforme ou SEC permet d'évaluer la charge lipidique de l'effluent. L'azote Kjeldahl, exprimé en gramme d'azote ammoniacal, correspond à la somme de l'azote contenu dans la matière organique et de l'azote présent sous forme ammoniacale. L'azote global correspond à la somme de l'azote Kjeldahl, des nitrates et des nitrites. Le phosphore total permet également d'estimer la charge polluante des effluents puisque les teneurs en phosphore et en azote jouent un rôle dans l'eutrophisation du milieu récepteur.

Particularité des effluents bruts issus des abattoirs: ils sont relativement peu dilués et possèdent une charge organique, lipidique et azotée élevée : une étude menée en France a ainsi montré que les valeurs moyennes de DBO₅, DCO, MES, SEC, azote global et phosphore total d'un effluent brut non dégrillé issu d'un abattoir de bovins s'élevaient respectivement à 13,2 ; 31 ; 11,1 ; 5,2 ; 1,6 et 0,13 grammes par kilogramme de carcasse produite (353). Les effluents des abattoirs constituent donc un milieu riche en eau, carbone, azote et minéraux. Ainsi, bien que plus pauvres - du fait notamment de la dilution - que l'habitat d'origine des bactéries du tube digestif des animaux de boucherie, les effluents d'abattoirs conservent des teneurs non négligeables en éléments nutritifs pouvant servir de substrat pour un développement ou un maintien de populations bactériennes. Aucune mesure de la quantité d'oxygène dissous dans les effluents bruts d'abattoir n'est disponible dans la littérature, mais sa teneur autorise probablement la multiplication de toutes les bactéries en particulier des bactéries aéro anaérobies facultatives (telles que les *E. coli*), à l'exception des anaérobies strictes. Les matières organiques peuvent être utilisées par les micro-organismes soit comme support de fixation, soit comme nutriments, et influent donc sur la survie et la multiplication des bactéries. L'adsorption des bactéries sur les particules de matière organique peut expliquer la survie des bactéries aux différents traitements des effluents et donc le recyclage de microorganismes pathogènes (188). Par ailleurs, la température moyenne de l'effluent brut varie entre 15 et 25°C (109) ce qui autorise une survie, voire une multiplication des bactéries présentes, majoritairement mésophiles. Enfin, les effluents d'abattoirs ont des valeurs de pH proches de la neutralité (entre 6,9 et 8,2 selon (116)) qui autorisent une survie des microorganismes présents tels que les *E. coli*.

IV.3. Epuration des eaux usées

Par un système de canalisation, les effluents sont drainés jusqu'à la station d'épuration. Ils sont soumis à un prétraitement (dégrillage, tamisage, dessablage, dégraissage-déshuilage, bassin tampon) dont le but est de retirer mécaniquement les éléments solides et les graisses favorisant ainsi la protection des ouvrages en aval (canalisations, pompes, bassins). Le traitement proprement dit fait appel à des procédés physico-chimiques et biologiques (188).

IV.3.1. Les prétraitements :

Les effluents doivent subir avant le traitement proprement dit, un prétraitement comportant un certain nombre d'opérations à caractère physique ou mécanique. Le but est dans ce cas d'extraire et d'éliminer de l'eau les éléments solides en suspension ou en flottation et qui pourraient constituer une gêne pour les traitements ultérieurs. Les traitements successifs sont le relevage, le dégrillage et le dessablage – déshuilage.

IV.3.1.1. Le relevage

Cette étape est nécessaire avant tout prétraitement pour assurer un passage gravitaire de l'eau dans les différents ouvrages de traitement, le niveau d'entrée des eaux à épurer étant en général plus bas que le niveau de sortie du clarificateur des eaux épurées avant rejet dans le milieu naturel. En utilisant un système de relevage assuré par des pompes ou par vis d'Archimède.

IV.3.1.2. Le dégrillage

Il consiste à retenir les gros déchets solides au moyen de grilles à barreaux verticaux dont l'écartement varie de 100 mm à 3 mm en fonction de l'efficacité voulue. Sont ainsi éliminés les bois, plastiques, papiers, bouteilles, feuilles qui sont susceptibles de provoquer des dégâts aux conduites et machines des différentes unités de l'installation. Dans une STEP pour eaux résiduelles, l'écartement est de l'ordre de 10 à 30 mm

IV.3.1.3. Le dessablage

De plus en plus associé dans le même ouvrage au déshuilage, il a pour but d'extraire des eaux brutes les sables, les graisses et particules minérales plus ou moins fines en suspension, de manière à éviter l'abrasion des pompes et conduites en aval. Le sable se dépose dans le fond de l'ouvrage, est raclé ou sucé par pompes montées sur pont roulant. Le volume extrait par

habitant et par an est de l'ordre de 5 à 12 dm³. Les huiles et les graisses en principe flottent car leurs densités sont inférieures à celle de l'eau. Une aération est souvent utilisée sous forme de bulles d'air qui augmentent la vitesse de montée des particules grasses dont la récupération s'effectue dans une zone de tranquillisation. Le temps de séjour dans ce type d'ouvrage est de 5 à 12 minutes et le débit d'air insufflé est de l'ordre de 0,2 mètre cube et par heure.

IV.3.2. Traitement primaire

Le traitement primaire élimine plus de la moitié des matières en suspension et constitue une pré-épuration non négligeable quoique'insuffisante pour garantir la qualité du rejet en milieu naturel. Il fait appel à différents procédés physiques ou chimiques. Les matières en suspension se déposent au fond par différence en raison d'une densité supérieure à celle de l'eau. La décantation classique est possible lorsque les eaux prétraitées séjournent en eaux calmes dans le bassin de décantation primaire. Les matières en suspension, organiques ou non, se déposent dans le fond du bassin simplement par gravité. Elles y sont raclées et évacuées formant ainsi les boues primaires.

Mais la simple décantation ne suffit malheureusement pas. En effet si le temps de décantation d'un gravier dans un mètre d'eau est de 1 seconde par la seule influence de son poids, celui du sable fin passe à 2 minutes, l'argile à 2 heures, les bactéries à 8 jours et enfin de 2 à 200 ans pour un colloïde. Les matières sont donc particulièrement stables en suspension et impossibles à décanter naturellement aux débits généralement admis dans une station d'épuration. Pour déstabiliser la suspension, il faut favoriser l'agglomération des colloïdes en diminuant leurs forces de répulsion électrostatique. Lorsque ces particules s'agglomèrent, il y a floculation ou coagulation. La coagulation s'obtient par addition dans l'eau d'un réactif chimique, le sel d'aluminium ou de fer, qui neutralise les charges électriques superficielles répulsives, et permet ainsi leur agglomération. Celle-ci est accélérée par l'ajout d'un polymère, sorte de macromolécule à longue chaîne qui emprisonne les matières colloïdales agglomérées en flocons volumineux qui se déposent par gravité. C'est le floc. Le grossissement du floc peut être encore augmenté s'il est mis en contact avec des précipités déjà formés lors d'un traitement antérieur par une re-circulation des boues et si un brassage lent de l'ensemble augmente les chances de rencontre des particules colloïdales avec le floc formé. Ce type de traitement primaire n'est pas généralisé à toutes les STEP mais la coagulation - floculation, suivie d'une décantation permet d'éliminer jusqu'à 90% de MES et de 40 à 65% de la DBO5

des effluents résiduels urbains. Les résidus ainsi collectés sont particulièrement chargés en matières fermentescibles et doivent subir un traitement spécifique afin d'être stabilisés.

Dans certains cas si les éléments à éliminer ont une densité légèrement inférieure à celle de l'eau, on les élimine par flottation avec ou sans adjonction de polymère. De fine bulles sont injectées à la base du bassin pour favoriser la remontée des boues et ces dernières sont éliminées par un raclage de surface.

IV.3.3. Les traitements secondaires (353, 374)

Le traitement secondaire fait appel à des procédés biologiques : les effluents sont mis en contact avec une biomasse épuratrice composée de micro-organismes sélectionnés qui, lors de leur croissance et de leur multiplication, éliminent l'essentiel des composés organiques oxydables et de l'azote ammoniacal présents dans l'effluent.

Le système le plus fréquemment utilisé, consiste à développer des boues activées sous forme de floccs dans un bassin brassé et aéré. Le temps de contact effluent - biomasse est en général de l'ordre de 6 à 10 heures. Les boues activées sont constituées essentiellement de bactéries et parfois de protozoaires, de champignons, de rotifères et de nématodes. Cependant, la composition de ces boues peut varier en fonction de la nature des composés organiques présents dans les effluents mais aussi du pH, de la température et de l'oxygénation des effluents. Les réactions d'oxydation du carbone présent dans les effluents seront d'autant plus importantes que les systèmes d'aération du bassin à boues activées seront efficaces.

L'aération du bassin est en général assurée en surface et en profondeur par des aérateurs de surface et des accélérateurs de courant dont le fonctionnement est guidé par des mesures de l'oxygène dissous dans l'eau. L'élimination de l'azote ammoniacal par la biomasse bactérienne s'effectue par nitrification dans un bassin aéré et par dénitrification dans un bassin ou une zone d'anoxie.

Les effluents sont ensuite déversés dans un clarificateur qui permet essentiellement de séparer les floccs de l'eau par gravitation. Les floccs se déposent au fond du clarificateur et sont récupérés et éliminés par des bras racleurs. Les eaux clarifiées sont, quant à elles, acheminées vers un chenal de sortie et rejetées dans l'environnement (rivières).

IV.3.4. Traitement et valorisation des boues (353, 374)

Les boues sont constituées de l'ensemble des éléments figurés accumulés au cours du processus d'épuration des effluents et comprennent des matières en suspension minérales, des matières organiques non dégradables par les procédés de traitement utilisés et des microorganismes (morts ou vivants). Ces boues contiennent également de l'eau en grande quantité. Afin de réduire leur volume, elles sont déshydratées par décantation, par pressage ou par centrifugation, puis éventuellement séchées à l'air ambiant ou en vapeur d'eau surchauffée.

Ces procédés permettent également de réduire l'évolution biologique des matières organiques fermentescibles résiduelles et stabilisent les boues. Leur élimination est presque toujours une charge d'exploitation. Les boues peuvent être incinérées ou enfouies mais elles sont parfois valorisées et utilisées pour amender les sols. L'épandage de boues d'épuration constitue en effet un apport en eau et en matières organiques non négligeable et permet d'augmenter le pouvoir de rétention d'eau du sol.

L'épandage des effluents participe à l'entretien dans l'environnement de colibacilles pathogènes et/ou antibiorésistants. Les eaux superficielles sont alors une source de contamination de l'homme. Le développement d'outils de PCR pour la détection dans les effluents de gènes de virulence et d'antibiorésistance, et la validation des résultats obtenus par l'étude de bactéries isolées permettront de proposer des outils efficaces pour l'évaluation et la maîtrise des risques pour la Santé publique.

PARTIE II. ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 5 : OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

L'espèce *Escherichia coli* est hétérogène, contenant des souches pathogènes et des souches inoffensives. La classification des différentes souches pathogènes est basée sur leurs propriétés spécifiques de virulence. Les souches pathogènes d'*E. coli* sont en effet associées à des maladies variées.

Certaines souches ne franchissent pas la barrière intestinale produisant des lésions d'entérite, associées à de la diarrhée et d'autres souches pathogènes d'*E. coli* peuvent franchir la barrière intestinale, pouvant produire une septicémie, avec des complications variables selon les organes infectés.

Les *Escherichia coli* pathogènes sont considérés à l'heure actuelle comme des souches émergentes en santé publique. Les différents sérogroupes impliqués chez l'homme sont également présents dans les différentes espèces animales où ils font souvent l'objet d'un portage asymptomatique dans le tube digestif. En outre, l'utilisation des antibiotiques chez les animaux, parallèlement à leur usage en médecine humaine, participe à la pression de sélection favorisant l'émergence de bactéries de la flore digestive porteuses de gènes de résistance. L'excrétion animale et humaine participe à la contamination de l'environnement via les effluents.

Dans ce contexte, la caractérisation sur le plan de la pathogénicité et de la résistance aux antibiotiques des souches de *E. coli* présentes dans les effluents d'abattoir et urbain devrait permettre d'évaluer leur contamination respective. L'estimation de la prévalence dans les effluents de souches potentiellement pathogènes et/ou antibiorésistantes nous permettra d'évaluer la part des effluents dans l'entretien de leur cycle épidémiologique dans l'environnement. De plus, la comparaison de ces populations d'*E. coli* d'origine humaine et animale nous permettra d'évaluer si des souches identiques sont présentes dans les réservoirs humains et animaux et/ou si des flux de bactéries et/ou de gènes existent entre ces deux populations.

Ce projet a quatre objectifs majeurs :

- (i) Etudier l'évolution au cours du temps de la fréquence de contamination par des souches d'*E. coli* pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques des effluents d'un couple abattoir/station d'épuration urbaine,
- (ii) apprécier la pression exercée par les souches d'*E. coli* d'origine animale sur celles d'origine humaine retrouvées dans les effluents de la station d'épuration urbaine,
- (iii) étudier la potentielle émergence de flux de gènes de virulence ou de résistance entre les populations d'*E. coli* d'origine animale présentes dans les effluents de l'abattoir et celles d'origine humaine présentes dans les effluents de la communauté urbaine.
- (iv) Comparer la situation épidémiologique au Sénégal (région de Dakar) et dans le sud-ouest de la France en termes de présence et dissémination dans l'environnement de *E. coli* potentiellement à risque pour la Santé publique grâce au transfert des méthodes et différentes technologies nécessaires à ce type d'études.

En conclusion, notre travail devrait permettre d'aider à développer des méthodes originales de prédiction du risque lié à l'existence d'*E. coli* potentiellement pathogènes et/ou résistants aux antibiotiques dans les effluents des stations d'épuration et des abattoirs. Il devrait également permettre d'aider à formuler des recommandations en matière de surveillance et de qualité microbiologique des effluents des stations d'épuration.

Chapitre 6 . MATERIEL ET METHODES

VI.1. Réalisation des prélèvements d'effluent

Les prélèvements d'effluents ont été réalisés en France et au Sénégal afin de comparer les situations épidémiologiques des deux pays en termes de prévalence des souches *E. coli* pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques.

VI.1.1. En France

VI.1.1.1. Sites de prélèvement

Un couple abattoir/station d'épuration urbaine d'une ville de Midi-Pyrénées d'environ 60 000 habitants a été choisi. Précisons qu'en amont de la station d'épuration se trouve un hôpital de capacité de 900 lits et qu'en aval se trouve un cours d'eau relativement important.

L'abattoir est de moyenne capacité et se caractérise par un tonnage annuel de 9 600 tonnes (avec une capacité de 13 000 tonnes). Il s'agit d'un abattoir polyvalent ; il traite majoritairement des porcs (environ 70% du tonnage annuel) et en quantité moindre des gros bovins (20% du tonnage), des veaux (8%) et des ovins/caprins (2%). La consommation moyenne en eau du site s'élève à 220m³/j. L'abattoir ne dispose pas d'une station d'épuration complète mais l'effluent à sa sortie subit un prétraitement avant de rejoindre le réseau urbain. Il s'agit d'un dégrillage/tamissage suivi d'un traitement à base de chlorure ferrique qui permet la floculation des matières organiques et au terme duquel sont récupérées des boues.

La station d'épuration municipale traite de manière classique les eaux usées de la ville. Il s'agit en effet d'une station biologique à boues activées. Après traitement, l'eau est déversée dans une rivière ; les boues quant à elles sont prises en charge dans l'unité de compostage.

VI.1.1.2. Choix stratégique des points de prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés sur trois points stratégiques : (P1) effluents urbains à l'entrée de la STEP (représentatifs des *E. coli* portés par la communauté humaine), (P2) effluents d'abattoir rejetés dans la STEP (représentatifs des *E. coli* portés par les animaux d'élevage et ayant persisté au cours des premières phases d'épuration à l'abattoir) et (P3) effluents traités avant leur rejet dans le cours d'eau (représentatifs des *E. coli* d'origine humaine et animale ayant persisté au cours des traitements épuratoires) (**Figure 6.1**).

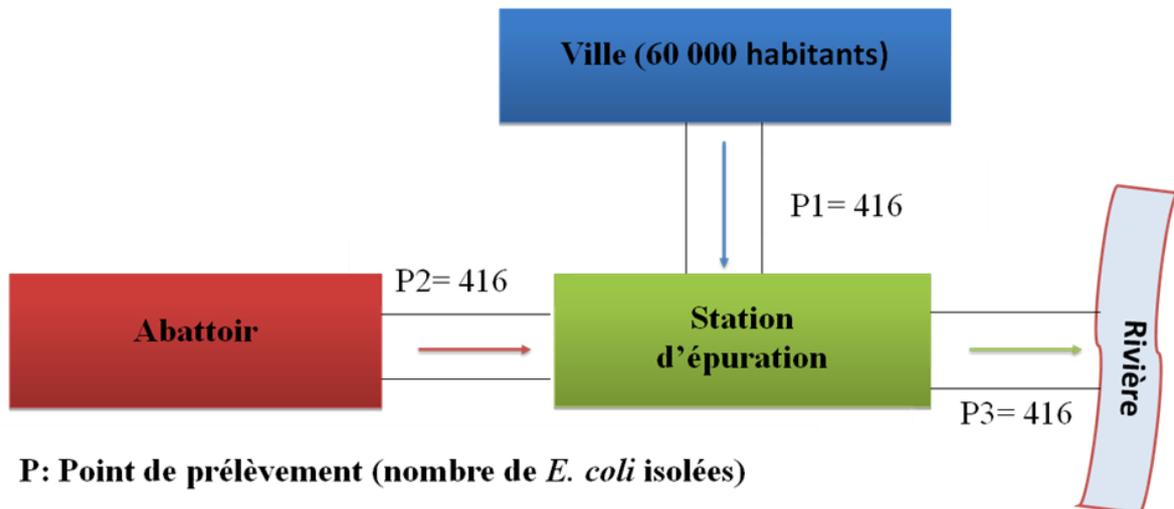


Figure 6.1. Schématisation des points de prélèvement des effluents en France

VI.1.1.3. Techniques de prélèvement des effluents

L'étude s'est déroulée sur 12 mois (de mars 2009 à mars 2010) avec un prélèvement par mois en chacun des trois points. Les prélèvements ont été effectués sur 24 heures à l'aide d'un préleveur automatique préalablement programmé afin de répondre aux fluctuations journalières du débit. Le temps de rémanence de l'eau dans la station d'épuration a été pris en compte afin que le prélèvement réalisé en P3 soit représentatif de ce qui a été rejeté en P1 et P2. En effet, le prélèvement P3 a été effectué trois jours après ceux effectués en P1 et P2. Les débits quant à eux ont été mesurés en P2 et P3 sur 24 heures au cours des prélèvements.

VI.1.2. Au Sénégal

VI.1.2.1. Sites de prélèvement

Contrairement à la France, les abattoirs ne sont pas connectés à la STEP urbaine et les prélèvements ont été effectués de façon séparée.

Les abattoirs de Dakar sont les plus grands abattoirs au Sénégal et le seul lieu d'abattage à Dakar permettant la mise sur le marché des viandes d'animaux (bovins, ovins, caprins et porcins) parce qu'ils constituent le seul établissement garantissant un contrôle vétérinaire exhaustif des animaux à leur entrée et leur sortie. Ils comportent une salle d'abattage pour les bovins (abattoir de bovins), une salle pour les ovins et les caprins, une salle pour les porcins et à côté de cette dernière, est aménagé un local pour l'abattage des chevaux qui est une espèce

faiblement exploitée destinées à nourrir les animaux des parcs zoologiques. Les abattoirs traitent majoritairement des bovins (environ 74 % du tonnage annuel), des ovins (environ 19 % du tonnage annuel) et en quantité moindre des porcins (environ 1 % du tonnage annuel). Les abattoirs sont de moyenne capacité et se caractérisent par un tonnage journalier de 10 tonnes. La consommation moyenne en eau du site s'élève à environ 150 m³/j. Les abattoirs ne sont pas équipés d'un système de prétraitement ni de traitement des eaux usées. Tous les déchets d'abattage (liquide physiologique et eau pour les taches de nettoyage) sont déversés directement dans le système de canalisation qui débouche dans la baie de Hann au niveau de la mer. Seule la partie solide du contenu gastrique est récupérée afin de protéger les ouvrages en aval de l'arrivée de gros éléments susceptibles de provoquer le colmatage des unités de l'installation. Cette partie est utilisée pour épandage en culture maraîchère.

La station d'épuration urbaine a une capacité de production d'eau brute de 19 200 m³/j. Elle reçoit les eaux usées des ménages, des effluents des hôpitaux et les eaux pluviales. Aujourd'hui la station est saturée car elle reçoit une capacité de 28 471 m³ d'eaux usées en moyenne par jour. Ainsi, un surplus de 2 200 m³ est directement rejeté en mer. La fraction traitée est utilisée dans l'irrigation des productions horticoles, l'arrosage de terrains ou d'espaces verts et pour fournir en eau dans une moindre mesure certaines entreprises de construction. Les boues issues du traitement sont valorisées, séchées, recyclées et revendues en compost à des associations agricoles locales. Par ailleurs, la filière de traitement des boues par digestion permet de produire du biogaz (méthane) qui alimente un groupe électrogène qui procure à la station de l'électricité à 30 % ; ce qui favorise l'économie d'énergies fossiles.

VI.1.2.2. Choix des points de prélèvement

Au niveau des abattoirs de Dakar, les prélèvements ont été effectués à un seul point au niveau des eaux usées provenant de la salle des bovins appelé effluent abattoir (EA). Pour cibler la période de forte activité de l'abattoir, les séances de prélèvements ont été réalisées le matin entre 8h et 10h et un volume d'environ 10 litres est recueilli directement dans des bidons stériles et transporté au Laboratoire National d'Elevage et des Recherches Vétérinaires (LNERV) dans un conteneur avec des carbo-glaces.

A la station d'épuration urbaine (STEP), les prélèvements ont été réalisés à trois niveaux : (i) Entrée de la STEP: effluent brut dessablé (EBD), (ii) Après traitement physique: eau clarifiée

(EC) et (iii) Après chloration : Rejet Final (RF). Pour chaque point de prélèvement, un volume de 10 litres a été recueilli et transporté au laboratoire dans les mêmes conditions pour l'effluent de l'abattoir (**Figure 6.2**).

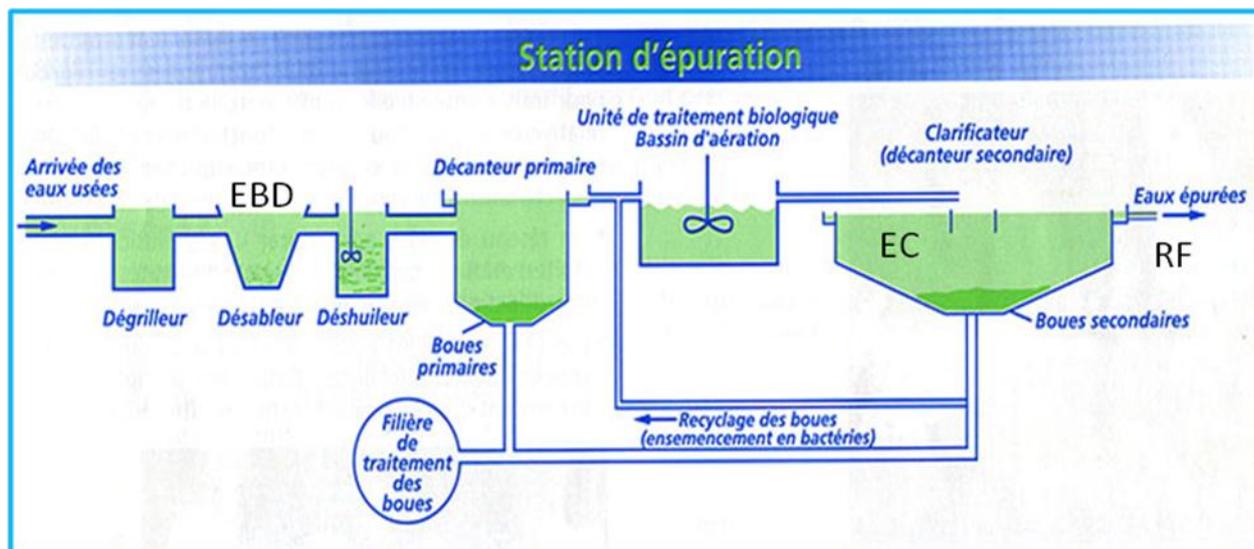


Figure 6.2. Points de prélèvement pour la STEP des eaux usées de Dakar
EBD : effluent brut dessablé, EC : eau clarifiée et RF : Rejet Final.

VI.2. Traitement des prélèvements

Les effluents prélevés ont été traités de la même sorte le jour même de leur réception. Les échantillons ont tout d'abord subi une étape de concentration par centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes. Les culots bactériens ont ensuite été mis en suspension dans 5 mL de diluant tryptone.

VI.3. Dénombrement des entérobactéries et des *E. coli*

Des dilutions décimales des suspensions bactériennes ont ensuite été ensemencées sur pétrifilm Entérobactéries (Petrifilm™ Select Entérobacteries Count Plate, Grosseron, Saint Herblain, France) pour le dénombrement des entérobactéries et sur pétrifilm Select *E. coli* (Petrifilm™ Select *E. coli* Count Plate, Grosseron, Saint Herblain, France) pour le dénombrement des *E. coli*. Les pétrifilms ont enfin été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures pour le dénombrement des Entérobactéries et à 42°C pendant 18 à 24 heures pour le dénombrement des *E. coli* (451).

VI.4. Isolement des *E. coli* et constitution d'une banque d'isolats

Pour chaque campagne et chaque prélèvement, après dénombrement, une vingtaine de pétrifilm Select *E. coli* ont été ensemencés à une dilution permettant d'avoir une vingtaine de colonies bien isolées, 20 à 24 ufc présentant une activité bêta-glucuronidase ont été prélevées de façon aléatoire et ont été repiquées dans des plaques de 96 puits contenant 150µL de bouillon Luria Bertani (LB) (Invitrogen, Paisley, Ecosse) ; en tout 13 plaques ont été ensemencées par campagne (soient 1248 souches par campagne). Au total pour les 12 campagnes une banque de 14 976 isolats de *E. coli* a été constituée. Les plaques ont été incubées pendant une nuit à 37°C et ensuite conservées à -80°C dans 30% de glycérol (ajout à l'aide de micropipette de 2 gouttes de glycérol dans chaque puits contenant une souche).

A partir des prélèvements issus de l'abattoir et de la STEP de Dakar, Une collection de 540 souches de *E. coli* a été constituée dont 268 souches de *E. coli* isolées à l'abattoir, 183 souches de *E. coli* de l'effluent brut de la STEP et 89 souches de *E. coli* de l'eau clarifiée de la STEP. Au niveau du rejet, du fait de la chloration, aucune souche de *E. coli* n'a été isolée. Les souches collectées ont été conservées à - 80°C dans 30% de glycérol.

VI.5. Recherche des 5 principaux sérogroupes des EHEC par Immunoséparation magnétique (IMS)

Parallèlement à l'isolement des *E. coli*, la recherche des 5 sérogroupes majeurs (O157, O103, O26, O145 et O111) les plus incriminés dans des maladies humaines dues aux EHEC (6) a été réalisée par IMS sur les échantillons P1, P2 et P3 à chaque campagne de prélèvement. 1 ml de chacun des prélèvements P1, P2 et P3 a été enrichi dans 15 ml de bouillon Tryptone Soja Modifié (TSM) additionné de novobiocine (20 mg/L) et d'acriflavine (10 mg/L). Le but était de favoriser la croissance des souches EHEC tout en inhibant les bactéries à coloration de Gram positive. Ce milieu d'enrichissement a été incubé 16h à 42°C. 1 ml de la suspension P1 enrichie a été réparti dans 5 tubes Eppendorf (idem pour P2 et P3). Une suspension d'anticorps attachés à des billes magnétiques a été ajoutée. Ce sont les anticorps O26, O103, O111, O145, O157 (Dynal Biotech, Bromborough, Royaume-Uni) qui ont été utilisés (**Figure 6.3**). Ils sont dirigés vers les LPS (lipopolysaccharides) des bactéries porteuses des antigènes qui leur sont spécifiques (Figure 6.3). L'agitation a été mise en place puis une barre aimantée a été positionnée pour attirer les billes magnétiques associées ou non aux bactéries recherchées contre la paroi des tubes. Des lavages ont été réalisés avec du PBS complétement

avec du tween. Ensuite, après avoir enlevé la barre aimantée, le culot a été repris avec du PBS/Tween. A partir de cette suspension, des ensemencements ont été réalisés sur un milieu cefixime-tellurite-MacConkey (CT-MAC) base + rhamnose à 10g/L pour le sérogroupes O26, CT MAC base + raffinose à 10 g/L pour O145 et sur un milieu cefixime-tellurite-sorbitol-MacConkey (CT-SMAC) agar pour O157, O103 et O111. Les milieux de culture ensemencés ont été incubés pendant 24h à 37°C. Sur chaque série de 10 boîtes, 10 colonies caractéristiques bien isolées ont été choisies aléatoirement et elles ont été repiquées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose LB pour O26, O103, O111, O145 et de la gélose sorbitol-Mac Conkay pour O157 et ont été incubées pendant 24h à 37°C.

Des tests spécifiques d'agglutination pour *E. coli* O157, *E. coli* O26, *E. coli* O103, *E. coli* O111 et *E. coli* O145 test kit (Statens Serum Institut, Copenhagen, Danemark) ont été réalisés afin de confirmer l'appartenance des isolats aux sérogroupes recherchés. Pour les colonies qui avaient permis une agglutination, une galerie API 20E (Galerie API 20E, Biomérieux) a été ensemencée pour confirmer l'espèce *E. coli* et en parallèle un bouillon LB a été ensemencé avec la même souche. Les galeries API et les bouillons LB ont été incubés 24h à 37°C. Les galeries API 20E (Biomérieux) ont été interprétées et pour les souches qui étaient bien des *Escherichia coli*, la souche bactérienne a été conservée par congélation à -80°C pour la recherche ultérieure des facteurs de virulence associés aux EHEC.

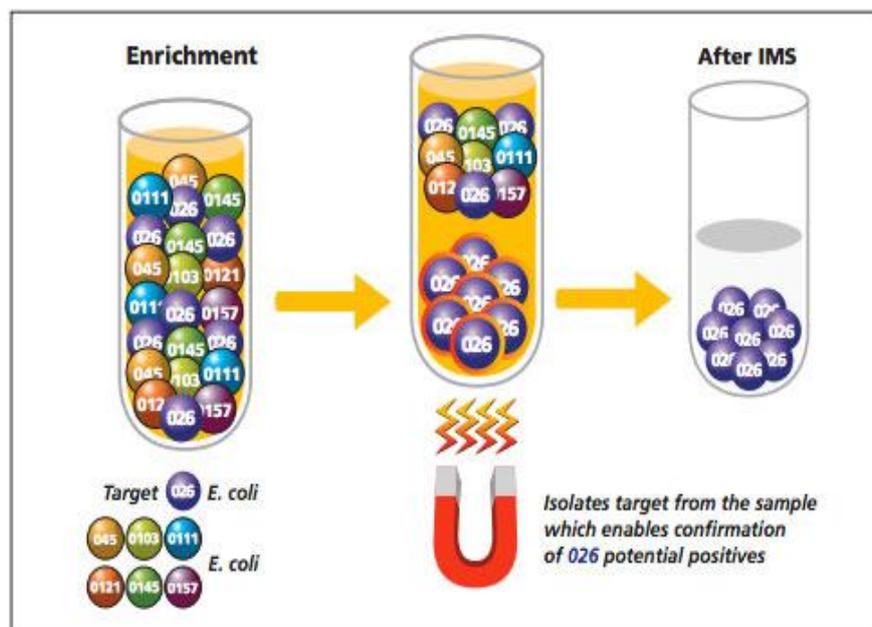


Figure 6.3. Schéma de la réaction d'immuno séparation magnétique

VI.6. Caractérisation génétique des souches *E. coli*

VI.6.1. Description des étapes de criblage

Afin de limiter le nombre d'extraction d'ADN et de recherches de gènes d'intérêt par PCR, le criblage par PCR des isolats de *E. coli* pour les gènes de virulence a été réalisé en trois étapes qui sont : (i) le criblage par demi-plaque, (i) le criblage par colonne et (i) le criblage par puits. Pour chaque étape, ont été analysés en parallèle un contrôle positif du gène recherché et un contrôle négatif.

VI.6.1.1. Criblage par demi-plaque

Pour chaque plaque de la collection, les souches conservées à -80°C ont été repiquées dans une nouvelle plaque de 96 puits dans 500 μL de bouillon LB par puits et incubées à 37°C sous agitation pendant une nuit. A partir des 48 bouillons incubés d'une demi-plaque, un pool de 960 μL de bouillon de culture a été constitué (20 μL de bouillon de culture par puits). Les 960 μL de suspension bactérienne ont été divisés en trois aliquots de 320 μL , 6 μL du bouillon de culture de la souche témoin positif ont été ajoutés au premier aliquot et 6 μL du bouillon de culture de la souche témoin négatif dans chacun des deux autres aliquots. Après extraction d'ADN des trois aliquots, le ou les gènes ont été amplifiés par PCR conventionnelle. Un pool est considéré comme positif si le premier aliquot donnait un signal positif pour le ou les gènes testés et les deux autres aliquots un signal positif pour au moins un des gènes recherchés

VI.6.1.2. Criblage par colonne

A partir d'une demi-plaque ayant donné un résultat positif, les colonnes concernées ont été poolées à raison de 40 μL par puits afin d'obtenir 320 μL de bouillon de culture pour chacune des 6 colonnes. Les gènes ont été amplifiés comme précédemment.

VI.6.1.3. Criblage par puits

De même pour une colonne ayant donné un signal positif pour au moins un des gènes, chaque puits a été testé individuellement. Un volume de 6 μL de suspension bactérienne de chaque puits a été repiqué dans 1 mL de bouillon LB et incubée à 37°C sous agitation pendant une nuit puis 320 μL de chaque bouillon ont été testés.

VI.6.2. Extraction de l'ADN

Pour les isolats testés par PCR, l'ADN a été extrait par lyse alcaline avec de la soude. 320µL de suspension bactérienne ont été centrifugés à 12 000 tr/min pendant 5 minutes. Après aspiration du surnageant 25µL de NaOH à 0,5 M (Prolabo) ont été ajoutés dans les tubes. Après avoir laissé la soude agir pendant 20 minutes à température ambiante (23°C), nous avons rajouté 25µL de Tris HCl pH = 7.4 à 1M (Sigma, Steinheim, Allemagne) et 450µL d'eau nanopure. Les 500µL de suspension d'ADN obtenus ont été conservés à -80°C.

VI.6.3. Criblage des facteurs de virulence des EHEC

Les EHEC typiques sont caractérisés par la présence de deux principaux facteurs de virulence qui sont les shigatoxines (STX) codées par les gènes *stx1* et *stx2* et l'intimine, le facteur d'attachement aux entérocytes codé par le gène *eae*. L'amplification génique a été réalisée par PCR triplex pour ces 3 facteurs de virulence des EHEC (*eae*, *stx1* et *stx2*) comme décrite par China *et al.* (85) sur l'ensemble des isolats des 12 campagnes de prélèvement et de la collection réalisée au Sénégal. La présence de chaque gène chez un isolat a été vérifiée individuellement par réaction PCR. La séquence des six amorces (*eaeA* B52, *eaeA* B53, *sltI* B54, *sltI* B55, *sltII* B56 et *sltII* B57), les amorces, les souches de référence et la taille attendue des fragments d'ADN amplifiés sont présentées dans le **Tableau 6.1**.

L'amplification génique a été effectuée dans un volume de 50µl contenant : 5µl d'ADN à analyser, 1X de tampon PCR (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH=8,8 à 25°C) (Biolabs, Herts, Royaume-Uni), 200µM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega, Madison, Etats-Unis), 1µM de chaque amorce (Biomers, Sequantia, Evry, France) et 1 U de *Taq* ADN polymérase (Biolabs). L'analyse par PCR comportait 30 cycles et pour chaque cycle on avait une dénaturation à 94°C pendant 30 s, suivie d'une hybridation à 52°C pendant 30 s et d'une élongation à 72°C pendant 30 s. Avant le premier cycle, l'échantillon a été dénaturé à 95°C pendant 5 min et après le dernier cycle, l'échantillon a subi une phase d'élongation à 72°C pendant 10 min. Dix microlitres de chaque amplifiat ont été déposés sur un gel d'agarose (Invitrogen) à 2% et ont subi une électrophorèse en tampon TAE 1X (Euromedex, Mundolsheim, France) pendant 30 à 45 min à 50 V (RunOneND, Embitec, San Diego, Etats-Unis). Les fragments d'ADN amplifiés ont été révélés après avoir été plongés dans un bain de bromure d'éthidium (Promega) à 2 mg/l pendant 15 min. La concordance du poids moléculaire du fragment

amplifié avec celui du fragment attendu a été vérifiée grâce à des marqueurs de poids moléculaire de 100 pb ou 1 kb (Biolabs) selon le poids moléculaire attendu.

Pathovar	Genes cibles	Amorces	Séquences (sens et anti-sens)	Témoin positif	Taille des amplicons	Référence
EHEC	<i>eae</i>	eae B52	AGGCTTCGTCACAGTTG	RIMD 0509952	570 Pb	(85)
		eae B53	CCATCGTCACCAGAGGA			
	<i>stx1</i>	SLT1 B54	AGAGCGATGTTACGGTTTG		388 Pb	
		SLT1 B55	TTGCCCCCAGAGTGGATG			
	<i>stx2</i>	SLTII B56	TGGGTTTTTCTTCGGTATC		807 Pb	
		SLTII B57	GACATTCTGGTTGACTATCTT			

VI.6.4. Recherche des facteurs de virulence des *E. coli* entéroagrégatives (EAEC)

Suite à l'épidémie de SHU de Mai 2011 survenue en Allemagne, les gènes des *E. coli* entéroagrégatives (EAEC) ont été recherchés sur les souches STEC de la collection et des souches après IMS appartenant aux sérogroupes associés aux EHEC. Les gènes *aggR*, *aap* et *AA*, marqueurs des souches EAEC (4) ont été recherchés par PCR en temps réel. Les souches O42 et O104 ont été utilisées comme témoins positifs (81). Les amorces utilisées pour la détection des gènes spécifiques aux EAEC sont représentées dans le **Tableau 6.2**. L'amplification génique a été effectuée dans un volume final de 50 µl contenant : du Tampon (Biorad) à 1X, 0,2mM de dNTP, 1mM de chaque amorce (Eurogentec), 1U de Taq polymérase et 5µL d'ADN. La PCR comporte 40 cycles et pour chaque cycle on a une dénaturation à 94°C pendant 45 s suivie d'une hybridation à 53°C pendant 45 s et d'une élongation à 68°C pendant 45 s.

Gènes	Amorces	Séquences sens et anti-sens	Taille produit (Pb)	Référence
<i>AA probe CVD 432</i>	EAEC1	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	629	(397)
	EAEC2	CAA TGT ATA GAA ATC CGCTGT T		
<i>aggR</i>	aggR1	CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA	457	
	aggR2	AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG		
<i>aap</i>	aap1	CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG	310	
	aap2	AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC		

VI.6.5. Criblage des facteurs de virulence des ExPEC

Les ExPEC se distinguent des bactéries commensales et des bactéries pathogènes intestinales par la possession d'un arsenal de facteurs de virulence qui leur sont propres (219). Ainsi, l'étude de la prévalence des souches porteuses des gènes associés aux ExPEC a été effectuée sur la collection d'isolats de la campagne 2 (1 248 isolats) du mois d'avril 2009 et la collection des souches isolées au Sénégal (540 isolats).

Les facteurs virulence des ExPEC sont des adhésines, des toxines, le système de captage du fer et les facteurs associés à la présence d'une capsule. Dans notre étude nous avons recherché les adhésines (*sfa/focDE*, *papEF*, *afa/draBC* et *f17A*), les toxines (*hlyA*, *hlyF*, *clbN* et *cnf*), la capsule (*kpsMT K1*) et le système de captage du fer (*fuyA*) (**Tableau 6.3**). Trois types de PCR ont été utilisés : une PCR triplex (*sfa/focDE* (260), *kpsMT K1* (222) et *hlyA* (222)), une PCR duplex (*papEF* (480)) et *afa/draBC* (222)) et trois PCR simplex (*clbN* (218), *f17A* (32) et *cnf* (480)). Les gènes *hlyF* et *fuyA* ont été recherchés sur les isolats exprimant au moins un gène parmi les premiers gènes criblés. Les souches de référence suivantes ont été utilisées comme témoins positif pour chaque gène : J96 pour la détection des gènes *sfa/focDE*, *hlyA*, *papEF* et *fuyA* (221), SP15 pour *kpsMT K1* et *hlyF* (217), A30 pour *afa/draBC* (222), IHE3034 pour *clbN* (242), 25KH9 pour *f17a-A* (157), S5 pour *f17b-A* et *cnf2* (413), 31A pour *f17c-A* (31), 111KH86 pour *f111* (29) et 28c pour *cnf1* (114). Les types de PCR avec les amorces utilisées pour la détection de ces différents gènes, les conditions de PCR et les souches de référence figurent dans le **tableau 6.3**. Par ailleurs, Les sous-types des gènes *cnfx* et *f17* ont été recherchés (**tableau 6.4**).

Tableau 6.3. Amorces utilisées pour la détection des gènes de virulence associés aux ExPEC et conditions PCR.											
Gènes cibles	Amorces	Sens et Anti-sens	Témoins positifs	Taille amplicons	Conditions PCR (°C/temps)					Références	
					Dénaturation	Hybridation	Elongation	cycles	Fin		
Simplex 1	<i>fl7A</i>	GCA GAA AAT TCA ATT TAT CCT TGG	<i>25KH9</i>	537	95/2 puis 95/45	56/45	72/1,5	35	72/10	(32)	
		CTG ATA AGC GAT GGT GTA ATT AAC									
Simplex 2	<i>cnf</i>	CAA TGG CAA CAA AAA TAC CTT	<i>28C</i>	1147	95/2 puis 95/45	56/45	72/1,5	35	72/10	(480)	
		GAA CGA CGT TCT TCA TAA GTA TC									
Simplex 3	<i>clbN</i>	GTT TTG CTC GCC AGA TAG TCA TTC	<i>IHE3034</i>	733	95/2 puis 95/45	56/45	72/1,5	35	72/10	(212)	
		CAG TTC GGG TAT GTG TGG AAG G									
Duplex	<i>papEF</i>	GCA ACA GCA ACG CTG GTT GCA TCA T	<i>J96</i>	336	94/4 puis 94/1	63/0,5	72/2	30	72/7	(480)	
		AGA GAG AGC CAC TCT TAT ACG GAC A									
	<i>afa/draBC</i>	GGC AGA GGG CCG GCA ACA GGC	<i>A30</i>	559							(222)
		CCC GTA ACG CGC CAG CAT CTC									
Triplex	<i>kpsMT (K1)</i>	TAG CAA ACG TTC TAT TGG TGC	<i>SP15</i>	153	94/4 puis 94/1	63/0,5	72/2	30	72/7	(222)	
		CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA									
	<i>hlyA</i>	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T	<i>J96</i>	1177							(222)
		ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A									
	<i>sfa/focDE</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	<i>J96</i>	410							(480)
		CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A									
Simplex	<i>FyuA^a</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA	<i>J96</i>	880	94/4 puis 94/1	63/0,5	72/2	30	72/7	(222)	
		CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA									
	<i>HlyF^a</i>	TGC TTT AGG GTG CTT ACC TTC AAC	<i>SP15</i>	444	95/2 puis 95/45	56/45	72/1,5	35	72/10	(321)	
		TTT GGC GGT TTA GGC ATT CC									

Tableau 6.4. Amorces utilisées pour le sous-typage des gènes *f17* et *cnf*.

Gènes cibles	Amorces	Sens et Anti-sens	Témoins positifs	Taille amplicons	Conditions PCR (°C/temps)					Références
					Dénaturation	Hybridation	Elongation	cycles	Fin	
<i>cnf1</i>	8 (U1843)	GGG GGA AGT ACA GAA GAA TTA	28c	1112	95/2 puis 95/0,75	56/0,75	72/1,5	35	72/10	(454)
	9 (L2939)	TTG CCG TCC ACT CTC ACC AGT								
<i>cnf2</i>	(U1831)	TAT CAT ACG GCA GGA GGA AGC ACC	S5	1240	95/2 puis 95/0,75	58/0,75	72/1,5	30	72/10	
	15 (L3071)	GTC ACA ATA GAC AAT AAT TTT CCG								
<i>cnf3</i>	312	ACG TAA TTA GCA AAG ATG AAC A	Hosp27	300	95/2 puis 95/0,75	56/0,75	72/1,5	35	72/10	
	313	ACA CCA TAA AAA GTA GAA CCA T								
<i>F17c-A/gafA</i>	P2	CTG ATA AGC GAT GGT GTA ATT AAC	31A	416	94/5 puis 94/2	55/1	72/2	25	72/7	
	P5	GCA GGA ACC GCT CCC TTG GC								
<i>F17 a- A</i>	P2	CTG ATA AGC GAT GGT GTA ATT AAC	25KH9	321						
	P3	GCT GGA AGG GTG CAA TAC GCC TG								
<i>F17 b- A</i>	P2	CTG ATA AGC GAT GGT GTA ATT AAC	S5	323						
	P4	CAA CTA ACG GGA TGT ACA GTT TC								
<i>F111-A</i>	P2	CTG ATA AGC GAT GGT GTA ATT AAC	111KH86	239						
	P6	GAT AGT CAT AAC CTT AAT ATT GCA								

VI.6.6. Etude des souches productrices de BLSE

L'étude de la prévalence des *E. coli* productrices de BLSE a portée sur la campagne de prélèvement n° 2. L'étude a été réalisée en trois étapes qui sont : le criblage des souches *E. coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) céfotaxime et ceftazidime, l'identification des BLSE par Etest et la recherche des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* et *bla_{CTX-M}* associés.

VI.6.6.1. Criblage des souches *E. coli* productrices de BLSE

Les souches de la campagne 2 (1248 isolats) ont été repiquées sur gélose Mueller Hinton (MH) ne contenant pas d'antibiotique et sur gélose MH contenant des C3G : céfotaxime (CTX) et ceftazidime (CAZ), à la concentration de 1 µg/ml. Après incubation à 37°C pendant 24 h, les souches résistantes qui ont poussé en présence des C3G sont confirmées *E. coli* par test en galerie API 20E. Les souches confirmées *E. coli* sont repiquées sur gélose MH sans antibiotique.

VI.6.6.2. Etude phénotypique des BLSE

Les souches *E. coli* productrices de BLSE ont été identifiées par Etest pour céfotaxime et ceftazidime en association avec de l'acide clavulanique, suivant les instructions du fabricant (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les souches *E. coli* ATCC 25922 et *K. pneumonia* ATCC 700603 ont été utilisées comme contrôle positif.

VI.6.6.3. Etude moléculaire des BLSE

Les gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* et *bla_{CTX-M}* ont été recherchés par PCR. Les gènes *bla_{SHV}* et *bla_{CTX-M}* ont été amplifiés à partir des amorces précédemment décrites par (38, 393) et le gène *bla_{SHV}* à partir des amorces sens et antisens respectivement 5'-AGATCGGCGACAACGTCAC-3' et 5'-TCATTCAGTTCCGTTTCCCAG-3'. Les gènes *bla_{TEM}* ont été amplifiés et séquencés comme décrit précédemment (97). La paire d'amorces 5'-ATA AAA TTC TTG AAG AC-3' et 5' -TTA CCA ATG CTT AAT CA-3' a été utilisée pour l'amplification de la séquence de 1076-bp du gène *bla_{TEM}* (284). Les gènes *bla_{CTX-M}* ont été séquencés pour identifier les différents groupes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25 (393). Les produits de PCR ont été purifiés par le kit « Min Elute PCR Purification KIT » (Qiagen, The Netherlands). Les séquences ont été générées par l'appareil ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, USA) avec le kit « BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit » (Applied

Biosystems,USA). Les souches *E. coli* JS238 (pOFX326) fournies par Olivier Fayet (CNRS-LMGM-UMR5100, France), *E. coli* 6UZ4 (provenant de notre collection), *E. coli* 149 77-3018-11 and *S. Virchow* 75-22438-1 fournies par Lisbeth Andersen (National Food Institute, Denmark), ont été utilisées comme contrôle.

VI.7. Caractérisation des souches *E. coli* porteuses des gènes de virulence et/ou productrices de BLSE

VI.7.1. Sous-typage des gènes *stx*

Pour chacune des deux grandes classes de Shigatoxines, il existe un certain nombre de variants. Ainsi, les variants du gène *stx1* (*stx1a*, *stx1c* et *stx1d*) et les variants du gène *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*) ont été recherchés sur les isolats de *E. coli* *stx*⁺ de l'ensemble des 12 campagnes et des souches détectées par IMS et appartenant aux 5 sérogroupes associés aux EHEC. L'amplification des gènes qui codent pour les variants des gènes *stx1* et *stx2* a été réalisée par PCR conventionnelle comme décrite précédemment par Scheutz (402). Les amorces et les souches de référence utilisées sont représentées dans le **Tableau 6.5**.

Le sous-typage de *stx1* a été réalisé en triplex (*stx1a*, *stx1c* et *stx1d*). L'amplification génique a été effectuée dans un volume de 25µl contenant : 5 µl d'ADN à analyser, 12 µl de Master Mix (HotStart, Qiagen), 1 µl (5 µM) pour les 4 amorces de *stx1c* et *stx1d* et 2 µl (5 µM) pour les amorces de *stx1a*.

Le sous-typage de *stx2* a été effectué en simplex (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*) et pour chaque amplification, un volume de 20 µl dont 5 µl d'ADN à analyser, 10 µl de Master Mix (HotStart, Qiagen) et 2,5 µl (5 µM) de chaque amorce a été utilisé. Le programme de PCR comporte 35 cycles avec trois étapes pour l'ensemble des sous-types: une dénaturation à 94°C pendant 50 s, une hybridation à 62°C pendant 40 s et une élongation 72°C pendant 60 s.

Dix microlitres de chaque amplifiat ont été déposés sur un gel d'agarose (Agatabs, Eurogentec) à 1,5%. Les amplicons ont été déposés dans les puits du gel. Deux microlitres de tampon de charge 6X sont mélangés avec 10µl d'échantillon et du marqueur de poids moléculaire 1Kb (Biolabs) puis déposés. Ils ont subi une électrophorèse en tampon TAE 1X (Euromedex, Mundolsheim, France) pendant 30 à 45 min à 50 V (RunOneND, Embitec, San

Diego, Etats-Unis). Les fragments d'ADN amplifiés ont été révélés après avoir été plongés dans un bain de bromure d'éthidium (Promega) à 2 mg/l pendant 5 min. La concordance du poids moléculaire du fragment amplifié avec celui du fragment attendu a été vérifiée grâce à des marqueurs de poids moléculaire de 100 pb ou 1 kb (Biolabs) selon le poids moléculaire attendu.

Tableau 6.5. Les amorces, les souches de références et la taille des l'amplicons attendue pour le sous-typage de *stx1* et *stx2*

Type PCR	Amorces	Sequences (sens et anti-sens)	Témoins positifs	Taille amplicons
sous-type <i>stx1</i>	stx1a-F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	EDL933	478
	stx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		
	stx1c-F1	CCTTTCCTGGTACAACCTGCGGTT	DG131/3	252
	stx1c-R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA		
	stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	MH1813	203
	stx1d-R2	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA		
sous-type <i>stx2</i>	stx2a-F2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	94C	349
	stx2a-R3	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG		
	stx2a-R2	GGCCACCTTCACTGTGAATGTG		
	stx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	EH250	251
	stx2b-R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG		
	stx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	31	177
	stx2c-R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA		
	stx2d-F1	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	C165-02	179
	stx2d-R1	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG		
	stx2d-R2	GCCTGATGCACAGGTACTGGAC		
	stx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	S1191	411
	stx2e-R2	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT		
	stx2f-F1	TGGGCGTCATTCCTGTTG	T4/97	424
	stx2f-R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC		
	stx2g-F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	7v	573
	stx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT		

VI.7.1. Recherche des variants du gène *eae*

Le typage des gènes codant pour l'intimine a été effectué sur les isolats de *E. coli eae+* des 12 campagnes et des souches détectées par IMS et appartenant aux 5 sérogroupes associés aux EHEC majeurs par une PCR quadruplex en temps réel pour la détection des variants: *eaeβ*, *eaeβ1*, *eaey1*, *eaes* et *eaey2/θ* comme décrit par Madic *et al.* (287). Des tests par PCR simplex et multiplex ont ensuite été réalisés pour la détection des cinq protéines flagellaires

fliC (fliCH2, fliCH7, fliCH8, fliCH11 et fliCH28) retrouvées respectivement pour les sérotypes O103:H2, O157:H7, O111:H8, O26:H11 et O145:H28 (287).

VI.7.2. Identification des souches EPEC

Pour mettre en évidence des souches EPEC typiques capables de synthétiser à la fois l'intimine et le "bundle forming pili", nous avons cherché le gène *bfp* sur toutes les souches *eae*-positives des 12 campagnes de prélèvement en France et de la collection du Sénégal par PCR conventionnelle. Les amorces, EP1 : 5'- AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC -3' et EP2 : 5'- GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA -3' ont été utilisées comme décrit précédemment (139, 167).

VI.7.3. Classification phylogénétique

Pour les isolats de *E. coli* positifs au moins à un des gènes de virulence étudiés et/ou productrices de BLSE, leur classe phylogénétique a été recherchée par une PCR triplex (**tableau 6.6**). Les gènes : *chuA* qui est impliqué dans le transport de l'hème, *yjaA* dont le rôle est inconnu et *TspE4C2* qui est un fragment aléatoire d'ADN ont été utilisés. Cette méthode décrite par Clermont et al. (87) permet de classer les *E. coli* en quatre groupes : A, B1, B2 et D.

VI.7.4. Etude de l'antibiorésistance des souches d'intérêt

L'étude de la résistance phénotypique a été effectuée sur les souches porteuses de gènes de virulence associés aux EHEC et ExPEC ; des souches productrices de BLSE et sur 80 souches de la collection du Sénégal choisies de façon aléatoire. La technique de diffusion en milieu gélosé a été utilisée et les antibiogrammes ont été effectués selon les normes CLSI (91) sur gélose Mueller-Hinton (Bio-Rad Laboratories). La souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche contrôle. Les 16 antibiotiques (Bio-Rad Laboratories) testés dans notre étude étaient les suivants : ampicilline, amoxicilline + d'acide clavulanique, céphalothine, ceftazidime, céfotaxime, céfépime, céfuroxime, streptomycine, gentamicine, kanamycine, acide nalidixique, ciprofloxacine, tétracycline, chloramphénicol, triméthoprime et sulfonamides (**Tableau 6.7**). Les seuils de sensibilité pour tous les antimicrobiens sont ceux recommandés par le CLSI (90, 92). Les isolats ont été classés comme multirésistants quand ils présentaient une résistance à au moins trois classes d'antibiotiques (410).

Tableau 6.6. Les amorces, les souches de références, la taille des amplicons attendue et les programmes de PCR.							
Famille antibiotique, gène de virulence genes, intégrons et groupes phylogenetique	Gènes	Séquence amorces (5'-3')		Taille Amplicons (bp)	Hybridation (°C)	Contrôles positifs	Référence
		Sens	Anti-sens				
Bêta-lactamines	<i>bla_{TEM}</i>	TTCCTGTTTTGCTCACCCAG	CTCAAGGATCTTACCCTGTTG	112	60	JS238(pOFX326)	(37)
Sulfamides	<i>sulI</i>	TGGTGACGGTGTTCGGCATTG	GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG	789	62	Se 131/AJ238350	(391, 431)
	<i>sulII</i>	CGGCATCGTCAACATAACC	GTGTGCGGATGAAGTCAG	722	53	Se 678/ EF090911	(304, 431)
	<i>sulIII</i>	CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTG	CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	990	53	U39	(357, 431)
Phénicolés	<i>floR</i>	CACGTTGAGCCTCTATAT	ATGCAGAAGTAGAACGCG	868	55	BN10660 ^c	(391)
	<i>cmlA</i>	TGTCATTTACGGCATACTCG	ATCAGGCATCCCATCCCAT	455	57	1587 pcmlA ^c	
	<i>catI</i>	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547	53	BM14 R55 IncC ^c	(304)
	<i>catII</i>	ACACTTTGCCCTTTATCGTC	TGAAAGCCATCACAATACTGC	543	50	BM21 Rsa IncW ^c	
	<i>catIII</i>	TTCCGCGTGAGCATTTTG	TCGGATGATTATGGGCAAC	286	59	HB101 pUC CATIII ^c	
Tétracycline	<i>tet(A)</i>	TTGTTCTGAAGTGCCAGTAA	GACGTCGTTGAGTGAACCAGA	370	50	UA064 BM13/RP4 ^d	(165, 432)
	<i>tet(B)</i>	CTCAGTATTCCAAGCCTTTG	CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	435	53	UA228 BM13/pIP69 ^d	
Streptomycine	<i>strA-strB</i>	TATCTGCGATTGGACCCTTGG	CATTGCTCATCATTGATCGGCT	538	60	Se 678/ EF090911	(430, 431)
	<i>aadA1</i>	GAGAACATAGCGTTGCCTTGG	TCGGCGCGATTTTGCCGGTTAC	198	53	Se 131/ AJ238350	
Intégrons	<i>Int1</i>	GGGTCAAGGATCTGGATTTG	ACATGGGTG TAAATCATCGTC	483	60	Se 131/AJ238350	(164, 305, 431)
	<i>Int2</i>	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	788	60	pR67 ^e	
Groupe phylogénétique	<i>chuA</i>	GACGAACCA ACGTTCAGGAT	TGCCGCCAGTACC AAAGACA	279	55	EcoR62/EcoR47	(87)
	<i>yjaA</i>	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	ATGGAGAATGCGTTCTCAAC	211	55	EcoR58	
	<i>TspEA.C2</i>	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	CGCGCAACAAAGTATTACG	152	55	EcoR20	

La présence de gènes majeurs de résistance aux antibiotiques bêta-lactamines (*bla_{TEM}*), les sulfamides (*sulI*, *sulII* et *sulIII*), phénicolés (*Flor*, *ACDM*, *CatI*, *catII* et *catIII*); streptomycine spectinomycine (*strA-strB* et *aadA1*), la tétracycline (*tetA* et *tetB*) et la présence des gènes de l'intégrase *intI1* et *intI2* a été étudiée dans les souches résistantes, en utilisant des amorces spécifiques et les souches de contrôle de *E. coli* présentées dans le **tableau 6.6** (38).

Tableau 6.7. Antibiotiques utilisés pour caractériser la résistance phénotypique des souches de *E. coli* et charge des disques d'antibiotique.

Familles antibiotiques	Antibiotiques	Charge des disques
Aminoglycosides	Gentamicine (GEN)	10µg
	Kanamycine (KAN)	30µg
	Streptomycine (STR)	10µg
β-lactamines	Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC)	20µg + 10µg
	Céfotaxime (CTX)	30µg
	Ceftazidime (CAZ)	30µg
	Céphalothin (CF)	30µg
	Céfuroxime (CXM)	30µg
	Céfepime (FEP)	30µg
	Ampicilline (AM)	10µg
Sulfamides (inhibiteur des folates)	Sulfonamides (SSS)	300µg
	Triméthoprim (TMP)	5µg
Phénicolés	Chloramphénicol (C)	30µg
Quinolones	Ciprofloxacine (CIP)	5µg
	Acide Nalidixique (NA)	30µg
Tétracyclines	Tétracycline (TE)	30µg

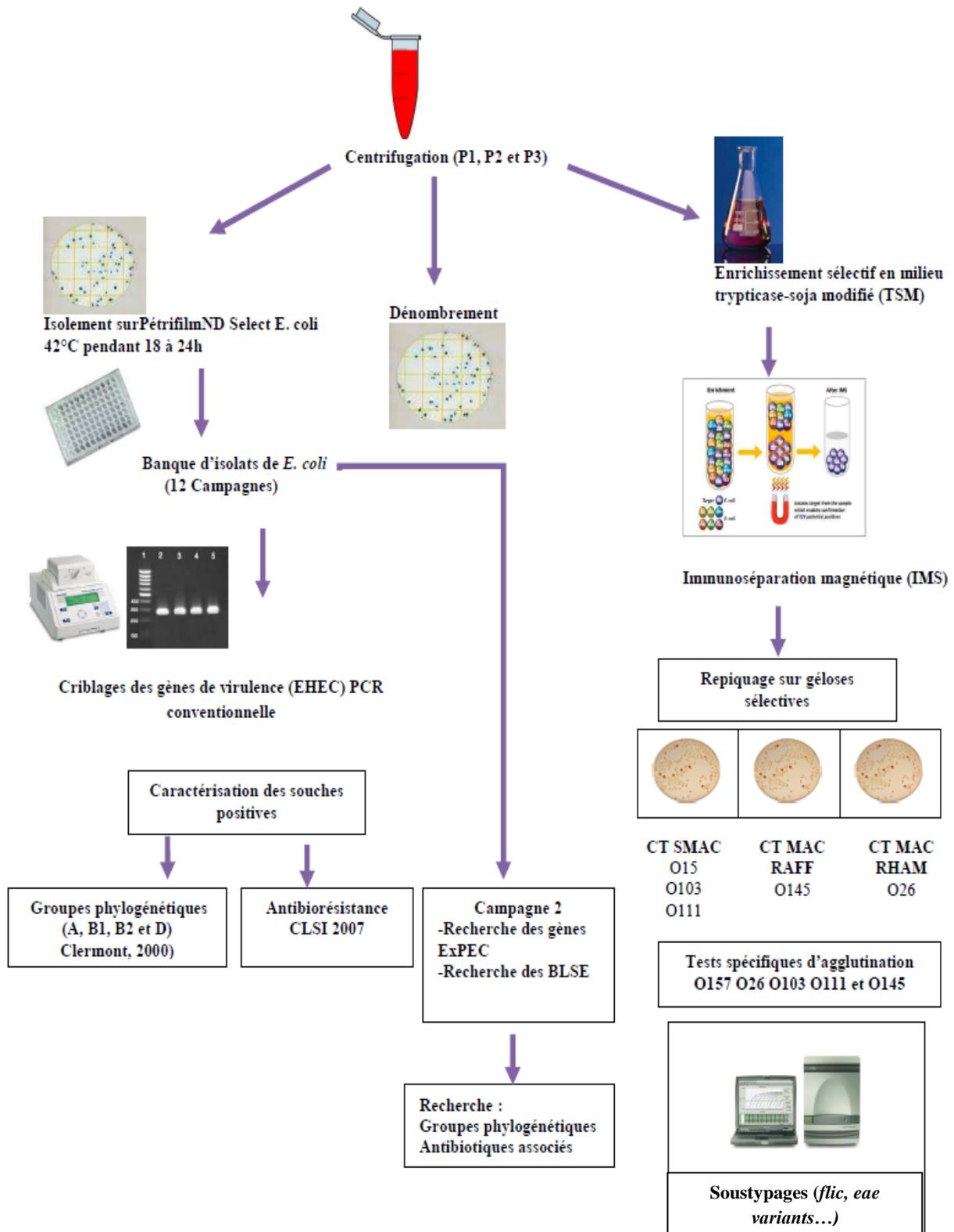


Figure 6.4. Démarche expérimentale

CT SMAC: cefixime-tellurite-sorbitol-MacConkey

CT MAC RAFF : cefixime-tellurite-MacConkey (CT-MAC) base + raffinose à 10g/L

CT MAC RHAM : cefixime-tellurite-MacConkey (CT-MAC) base + rhamnose à 10g/L

Chapitre 7 : PRESENTATION DES RESULTATS

VII.1. Résultats obtenus en France

VII.1.1. Dénombrement des entérobactéries et *E. coli*

Le prélèvement P1 (eaux usées urbaines), représentatif des *E. coli* portées par la communauté humaine et le prélèvement P2 (effluents de l'abattoir), représentatif des *E. coli* portées par les animaux d'élevage ont été réalisés avant leur arrivée à la STEP de façon à avoir une bonne séparation entre les eaux usées urbaines et les effluents de l'abattoir. Le dénombrement des entérobactéries et des *E. coli* a été réalisé sur les 3 types de prélèvements : Entrée de la STEP (P1), Sortie de l'abattoir (P2) et Sortie de la STEP (P3) pour l'ensemble des campagnes. Ce dénombrement a permis d'évaluer les taux de contamination des différents effluents et de déterminer s'il y avait ou non des périodes de plus forte contamination au cours de l'année. Le débit à la sortie de l'effluent traité était de l'ordre de 17 000 m³/24 h et les effluents d'abattoir contribuaient en moyenne à hauteur de 1,7%. Les résultats de dénombrement montrent que la charge en entérobactéries et *E. coli*   tait relativement constante au cours de l'année (**Figures 7.1** et **Figure 7.2**). Les eaux usées urbaines contenaient beaucoup plus de *E. coli* que l'effluent de l'abattoir. L'effluent de l'abattoir a en effet subi un pré-traitement (dégrillage + traitement physico-chimique) qui permet de diminuer d'un facteur 100 la population initiale de *E. coli*. Le taux de contamination de l'effluent de l'abattoir était comparable à l'effluent de sortie rejeté dans l'environnement qui contenait en moyenne 1,5 x 10² *E. coli* UFC/mL.

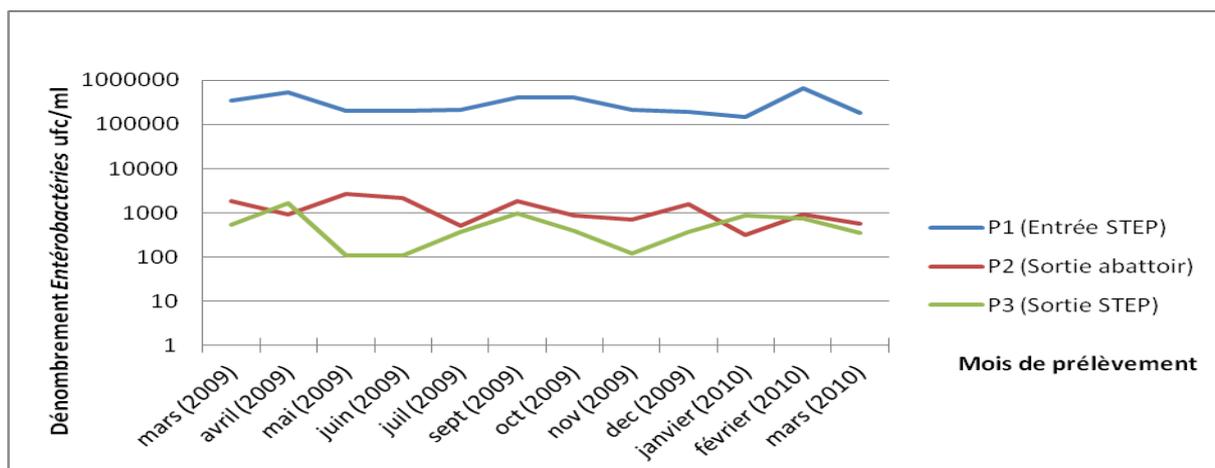


Figure 7.1. Dénombrement mensuel des entérobactéries en fonction des types de prélèvement.

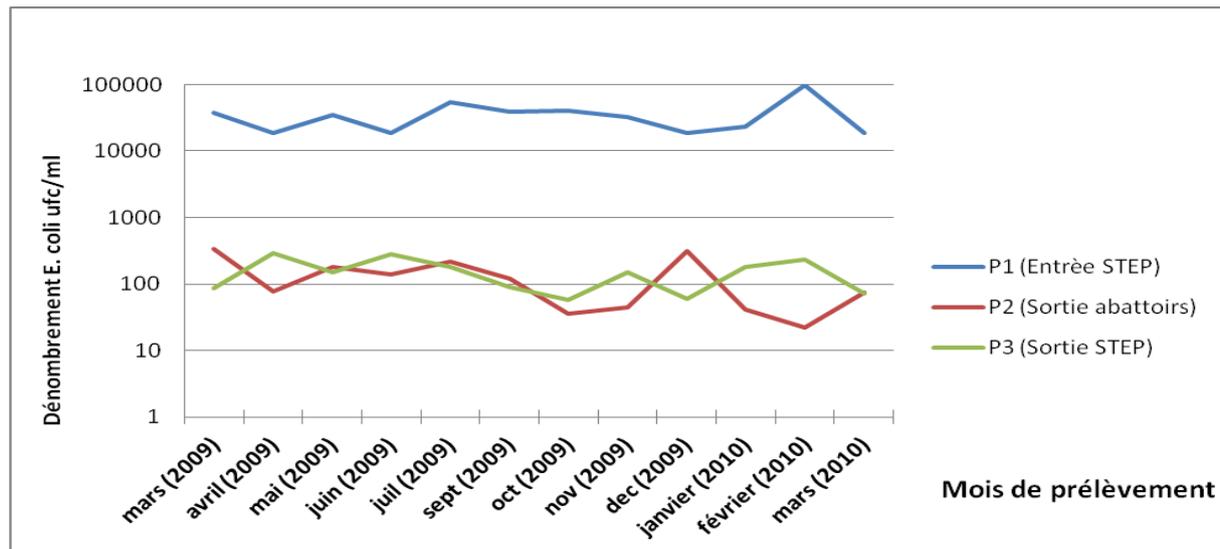


Figure 7.2. Dénombrement mensuel des *E. coli* en fonction des types de prélèvement

VII.1.2. Présence des facteurs de virulence associés aux EHEC

Cette partie de notre travail a permis de répondre aux objectifs visant à déterminer la prévalence des EHEC dans les effluents d'origine humaine et animale et la caractérisation des souches porteuses de gènes de virulence associés aux EHEC. Par ailleurs, l'analyse de l'effluent traité et rejeté dans la rivière, nous a permis de vérifier une éventuelle dissémination de ces souches dans l'environnement.

VII.1.2.1. Prévalence des gènes associés aux EHEC dans les effluents.

Une collection de 14 976 isolats de *E. coli* des 12 campagnes de prélèvement a été testée pour la recherche des 3 principaux gènes de virulence associés aux EHEC. Au cours des repiquages des isolats de *E. coli* de la collection initiale, seuls 14 717 isolats dont 4 943, 4920 et 4854 respectivement en P1, P2 et P3 ont pu être remis en culture. La recherche des gènes *eae*, *stx1* et *stx2*, codant pour les trois principaux facteurs de virulence des EHEC, sur ces isolats a fait l'objet d'un criblage par PCR multiplex. Les résultats montrent que tous les gènes de virulence recherchés ont été retrouvés au moins une fois sur l'ensemble des campagnes. Le criblage des 14 717 souches a permis d'identifier 140 souches de *E. coli* portant un ou des gènes de virulence dont 31 souches *stx*⁺ (STEC), 108 *eae*⁺ (« Attaching Effacing *E. coli* » (AEEC)) et une souche *stx*⁺ et *eae*⁺ (potentiellement EHEC), soit une prévalence globale de 0,95%. Les résultats par point de prélèvement sont présentés dans le **tableau 7.1**. Par ailleurs, le **tableau 7.2** de la répartition saisonnière des souches de *E. coli* portant des gènes de

virulence montre un nombre plus important de souches de *E. coli* porteuses du gène *eae* pendant l'automne et du gène *stx2* pendant l'été.

Tableau 7.1. *E. coli* porteuses de gènes *stx* et/ou *eae* par point de prélèvement.

Pathotypes	Gènes cibles	P1 (Eaux usées) (n=4943)	P2 (Abattoir) (n=4920)	P3 (Rejet final) (n=4854)	Total (N=14 717)
STEC ¹	<i>stx1</i>	2 (0.04%)	1 (0.02%)	5 (0.10%)	8 (0.05%)
	<i>stx2</i>	6 (0.12%)	10 (0.2%)	4 (0.08%)	20 (0.13%)
	<i>stx1/stx2</i>	3 (0.06%)	0 (0)	0 (0)	3 (0.02%)
	Sous-total	11 (0.2%)	11(0.2%)	9 (0.1%)	31 (0.2%)
AEEC ²	<i>eae</i>	31 (0.56%)	46 (0.93%)	31 (0.60%)	108 (0.73%)
pEHEC ³	<i>eae/stx1</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0.02%)	1 (0.01%)
	Total	42 (0.8%)	57 (1.15%)	41 (0.80%)	140 (0.95%)

¹STEC « Shiga-toxin producing *E. coli* » Souches *E. coli* exprimant *stx1* et/ou *stx2* ;

²AEEC « Attaching Effacing *E. coli* » Souches *E. coli* exprimant le gène *eae* ;

Tableau 7.2. Répartition des *E. coli* porteuses de gènes de virulence associés aux EHEC en fonction des saisons

Campagnes	Saisons	Gènes de virulence associés aux EHEC (nombre de souches)					Total
		<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae/stx</i>	<i>Stx1/stx2</i>	
C1	Printemps (2009)	11	2	1	0	0	30
C2		6	0	1	0	1	
C3		7	0	1	0	0	
C4	Été (2009)	7	1	2	0	0	27
C5		11	0	6	0	0	
C6	Automne (2009)	9	0	2	0	0	42
C7		8	0	1	0	0	
C8		20	0	1	1	0	
C9	Hiver (2009)	9	0	1	0	0	31
C10		9	1	2	0	0	
C11		4	3	2	0	0	
C12	Printemps (2010)	7	1	0	0	2	10
Total		108	8	20	1	3	140

VII.1.2.2. Les sérogroupes majeurs associés aux EHEC

Des immuno-séparations magnétiques (IMS) ont été réalisées sur les 12 campagnes de prélèvements après enrichissement afin de rechercher les 5 sérogroupes d'intérêt (O26, O103, O111, O145 et O157) dans les effluents à l'entrée de la STEP, à la sortie des abattoirs et au rejet final de la STEP. Parmi les souches sélectionnées et testées, les résultats montrent que sur l'ensemble des campagnes, 79 souches de *E. coli* se sont avérées positives pour l'un des 5 sérogroupes recherchés (**Tableau 7.3**). Tous les sérogroupes ont été retrouvés au moins une

fois. Le sérogroupes O103 était le plus fréquemment isolé. Malgré le traitement effectué au niveau de la STEP, on note un rejet de souches *E. coli* appartenant aux 5 principaux sérogroupes associés aux EHEC dans l'environnement. Aucune souche des sérogroupes O26, O103, O111 et O145 n'appartenait aux 4 sérotypes associés aux EHEC typiques majeurs et ne possédait ni le gène *eae* ni le gène *stx*. Parmi les souches *E. coli* O157 identifiées par IMS et rejetées dans l'environnement, 4 souches dont 3 souches isolées pendant l'été et 1 souche pendant l'automne étaient du sérotype O157:H7 et portaient les gènes *eae* et *stx2* en association.

Sites de prélèvement	Sérogroupes				
	O111	O26	O103	O145	O157
P1 (Entrée STEP)	8 (10.1)	3 (3.8)	7 (8.9)	0 (0)	3 (3.8)
P2 (Sortie Abattoir)	18 (22.7)	5 (6.3)	12 (15.2)	0 (0)	3 (3.8)
P3 (Sortie STEP)	6 (7.6)	1 (1.3)	7 (8.9)	2 (2.5)	4 (5.0)
TOTAL	32 (40.5)	9 (11.4)	26 (33.0)	2 (2.5)	10 (12.6)

Campagnes	Saisons	Sérogroupes (échantillons positifs)				
		O157	O26	O103	O111	O145
C1	Printemps (2009)	-	-	-	-	-
C2		+	+	-	+	-
C3		-	-	+	+	+
C4	Eté (2009)	+	-	+	+	-
C5		-	-	-	+	-
C6	Automne (2009)	-	+	+	+	-
C7		+	+	+	+	-
C8		+	+	+	+	-
C9	Hiver (2009)	-	+	-	+	-
C10		+	-	-	+	-
C11		-	+	+	+	-
C12	Printemps (2010)	-	+	+	+	-
Total		5	7	7	11	1

VII.1.2.3. Caractérisation des souches *eae*⁺ et/ou *stx*⁺

VII.1.2.3.1. Les variants du gène *eae*

Les variants *eaeβ1*, *eaeγ1*, *eaeθ* et *eaeε* ont été recherchés sur les souches *E. coli* porteuses du gène *eae* de la collection de souches des 12 campagnes de prélèvement. Sur 113 souches *eae*⁺ dont 109 détectées par criblage de la collection et 4 détectées après PCR des souches appartenant aux 5 sérogroupes majeurs, 53 souches avaient un des quatre variants. Les autres

souches n'avaient pas les variants recherchés dans notre étude. La répartition des variants de du gène *eae* en fonction des points de prélèvement est présentée dans le **tableau 7.5**. Le variant *eaeβ1* était majoritaire (49%) dont 39,6 % étaient d'origine animale.

Points de prélèvement	<i>eaeβ1</i>	<i>eaeγ1</i>	<i>eaeθ</i>	<i>eaeε</i>	Total
P1 (Entrée STEP)	2 (3,7)	0 (0)	2 (3,7)	1 (1,8)	5 (9,4)
P2 (Sortie Abattoir)	21 (39,6)	3 (5,6)	10 (18,8)	4 (7,5)	38 (71,6)
P3 (Sortie STEP)	3 (5,6)	4 (7,5)	3 (5,6)	0 (0)	10 (18,8)
Total	26 (49,0)	7 (13,2)	15 (28,3)	5 (9,4)	53 (100)

Par ailleurs, la recherche du gène *bfp* caractéristique des souches EPEC typiques montre que ce gène était absent des souches *eae*-positives des 12 campagnes. Ce qui signifie que les souches AEEC n'étaient pas des EPEC typiques.

VII.1.2.3.2. Soustypage des gènes *stx1/stx2*

Les variants du gène *stx1* (*stx1a*, *stx1c* et *stx1d*) et les variants du gène *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*) ont été recherchés sur 35 souches *stx*⁺ dont 31 détectées par criblage de la collection et 4 détectées après PCR des souches appartenant aux 5 sérogroupes majeurs. Les résultats montrent que le variant *stx1a* était le plus présent (31.2%) parmi les souches *stx*⁺ et aucune des souches ne portait les variants *stx1d*, *stx2f* et *stx2g*. Un faible nombre de souches *stx*⁺ a été isolé dans les effluents d'abattoir et le variant *stx2e* était majoritaire parmi les souches d'origine animale (**Tableau 7.6**).

Points de prélèvement	variants <i>stx1</i>		Variants <i>stx2</i>					Total
	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	
P1 (Entrée STEP)	5 (15,6)	0 (0)	2 (6,25)	2 (6,25)	1 (3,1)	3 (9,3)	1 (3,1)	14 (43,7)
P2 (Sortie Abattoir)	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (12,5)	5 (15,6)
P3 (Sortie STEP)	4 (12,5)	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	4 (12,5)	4 (12,5)	0 (0)	13 (40,6)
Total	10 (31,2)	1 (3,1)	2 (6,25)	2 (6,25)	5 (15,6)	7 (21,8)	5 (15,6)	32 (100)

VII.1.2.3.3. Détermination des sérotypes

Les cinq sérotypes majeurs associés aux EHEC (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O111:H8 and O103:H2) ont été recherchés sur les 140 souches STEC, AEEC ou pEHEC de la collection totale, par PCR en temps réel avec les souches contrôles et les conditions de PCR décrits précédemment (287, 355, 356). Dans les effluents urbains d'origine humaine, seul le

sérogroupe O103 a été trouvé mais les souches n'étaient pas du sérotype O103:H2. Au contraire, dans l'effluent d'abattoir on a trouvé les sérogroupe (O157, O103, O26 et O145) et à la sortie de la STEP les sérogroupe (O103, O26 et O111) (**Figure 7.3**). La presque totalité de ces sérogroupe a été retrouvée chez des souches AEEC. La seule souche *eae*⁺/*stx*⁺ isolée à partir du criblage par PCR conventionnelle au niveau de la sortie de la STEP était du sérotype O111:H8 (**Figure 7.4**).

La caractérisation du gène flagellaire *fliC* sur les souches appartenant aux 5 sérogroupe recherchés montre que les sérotypes associés à la maladie due aux EHEC étaient présents dans les effluents de l'abattoir et dans les effluents traités et rejetés dans l'environnement. Par contre, aucun des sérotypes n'était retrouvé dans les eaux usées de la ville. Les souches *stx*⁺ n'appartenaient à aucun des sérogroupe recherchés (**Tableau 7.4**).

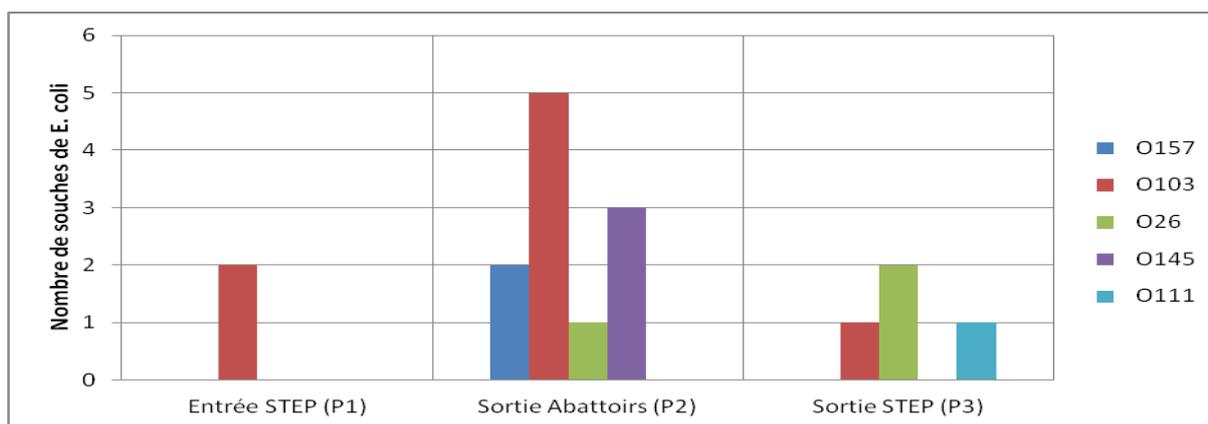


Figure 7.3. Répartition des sérogroupe en fonction des sites de prélèvement

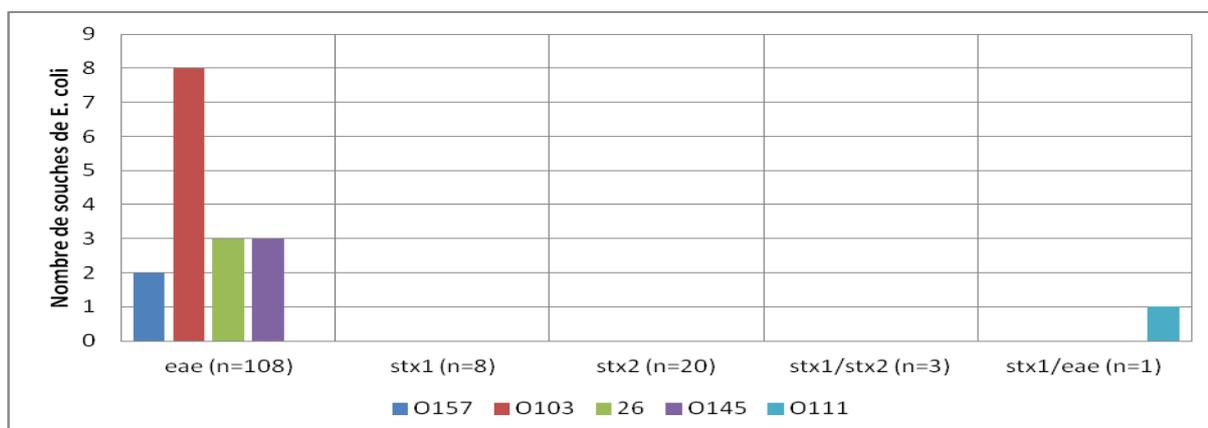


Figure 7.4. Association des gènes de virulence et des sérogroupe majeurs
n= nombre de souches testées pour chaque gène de virulence.

VII.1.2.3.4. Classification phylogénétique des souches porteuses de gènes associés aux EHEC

La répartition phylogénétique des souches AEEC, STEC et pEHEC a été recherchée par PCR. La **figure 7.5** montre la distribution des souches *E. coli* porteuses de gènes associés aux EHEC en fonction des groupes phylogénétiques. Le groupe B1 était majoritaire avec 41% suivi des groupes A (28%), B2 (27%) et D (4%). Cette répartition est différente en tenant compte des sites de prélèvement : Dans les eaux usées urbaines, nous avons isolé plus de souches B2, à l’abattoir plus de souches B1, tandis qu’au niveau de la sortie de la STEP, la répartition est quasi égale entre B1 et B2 (**Figure 7.5**). Dans le groupe des AEEC le groupe B1 est majoritaire suivi du groupe B2. Les souches STEC étaient majoritairement du groupe A. La seule souche potentiellement EHEC retrouvée au niveau de la sortie de la STEP était du groupe B1 (**Figure 7.6**).

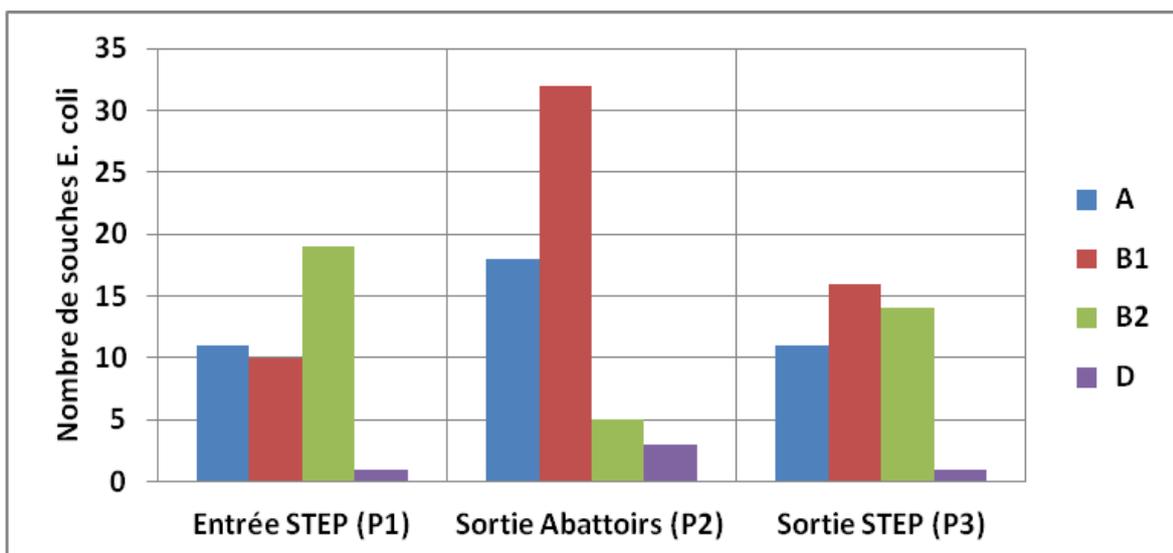


Figure 7.5. Distribution des groupes phylogénétiques en fonction des points de prélèvement.

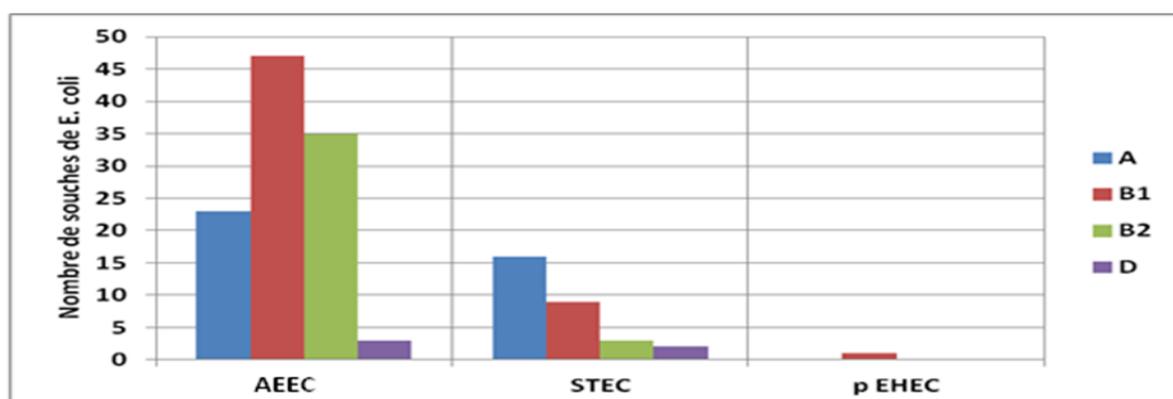


Figure 7.6. Répartition des pathotypes dans les différents groupes phylogénétiques

VII.1.2.3.5. La résistance aux antibiotiques des souches *eae*⁺ et/ou *stx*⁺

a) Résistance phénotypique

L'étude de la résistance phénotypique des 140 souches *eae*⁺ et/ou *stx*⁺ a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé. Les antibiogrammes ont été effectués selon les normes CLSI (91) sur gélose Mueller-Hinton (Bio-Rad Laboratories). Parmi les 140 souches testées, 43,5% des souches étaient résistantes au moins à un antibiotique et 64% de ces souches résistantes avaient une origine animale et seulement 16% étaient isolées des effluents humains. Le profil de résistance des souches a permis de déterminer le pourcentage de souches résistantes pour chaque antibiotique, la majorité des souches était résistante à la tétracycline (56%), aux sulfamides (28%), à la streptomycine (24%), à l'ampicilline (23%) et au triméthoprime (21%) (**Figure 7.7**). Le nombre de souches porteuses des gènes *eae*⁺ et/ou *stx*⁺ et résistantes aux antibiotiques était plus élevé dans les effluents d'abattoir que les effluents urbains (71% contre 24%). 70% de ces souches d'origine animale étaient résistantes aux tétracyclines contre 20% provenant des effluents urbains. Après traitement à la STEP, le nombre de souches résistantes aux tétracyclines a considérablement baissé dans les effluents destinés à être rejetés dans le milieu extérieur. La souche pEHEC était résistante au tétracycline. Le nombre de souches résistantes à l'ampicilline enregistré dans les effluents traités était supérieur à ceux observés dans les effluents de la ville et des abattoirs (**Figure 7.8**). Le nombre de souches multi résistantes (résistantes au moins à 5 antibiotiques) était légèrement plus élevé dans les effluents urbains et les effluents traités que dans les effluents d'origine animale (**Figure 7.9**).

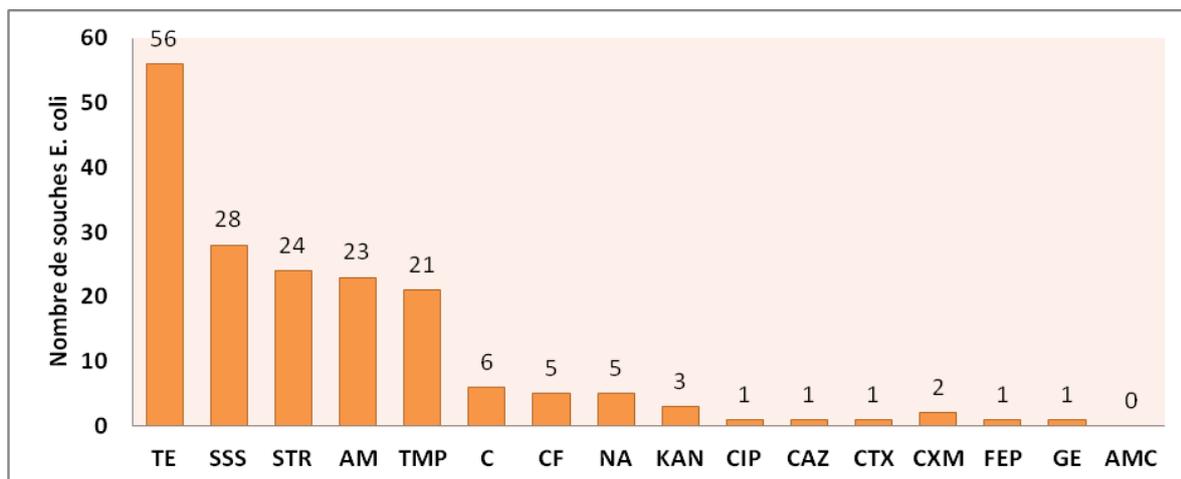


Figure 7.7. Nombre de souches résistantes en fonction des antibiotiques

AM : ampicilline, CXM : céfuroxime, STR : streptomycine, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, C : chloramphénicole, KAN : kanamycine, GE : gentamycine, CIP : ciproflaxacine, CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, CTX : céfotaxime et CF : céphalotine

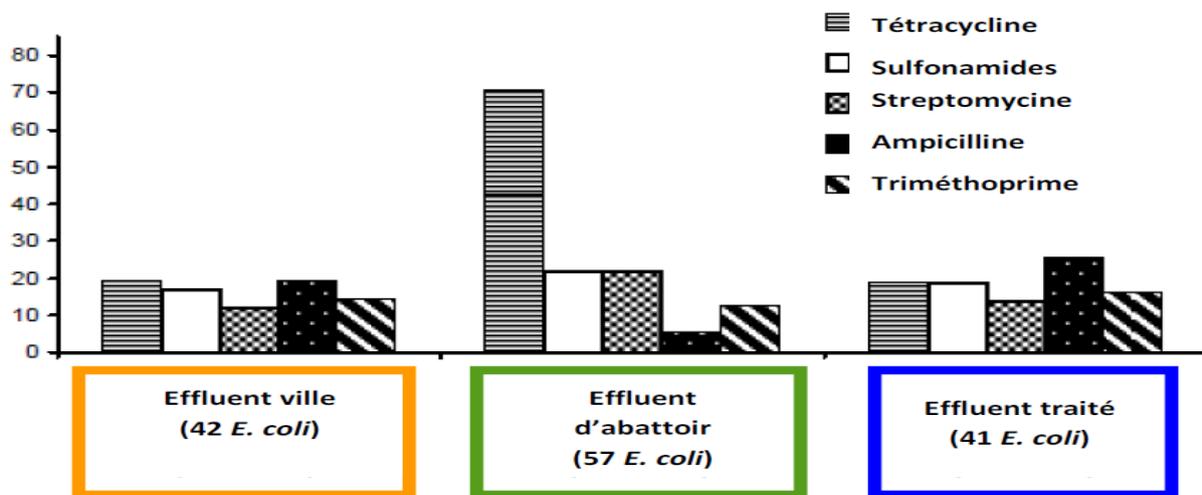


Figure 7.8. Résistance par antibiotique et par point de prélèvement

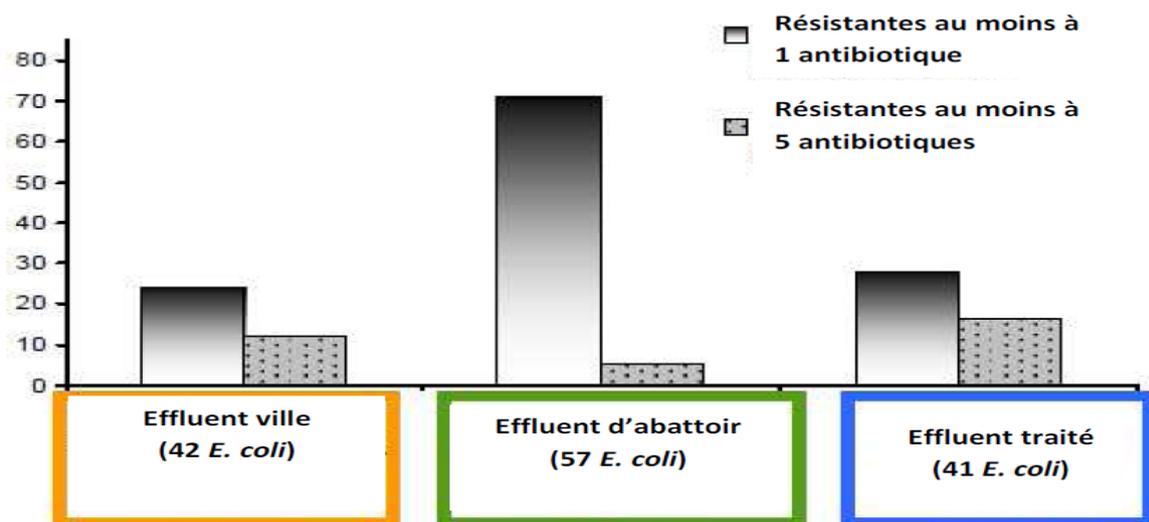


Figure 7.9. Profil de résistance des souches en fonction du nombre d'antibiotique

b) Résistance génotypique

Le gène de résistance *Bla*_{TEM} a été recherché sur 23 souches résistantes à l'ampicilline et les gènes *sul1*, *sul2* et *sul3* sur les souches résistantes aux sulfonamides (n=27). Les résultats montrent que 16% des souches résistantes à l'ampicilline exprimaient le gène *Bla*_{TEM} dont 100% des souches de *E. coli* d'origine humaine, 67% des souches *E. coli* d'origine animale et 55% des souches rejetées dans l'environnement. Par ailleurs, on note que 76% des souches AEEC ampicilline résistantes et 50% des souches STEC ampicilline résistantes portaient le gène *Bla*_{TEM}. Concernant les souches sulfonamides résistantes, le gène *sul2* était beaucoup

plus présent (41%), *sull* était moyennement présent (26%) et le gène *sul3* était quasiment absent (3%). Les seuls cas où nous avons observé ce dernier, c'était en association avec *sull*.

Tableau 7.6. Caractéristiques des 5 sérotypes majeurs trouvés dans les effluents d'abattoir et le rejet final				
Points de prélèvement	Sérotypes	Gènes de virulence	Groupes Phylogénétiques	Résistance phénotypique ^a
Effluents abattoir (P2)	O103H2	<i>eae</i>	B1	S
	O103H2	<i>eaeε, hlyA</i>	B1	S
	O103H2	<i>eaeε, hlyA</i>	B1	AM, SSS, TMP
	O26H11	<i>eaeε, hlyA</i>	B1	S
	O103:H2	<i>eaeε, hlyA</i>	A	S
	O145H28	<i>eaeγ1, hlyA</i>	B2	S
	O145H28	<i>eaeγ1, hlyA</i>	A	AMP, TE, SSS, TMP
	O103H2	<i>eae</i>	B2	S
	O145H28	<i>eaeγ1, hlyA</i>	A	S
Effluents traités (P3)	O111H8	<i>eaeθ, stx_{1a}, hlyA</i>	B1	TE
	O26:H11	<i>eaeβ1, hlyA</i>	D	S
	O103H2	<i>eaeβ1</i>	B1	S
	O26H11	<i>eaeβ1</i>	A	TE
	O157:H7	<i>eaeγ1, stx_{2c}/hlyA</i>	D	S
	O157:H7	<i>eaeγ1, stx_{2c}/hlyA</i>	D	S
	O157:H7	<i>eaeγ1, stx_{2c}/hlyA</i>	D	S
	O157:H7	<i>eaeγ1, stx_{2c}/hlyA</i>	D	S

^a AM : ampicilline, STR : streptomycine, NA : Acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, S : sensible.

VII.1.3. Présence des souches EAEC

A la suite de l'épidémie de 2011 en Allemagne et en France où une souche d'*E. coli* O104:H4 possédant à la fois un gène *stx* et les gènes caractéristiques des *E. coli* entéroagréatives (EAEC) a été incriminé, les gènes *aggR*, *aap* et *AA*, marqueurs des *E. coli* entéroagréatives ont été recherchés par PCR en temps réel sur les 35 souches STEC de la collection. Aucune de ces souches ne portait les gènes *aggR*, *aap* et *AA*.

VII.1.4. Etude des souches ExPEC

Cette partie du travail a permis de répondre aux objectifs visant d'une part à déterminer la prévalence et les caractéristiques des souches ExPEC dans les effluents de la ville et des effluents d'abattoir et d'autre part à identifier le réservoir des souches ExPEC. La recherche des souches porteuses de gènes de virulence associés aux ExPEC a été réalisée sur les isolats de la campagne n°2. Les résultats de la recherche des gènes associés aux ExPEC montrent que sur les 1 248 souches testées, 91 étaient porteuses d'au moins un gène associé aux ExPEC (soit une prévalence globale de 7,3%). La distribution de ces souches par point de prélèvement est indiquée dans le **tableau 7.7**. La prévalence des gènes de virulence recherchés était plus élevée au niveau des effluents urbains (26,9%) et en sortie de la STEP (13,2%). Par contre, au niveau des effluents d'abattoir la prévalence était faible (2,6%). Le gène *papEF* avait une prévalence globale plus élevée 3,3%. Ensuite viennent les gènes *clbN* (2,8%), *K1* (2,4%), *sfa/focDE* (2,1%) et *hlyA* (1,5%). Les autres gènes avaient des prévalences relativement plus faibles. Le sous-typage des souches positives pour la famille de gènes *cnf* (*cnf1*, *cnf2* et *cnf3*) montre que toutes les souches isolées à l'entrée et la sortie de la STEP étaient de sous-type *cnf1* alors que l'unique souche isolée à l'abattoir était de sous-type *cnf2*. Le sous-typage de *f17* (*f17-a*, *f17-b*, *f17-c* et *f111*) montre une majorité de *f17-c* dans les effluents à l'entrée de la STEP (5 contre 1 *f111*). En sortie de la STEP, les résultats étaient plus hétérogènes : une souche possédait *f17-c*, une autre *f111* et deux souches possédaient à la fois *f17-c* et *f111*. On note une absence de souche *f17* et *afa/draBC* dans les effluents d'abattoir.

VII.1.4.1. Association des gènes de virulence

En absence de définition conventionnelle d'une souche ExPEC, les souches exprimant en association au moins trois gènes parmi les gènes associés aux ExPEC criblés (*papEF*, *sfa/focDE* *afa/draBC*, *cnfx*, *f17*, *hlyF*, *hlyA*, *clbN*, *fuyA* and *kpsMT* (*K1*)) ont été considérées comme souches potentiellement ExPEC (pExPEC). Lors des mises au point des PCR multiplex nous avons pu constater que les gènes *fyuA* et *hlyF* avaient tous deux des prévalences élevées, ils ont été recherchés sur les souches possédant au moins un des huit autres gènes. Ainsi, parmi les 91 souches porteuses au moins d'un gène associé aux ExPEC, 60 souches portaient au moins trois gènes de virulence et les 31 autres souches exprimaient moins de 3 gènes de virulences (**Tableau 7.9**). Les souches d'origine humaine représentaient

87.17% (34/39) des souches potentiellement ExPEC. Par contre le pourcentage des souches potentiellement ExPEC parmi les souches d'origine animale était faible 12.83% (5/39). Il faut noter par ailleurs que près de 5% de souches potentiellement ExPEC étaient rejetées dans l'environnement. Nous avons identifié 14 ExPEC dans les effluents de la ville et les effluents traités porteuses au moins 5 gènes de virulence (**cf infra**) (**Tableau 7.12**).

Tableau 7.7. Prévalence des gènes de virulence en fonction des points de prélèvements.

Familles	Gènes ciblés	Points de prélèvement ^a		
		Entrée STEP (n=416)	Entrée Abattoir (n=416)	Sortie STEP (n=416)
Adhesines	<i>papEF</i>	6.2% (26)	0.7% (3)	3.1% (13)
	<i>sfa/focDE</i>	3.8% (16)	0.4% (2)	2.1% (9)
	<i>afa/draBC</i>	0.7% (3)	0% (0)	0.9% (4)
	<i>f17</i>	1.4% (6)	0% (0)	0.7% (3)
	<i>f17a</i>	0.2% (1)	0% (0)	0% (0)
	<i>f17c</i>	1.2% (5)	0% (0)	0.7% (3)
	<i>f111</i>	0% (0)	0% (0)	0.4% (2)
Toxines	<i>hlyA</i>	3.6% (15)	0.2% (1)	0.7% (3)
	<i>clbN</i>	5.0% (21)	0.4% (2)	2.8% (12)
	<i>cnfx</i>	0.7% (3)	0.2% (1)	0.7% (3)
	<i>cnf1</i>	0.7% (3)	0% (0)	0.7% (3)
	<i>cnf2</i>	0% (0)	0.2% (1)	0% (0)
	<i>cnf3</i>	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Protectines	<i>K1</i>	5.2% (22)	0.4% (2)	1.6% (7)
Total		26.9% (112)	2.6% (11)	13.2% (55)

^a Les valeurs entre parenthèses donnent le nombre de souches de *E. coli* étudiées pour chaque point de prélèvement et pour chaque gène le nombre de souches portant le gène recherché.

Tableau 7.8. Distribution des souches potentiellement ExPEC (≥ 3 des gènes recherchés) et des souches portant moins de 3 gènes en fonction des points de prélèvement.

Pathotypes ^a	Points de prélèvement			Total (n=1248)
	Entrée STEP (n=416)	Sortie Abattoir (n=416)	Sortie STEP (n=416)	
Autres (< 3 gènes)	5.5% (23)	0.4% (2)	1.4% (6)	2.4% (30)
PExPEC (≥ 3 gènes)	8.1% (34)	1.2% (5)	5% (21)	4.8% (61)
Total	13.7% (57)	1.6% (7)	6.5% (27)	7.2% (91)

^a les souches *E. coli* porteuses de 3 à plus de gènes de virulence sont considérées pExPEC et les souches *E. coli* porteuses de moins de 3 gènes sont appelées « Autres »

VII.1.4.2. Caractérisation des souches porteuses de gènes associés aux ExPEC

VII.1.4.2.1. Classification phylogénétique des souches porteuses de gènes associés aux ExPEC.

Dans le but de préciser le pouvoir pathogène des souches, une fois le criblage des gènes de virulence ExPEC effectué, nous avons déterminé les groupes phylogénétiques des 91 souches d'intérêt (porteuses d'au moins un des gènes recherchés). Le **tableau 7.10** présente la répartition des différents groupes phylogénétiques en fonction des points de prélèvement. La majorité des souches en provenance des effluents humains et des effluents à la sortie de la STEP appartenaient au groupe B2 et dans une moindre mesure au groupe D.

Groupes phylogénétiques	Points de prélèvement ^a			Total (n=91)
	Entrée STEP (n=57)	Sortie Abattoir (n=7)	Sortie STEP (n=27)	
A	12,3% (7)	42,9% (3)	11,1% (3)	14% (13)
B1	5,3% (3)	0% (0)	11,1% (3)	6% (6)
B2	59,6% (59,6)	42,9% (3)	59,3% (16)	59% (53)
D	22,8 (13)	14,3% (1)	18,5% (5)	21% (19)

^a Les valeurs entre parenthèses donnent le nombre de souches de *E. coli* portant d'au moins un gène de virulence associé aux ExPEC pour chaque point de prélèvement et pour chaque groupe phylogénétique le nombre de souches appartenant au groupe.

Les souches pExPEC appartenaient à 82% au groupe B2, 13% au groupe D et 5% au groupe A. Aucune souche pExPEC n'a été classée dans le groupe B1 (**Figure 7.10 B**). La répartition des souches ayant moins de 3 gènes de virulence semblait être différente ; en effet, sur ces 30 souches, la répartition était la suivante : A (33%), B1 (20%), B2 (10%) et D (36.6%) (**Figure 7.10 A**). Les souches potentiellement virulentes (avec plus de 3 gènes) étaient donc significativement associées au groupe B2 et de manière moindre au groupe D alors qu'une plus grande proportion de souches moins virulentes se répartissait dans les groupes A et B1. La prévalence des souches pExPEC étant nettement plus élevée dans les effluents d'origine humaine, c'est dans ce réservoir que nous avons retrouvé aussi plus de souches du groupe B2. Les 14 ExPEC porteuses de plus de 5 gènes de virulence appartenaient toutes au groupe B2 (**Tableau 7.12**).

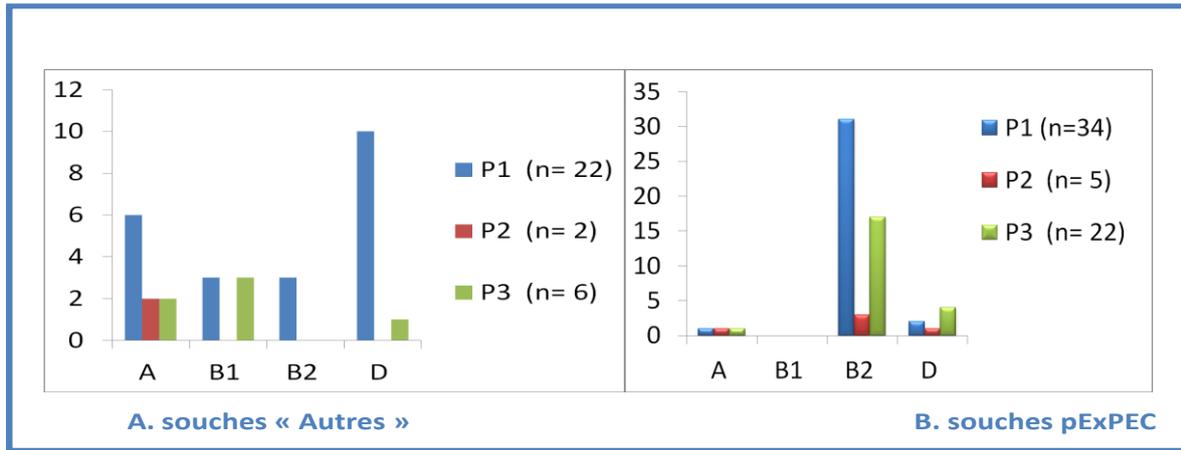


Figure 7.10. Comparaison de la virulence et du groupe phylogénétique des souches d’*E. coli* portant des gènes de virulence des ExPEC (Autres : < 3 gènes, pExPEC : ≥ 3 gènes)

VII.1.4.2.2. Etude phénotypique de l’antibiorésistance des souches porteuses de gènes de virulence associés aux ExPEC

La résistance aux antibiotiques a été recherchée sur les 91 souches exprimant au moins un gène de virulence associé aux ExPEC. La **Figure 7.11** montre le nombre de souches résistantes pour chaque antibiotique testé. Sur les 91 souches testées, le plus grand nombre de souches résistantes a été observé pour l’ampicilline (53%), les sulfonamides (48%), la streptomycine (40%) et la tétracycline (38%). L’analyse par point de prélèvement montre un profil quasiment identique de résistance des souches sauf au niveau du réservoir animal où aucune souche résistante à l’ampicilline ni à l’association amoxicilline + acide clavulanique n’a été isolée (**Tableau 7.10**).

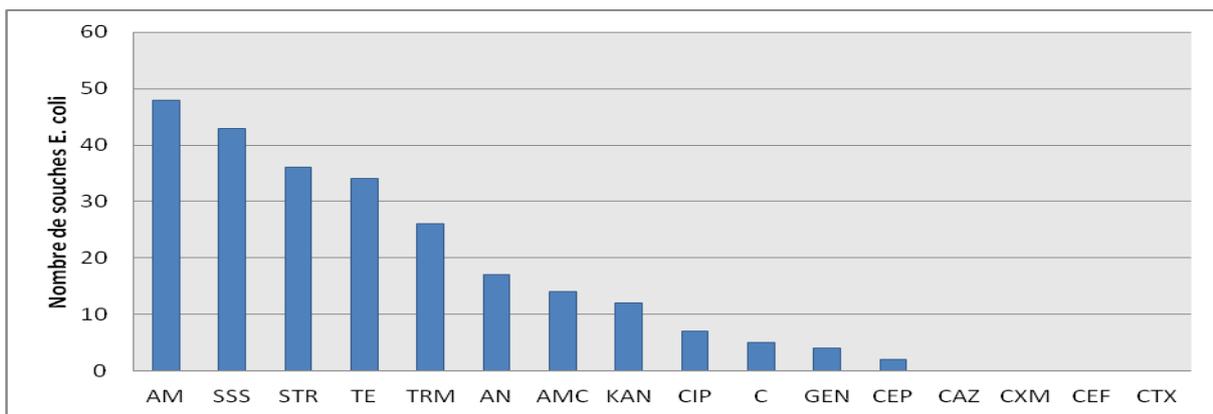


Figure 7.11. Nombre de souches de *E. coli* possédant au moins un gène de virulence des ExPEC résistantes pour chaque antibiotique testé.

AM : ampicilline, CXM : céfuroxime, STR : streptomycine, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, C : chloramphénicole, KAN : kanamycine, GEN : gentamycine, CIP : ciproflaxacine, CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, CTX : céfotaxime et CF : céphalotine.

Tableau 7.10. Pourcentage de souches « ExPEC » résistantes par antibiotique et en fonction des points de prélèvement.

Familles	Antibiotiques ^a	Points de prélèvement ^b		
		Entrée STEP (n=57)	Sortie Abattoir (n=7)	Sortie STEP (n=27)
Aminoglycosides	GEN	7% (4)	0% (0)	0% (0)
	KAN	11% (6)	14% (1)	19% (5)
	STR	40% (23)	43% (3)	37% (10)
β-lactamines	AMC	23% (13)	0% (0)	4% (1)
	CTX	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	CAZ	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	CF	0% (0)	0% (0)	7% (2)
	CXM	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	FEP	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	AM	54% (31)	0% (0)	59% (17)
Sulfamides	SSS	47% (27)	43% (3)	48% (13)
(Inhibiteur des folates)	TMP	32% (18)	14% (1)	26% (7)
Phénicols	C	9% (5)	0% (0)	0% (0)
Quinolones	CIP	9% (5)	0% (0)	7% (2)
	NA	21% (12)	14% (1)	15% (4)
Tétracyclines	TE	39% (22)	43% (3)	33% (9)

^a AM : ampicilline, CXM : céfuroxime, STR : streptomycine, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, C : chloramphénicole, KAN : kanamycine, GEN : gentamycine, CIP : ciproflaxacine, CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, CTX : céfotaxime et CF : céphalotine.

^b Les valeurs entre parenthèses donnent le nombre de souches de *E. coli* portant d'au moins un gène de virulence associé aux ExPEC pour chaque point de prélèvement et pour chaque antibiotique le nombre de souches résistantes.

VII.1.4.2.3. Etude génétique de l'antibiorésistance des souches *E. coli* associées aux ExPEC.

Le **tableau 7.12** montre les prévalences des gènes de résistance des 58 souches résistantes au moins à un antibiotique. Le gène *bla_{TEM}* avait la plus forte prévalence 67,2% suivit de *sulIII* (50%), *sulI* (32,7%), *tetA* (29,3%), *strA-strB* (24,1%), *tetB* (22,4%) et *aadA* (22,4%). Les gènes *sulIII*, *cmlA*, *catII* et *catIII* étaient absents sur l'ensemble des souches résistantes. L'intégron *int1* était majoritaire et présent dans 45% des souches résistantes contre 8,5% pour l'intégron *int2*. Par contre, chez les souches d'origine animale 50% des souches résistantes portaient l'intégron *int2* contre 25% des souches qui portaient *int1*.

Tableau 7.11. Pourcentage de souches porteuses du gène de résistance résistantes en fonction des points de prélèvement.

Familles antibiotiques	Gènes	Points de prélèvement			
		P1 (n=35)	P2 (n=4)	P3 (n=19)	Total (n=58)
Beta-lactamines	<i>bla_{TEM}</i>	83% (29)	0% (0)	52.6% (10)	67.2% (39)
Sulfamides	<i>sulI</i>	40% (14)	25% (1)	21% (4)	32.7% (19)
	<i>sulII</i>	48.5% (17)	75% (3)	47.3% (9)	50% (29)
	<i>sulIII</i>	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Phénicolés	<i>floR</i>	3% (1)	0% (0)	0% (0)	1.7% (1)
	<i>cmlA</i>	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	<i>catI</i>	14.2% (5)	0% (0)	0% (0)	8.6% (5)
	<i>catII</i>	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	<i>catIII</i>	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Tétracycline	<i>tet(A)</i>	34.2% (12)	0% (0)	26.3% (5)	29.3% (17)
	<i>tet(B)</i>	20% (7)	75% (3)	16% (3)	22.4% (13)
	<i>strA-strB</i>	31.4% (11)	25% (1)	10.5% (2)	24.1% (14)
Streptomycine	<i>aadA</i>	23% (8)	50% (2)	16% (3)	22.4% (13)
	<i>dfrA</i>	17.1% (6)	25% (1)	5.2% (1)	14% (8)
Intégrons	<i>int1</i>	51.4% (18)	25% (1)	37% (7)	45% (26)
	<i>int2</i>	0% (0)	50% (2)	5.2% (1)	8.5% (3)

VII.1.4.2.4. Comparaison virulence et résistance des souches ExPEC

La comparaison entre la virulence et la résistance des souches montre que le nombre de souches résistantes étaient plus élevé parmi les souches ayant moins de gènes virulence (« Autres ») que les souches potentielles ExPEC (pExPEC). Autrement dit, plus la souche avait de gènes de virulence moins elle était multirésistante (**Figure 7.12**). Les souches pExPEC étaient plus sensibles aux antibiotiques testés.

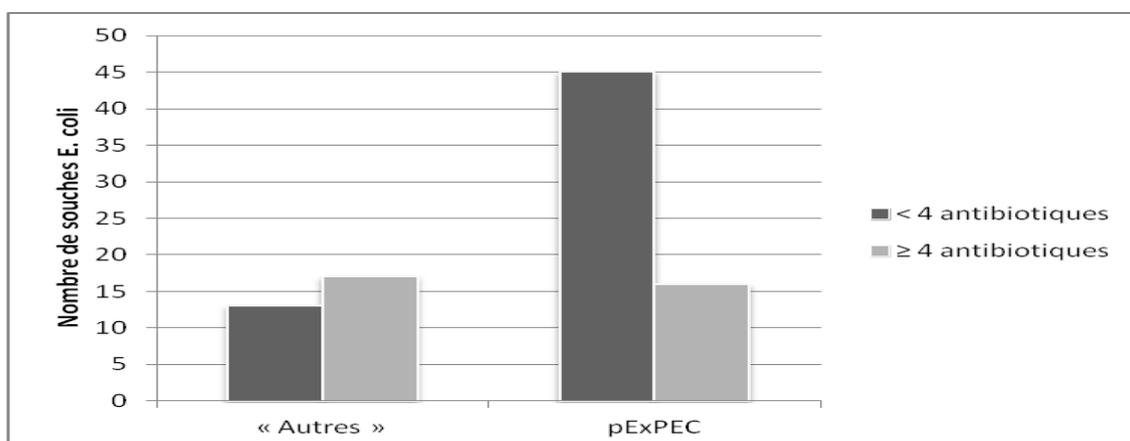


Figure 7.12. Comparaison de la virulence et de la résistance des ExPEC (Autres : < 3 gènes, pExPEC : ≥ 3 gènes)

Tableau 7.12. Caractérisation des souches ExPEC porteuses d'au moins 5 gènes de virulence				
Codes souches	Gènes de virulence	Groupes Phylogenetiques	Résistance phénotypique ^a	Résistance génotypique
Effluents urbains				
M41	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN, K1</i>	B2	AMC AM SSS	<i>bla_{TEM}, sulII</i>
M46	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN</i>	B2	AMC AM STR SSS	<i>bla_{TEM}, sulII</i>
M50	<i>fyuA, hlyA, sfa/focDE, clbN, K1, hlyF, cnfI</i>	B2	AMC AM STR TE SSS	<i>bla_{TEM}, tetA, aadA, sulI, intI</i>
M52	<i>fyuA, hlyA, sfa/focDE, clbN, cnfI</i>	B2		
M60	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN, K1</i>	B2	AMC AM	<i>bla_{TEM}</i>
M61	<i>fyuA, papEF, hlyA, clbN, K1</i>	B2		
M64	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN</i>	B2		
M66	<i>fyuA, papEF, sfa/focDE, clbN, K1</i>	B2	AM	
M75	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN, K1</i>	B2	AM KAN STR TE SSS	<i>bla_{TEM}, tetA, strA-strB, sulII</i>
M83	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN</i>	B2		
M94	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN, cnfI</i>	B2		
Effluents traités				
M116	<i>fyuA, papEF, sfa/focDE, clbN, cnfI</i>	B2	AM STR SSS	<i>bla_{TEM}, sulII</i>
M120	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN, cnfI</i>	B2		
M122	<i>fyuA, papEF, hlyA, sfa/focDE, clbN</i>	B2	AM	<i>bla_{TEM}</i>

^a AM : ampicilline, STR : streptomycine, SSS : sulfonamides, TE : tétracycline AMC : amoxicilline acide clavulanique.

VII.1.5. Prévalence des *E. coli* productrices de BLSE

Cette partie du travail a permis de répondre aux objectifs visant d'une part à déterminer la prévalence et les caractéristiques des souches *E. coli* productrices de BLSE dans les effluents de la ville et les effluents d'abattoir et d'autre part à identifier la possibilité de dissémination de ces souches dans l'environnement. Les *E. coli* productrices de BLSE ont été recherchées dans la collection constituée au cours de la campagne n° 2. Parmi les 1 248 souches testées, 9 souches de *E. coli* productrices de BLSE ont été détectées dont 7 souches dans les effluents de la ville et 1 souche dans chacun des effluents d'abattoir et des effluents traités rejetés dans l'environnement (**Tableau 7.13**). Parmi les 7 *E. coli* productrices de BLSE isolées dans les effluents d'origine humaine, le gène *bla_{TEM-52}* a été détecté sur 6 souches, tandis que le gène *bla_{CTX-M-14}* a été isolé sur une seule souche. Par ailleurs, les 2 souches de *E. coli* productrices de BLSE détectées à l'abattoir et au rejet final portaient le gène *bla_{CTX-M-1}*. Le gène *bla_{SHV}* était absent parmi les *E. coli* productrice de BLSE. La majorité des souches productrices de BLSE (8 souches sur les 9) étaient multirésistantes, portaient la classe 1 d'intégron et appartenaient au groupe phylogénétique A. Cependant, elles sont toutes sensibles à l'imipenem. Enfin, une souche *eae+* (M4) isolée dans les effluents de la ville était productrice de BLSE.

Tableau 7.13. Caractéristiques des souches <i>E. coli</i> productrices de BLSE				
Point de prélèvement et codes souches	Résistance phénotypique ^a	Criblage ^b blaCTX-M	Résistance génotypique	Groupes phylogénétiques
Effluents urbains				
M4	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	ND	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>sulI</i> , <i>sulIII</i> , <i>catI</i> , <i>tetA</i> , <i>intI1</i>	A
M16	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	ND	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>sulI</i> , <i>sulIII</i> , <i>catI</i> , <i>tetA</i> , <i>intI1</i>	A
M18	AMP CEF CXM CTX STR CHL NAL SMX TMP TET	ND	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>sulI</i> , <i>sulII</i> , <i>catI</i> , <i>tetA</i> , <i>intI1</i>	A
M20	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	ND	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>sulI</i> , <i>sulII</i> , <i>catI</i> , <i>intI1</i>	A
M24	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	ND	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>sulI</i> , <i>sulII</i> , <i>catI</i> , <i>tetA</i> , <i>intI1</i>	A
M25	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	ND	<i>bla</i> _{TEM-52} , <i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>sulI</i> , <i>sulIII</i> , <i>catI</i> , <i>tetA</i> , <i>intI1</i>	A
M32	AMP CEF CXM STR CHL NAL CIP SMX TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>sulIII</i> , <i>cmlA</i> , <i>intI1</i>	B1
Effluents de l'abattoir				
M30	AMP CEF CXM SMX TMP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>Bla</i> _{TEM-1} , <i>sulII</i> , <i>intI1</i>	A
Effluents traités				
M19	AMP CEF CXM CTX	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>Bla</i> _{TEM-1}	A

^aAM : ampicilline, CXM : céfuroxime, STR : streptomycine, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, C : chloramphénicole, KAN : kanamycine, GEN : gentamycine, CIP : ciproflaxacine, CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, CTX : céfotaxime et CF : céphalotine.

^bND : non déterminé

VII.2. Résultats de recherche des *E. coli* pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques dans les effluents des abattoirs et de la station d'épuration urbaine de Dakar.

VII.2.1. Dénombrement des entérobactéries et *E. coli*

Un dénombrement des entérobactéries et des *E. coli* a été réalisé sur les prélèvements de l'abattoir (EA), de l'effluent brut dessablé de la STEP (EBD), de l'eau clarifiée (EC) et du rejet final (RF). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7.15**. La charge en *E. coli* est 2 fois plus élevée dans l'effluent de l'abattoir que dans l'effluent brut de la STEP. Une absence de souches *E. coli* a été notée dans l'effluent traité correspondant au rejet final (RF) de la STEP. La suite de l'étude a porté sur les souches de *E. coli* isolées à partir des prélèvements EA, EBD et EC.

Point de prélèvement	Enterobacteries (UFC/mL)	<i>E. coli</i> (UFC/mL)
Effluent abattoir (EA)	$2 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$
Effluent brut dessablé (EBD)	$5,5 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^6$
Eau clarifiée (EC)	$2 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^2$
Rejet final (RF)	$3 \cdot 10^2$	0

VII.2.2. Prévalence des gènes de virulence associés aux EHEC

Sur la collection de 540 souches de *E. coli*, 4 souches de *E. coli* isolées de l'abattoir portaient au moins un des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* associés aux EHEC. La prévalence globale des gènes associés aux EHEC était de 0,74% au niveau de l'abattoir. Les souches SN03 et SN04 portaient le gène *eae* et les souches SN01 et SN02 portaient en association les gènes *stx1* et *stx2*. Les souches SN01, SN02, SN03 et SN04 étaient sensibles aux antibiotiques et appartenaient au groupe phylogénétique B1. Par ailleurs, Nous avons montré que ces souches n'appartenaient pas aux 5 sérogroupes majeurs associés aux EHEC (**Tableau 7.16**). Au niveau de la STEP, aucune des souches isolées portaient un des gènes de virulence associés aux EHEC.

Souches	Code Biochimique Api 20E	Gènes	Groupes Phylogénétiques	Antibio-résistant ^b	Sérogroupe ^a				
					O157	O145	O103	O111	O26
SN01	5144572	<i>stx1/stx2</i>	B1	S	-	-	-	-	-
SN02	5144572	<i>stx1/stx2</i>	B1	S	-	-	-	-	-
SN03	5044573	<i>eae</i>	B1	S	-	-	-	-	-
SN04	5144572	<i>eae</i>	B1	S	-	-	-	-	-

^a (-) absence du sérogroupe

^b S : sensible à tous les antibiotiques

VII.2.3. Prévalence des gènes de virulence associés aux ExPEC

Les gènes de virulence (*papEF*, *sfa/focDE* *afa/draBC*, *fuyA*, *cnf*, *f17A*, *hlyA*, *clbN*, and *kpsMT* K1) associés aux ExPEC ont été recherchés sur toute la collection. Nous avons montré que 13 souches parmi les 540 souches de *E. coli* portaient au moins un gène associé aux ExPEC, soit une prévalence globale de 2,4%. La répartition de ces souches en fonction des sites de prélèvement est la suivante : 9 souches dans les effluents de la ville et 4 souches dans les effluents des abattoirs. Le gène *fuyA* qui code pour le système de captage du fer avait la prévalence la plus élevée (1,1%) suivis des gènes *f17* (0,9%), *clbN* (0,5%), *cnfx* (0,5%), *hlyF* (0,3%), *papEF* (0,1%) et *afa/dra* (0,1%). Les gènes *f17* et *cnfx* ont été respectivement détectés dans les effluents de la ville et dans les effluents d'abattoir.

Sites	Souches	Code Biochimique (Api 20E)	Association de gènes	Profil de Résistance ^a	Groupe phylogénétique
Effluents Abattoir	SN05	5144572	<i>Cnfx/fuyA</i>	S	B1
	SN06	5144572	<i>Cnfx/fuyA</i>	S	B1
	SN07	5144572	<i>clbN/hlyF/fuyA</i>	S	B1
	SN08	5144172	<i>Cnfx/fuyA</i>	S	B1
Effluents urbains	SN09	5144572	<i>f111</i>	TE	B1
	SN10	5144572	<i>f111</i>	TE	B1
	SN11	5144572	<i>f111</i>	TE	B1
	SN12	5144572	<i>f111</i>	TE	B1
	SN13	5144532	<i>clbN/papEF/fuyA</i>	TE/C/SSS/TMP	B2
	SN14	5144532	<i>clbN</i>	TE/C/SSS/TMP	B2
	SN15	7044572	<i>hlyf</i>	SSS/TMP	D
	SN16	5144572	<i>f17c/f111</i>	S	B1
	SN17	5144532	<i>afa/dra/fuyA</i>	AM/TE/TMP	A

^a AM : ampicilline, C : chloramphénicol, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, S : sensible à tous les antibiotiques testés.

Aucune souche porteuse des gènes *kpsMT K1* et *sfa/focDE* n'a été détectée dans la collection. Une faible association des gènes a été notée. La majorité des souches porteuses de gènes de virulence était du groupe phylogénétique B1 (9 souches) suivis par les groupes B2 (2 souches), D (1 souche) et A1 (1 souche). Les souches appartenant aux groupes B2 et D provenaient des effluents de la ville.

VII.2.4. La résistance aux antibiotiques

L'antibiorésistance a été étudiée sur 80 souches de *E. coli* choisies de façon aléatoire dont 40 souches provenant de l'abattoir et 40 souches de la STEP. Les souches porteuses de gènes de virulence, 13 souches associées aux ExPEC et 4 souches associées aux EHEC ont été testées en même temps. Nous avons utilisé la technique de diffusion en milieu gélosé comme décrite en matériel et méthodes. Les résultats obtenus, ont montré que les pourcentages de résistance en fonction des antibiotiques testés variaient selon les différentes origines de 0 à 51%. Des souches résistantes à l'ampicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, la céphalotine, la streptomycine, la tétracycline et le triméthoprim ont été observée aussi bien sur les *E. coli* d'origine humaine qu'animale. Cependant, la résistance à l'acide nalidixique, le chloramphénicol, la ciprofloxacine, les sulfonamides ou la céfépime n'a été retrouvée que chez les souches d'origine humaine. Par ailleurs, sur l'ensemble des souches testées, aucune n'était résistante à la gentamicine, au céfotaxime, à la ceftazidime et au céfuroxime. En comparant les sites d'échantillonnage, le plus grand nombre de souches résistantes a été trouvé à la station d'épuration (63,2% contre 14,5%).

Les souches isolées au niveau des abattoirs portant des gènes associés aux EHEC et aux ExPEC étaient sensibles à tous les antibiotiques testés (**Tableau 7.16 et Tableau 7.17**). Au contraire, au niveau de la STEP toutes les souches exprimant un gène associé aux ExPEC étaient résistantes au moins à un antibiotique, sauf pour la souche SN16 qui était sensible à tous les antibiotiques testés. Les souches multi-résistantes ont été observées principalement dans les effluents de la ville avec 32,6% de souches résistantes à au moins quatre antibiotiques (**Tableau 7.19**).

Famille antibiotique	Antibiotiques testés	codes	Site de prélèvement ^a	
			Abattoirs (n=48)	STEP (n=49)
β- Lactames	Cefotaxime	CTX	0% (0)	0% (0)
	Amoxicillin + acide clavulanique	AMC	4.1% (2)	10.2% (5)
	Ceftazidime	CAZ	0% (0)	0% (0)
	Ampicilline	AM	12.5% (6)	36.7% (18)
	Céphalothine	CF	4.1% (2)	10.2% (5)
	Céfuroxime	CXM	0% (0)	0% (0)
	Céfépime	FEP	0% (0)	2% (1)
Aminosides	Gentamicine	GEN	0% (0)	0% (0)
	Kanamycine	KAN	2% (1)	0% (0)
	Streptomycine	STR	2% (1)	18.3% (9)
Tétracycline	Tétracycline	TE	2% (1)	51.0% (25)
Phénicolés	Chloramphénicol	C	0% (0)	6.1% (3)
Sulfonamides	Sulfonamides	SSS	0% (0)	34.6% (17)
	Triméthoprim	TMP	2% (1)	34.6% (17)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	0% (0)	2% (1)
Quinolones	Acide Nalidixique	NA	0% (0)	10.2% (5)

^a Les valeurs entre parenthèses donnent le nombre de souches de *E. coli* testées pour chaque point de prélèvement et pour chaque antibiotique le nombre de souches résistantes.

Sites de prélèvement	Profile de résistance ^a				
	S	R1	R2	R3	R4
Effluents d'abattoir (n=48)	85.4% (41)	6.25% (3)	2.0% (1)	6.25% (3)	0% (0)
Effluents urbains (n=49)	36.7% (18)	22.4% (11)	4.0% (2)	4.0% (2)	32.6% (16)

^a S : sensible à tous les antibiotiques; R1 : résistante à un antibiotique, R2 : résistante à deux antibiotiques, R3 : résistante à trois antibiotiques et R4, résistante à quatre antibiotiques voire plus

VII.3. Valorisation des résultats

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'un article publié dans la revue scientifique internationale à comité de lecture, « Water research » ainsi que de deux posters présentés lors de congrès nationaux et internationaux.

VII.3.1. Publication

«Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta lactamase-producing Escherichia coli in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater»

Alpha Amadou Diallo, Hubert Brugère, Monique Kérourédan , Véronique Dupouy, Pierre Louis Toutain, Alain Bousquet-Mélou c, Eric Oswald et Delphine Bibbal «Water Research» 47 (2013) 4719-4729



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater

Alpha Amadou Diallo^{a,b,c,d}, Hubert Brugère^{a,b,c}, Monique Kérourédan^{a,b,c},
Véronique Dupouy^{c,e}, Pierre-Louis Toutain^{c,e}, Alain Bousquet-Mélou^{c,e},
Eric Oswald^{a,b,f}, Delphine Bibbal^{a,b,c,*}

^a INSERM, UMR1043, F-31300 Toulouse, France

^b INRA, USC1360, F-31300 Toulouse, France

^c Université de Toulouse, INPT, ENVT, EIP, UPS, F-31076 Toulouse, France

^d ISRA/LNERV, Dakar-Hann, Senegal

^e INRA, UMR1331 TOXALIM, F-31027 Toulouse, France

^f CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, F-31059 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2013

Received in revised form

9 April 2013

Accepted 24 April 2013

Available online 3 May 2013

Keywords:

Escherichia coli

Wastewater treatment process

EHEC

ExPEC

ESBL-producing *E. coli*

ABSTRACT

We compared the prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) – producing *Escherichia coli* in effluents of a municipal wastewater treatment plant (WWTP) receiving wastewater from a slaughterhouse. A total of 1248 isolates were screened for the presence of virulence genes associated with enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) (*stx*₁, *stx*₂, and *eae*) and extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (*sfa/focDE*, *kpsMT K1*, *hlyA*, *papEF*, *afa/draBC*, *clbN*, *f17A* and *cnf*). The prevalence of atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) was 0.7%, 0.2% and 0.5% in city wastewater, slaughterhouse wastewater and in the treated effluent, respectively. One *stx*_{1a} and *stx*_{2b}-positive *E. coli* isolate was detected in city wastewater. The prevalence of ExPEC was significantly higher in city wastewater (8.4%), compared to slaughterhouse wastewater (1.2%). Treatment in the WWTP did not significantly impact the prevalence of ExPEC in the outlet effluent (5.0%) compared to city wastewater. Moreover, the most potentially pathogenic ExPEC were isolated from city wastewater and from the treated effluent. ESBL-producing *E. coli* was also mainly detected in city wastewater (1.7%), compared to slaughterhouse wastewater (0.2%), and treated effluent (0.2%). One ESBL-producing *E. coli*, isolated from city wastewater, was *eae*-β1 positive. These results showed that pathogenic and/or ESBL-producing *E. coli* were mainly detected in human wastewater, and at a lesser extend in animal wastewater. Treatment failed to eliminate these strains which were discharged into the river, and then these strains could be transmitted to animals and humans via the environment.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

* Corresponding author. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, BP 87 614, 31 076 Toulouse Cedex 3, France. Tel.: +33 (0) 561 193 903; fax: +33 (0) 561 491 263.

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

0043-1354/\$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier Ltd.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.047>

1. Introduction

Waterborne pathogens are frequently associated with fecal pollution from diverse sources such as wastewater, agricultural fecal wastes and wildlife fecal droppings (Leclerc et al., 2002). Domestic and slaughterhouse wastewater contains important microbiological contaminations. Wastewater treatment has an impact on the microbial quality of surface waters. Most wastewater treatment plants (WWTP) are designed to eliminate organic matter, which allows elimination of pathogens at the same time (Curtis, 2003). *Escherichia coli* is the most used indicator to monitor the microbial quality of water (Wu et al., 2011). *E. coli* are natural habitants of the digestive tract of humans and animals. However, certain strains can be pathogenic for humans (Kaper et al., 2004). Moreover, antibiotic resistant *E. coli*, and in particular extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli*, had been detected in effluents from human and animal origin (Dolejska et al., 2011; Galvin et al., 2010; Mesa et al., 2006; Sabate et al., 2008).

ESBL mediate resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics, which are among the most clinically important antibiotics in human medicine (Poole, 2004). However, to date, studies of the detection of pathogenic and/or resistant *E. coli* in sewage from human or animal origin tended to address the issue in terms of the presence or absence of these bacteria. There are few reports of quantitative data on the presence of pathogenic and/or resistant *E. coli* in sewage (Anastasi et al., 2010; Blanch et al., 2003; Galvin et al., 2010; Garcia-Aljaro et al., 2004). As quantitative microbial risk assessment is increasingly used, quantitative data are needed to assess the impact of the effluent process in removing pathogenic and/or resistant *E. coli*. Moreover, the identification of the source of such *E. coli* discharged into the river after treatment is important to establish proper risk assessment and abatement procedures for human and animal wastewater.

Pathogenic *E. coli* can be categorized as intestinal pathogenic *E. coli* or extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (Russo and Johnson, 2000). Among the intestinal pathogenic *E. coli*, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) are responsible for severe clinical symptoms, such as hemorrhagic colitis and the potential lethal hemolytic uremic syndrome (Karmali et al., 2010). EHEC strains are zoonotic pathogens as domestic ruminants, mainly cattle, sheep, and goats have been established as major natural reservoirs for EHEC (Ferens and Hovde, 2011). Several outbreaks attributed to *E. coli* O157:H7 were associated with recreational water and drinking water (Craun et al., 2005; Hunter, 2003), underlying the importance of eliminating these pathogens from human and animal wastewater.

ExPEC strains have the ability to cause extraintestinal infections such as urinary tract infections, neonatal meningitis and sepsis, and wound infections which can lead to serious complications and death (Bonacorsi and Bingen, 2005; Ron, 2006; Wiles et al., 2008). The host's own digestive tract is the conventionally recognized source of the ExPEC that cause human infections (Yamamoto et al., 1997). Although it is difficult to retrace the origin of ExPEC that had established residence in the intestinal tract of humans, it is possible that ExPEC from animals could contaminate humans (Belanger et al., 2011; Manges and Johnson, 2012). Indeed, ExPEC are

widespread in animal reservoirs, where they also cause diseases (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999; Johnson et al., 2008a). Moreover, human and animal pathogenic strains share common genetic backgrounds (Clermont et al., 2011; Girardeau et al., 2003). Whether animals are a source for human ExPEC is still a matter of debate. Nevertheless, *E. coli* strains with uropathogenic virulence characteristics have been detected in sewage of animal origin (Sabate et al., 2008).

Finally, transmission of antimicrobial-resistant bacteria from animals to humans can also occur (Marshall and Levy, 2011). In particular, there is a growing concern about the impact of the presence ESBL-producing *E. coli* isolated from animals on public health (Ewers et al., 2012; Smet et al., 2009). ESBLs of the CTX-M type are the most prevalent. CTX-M producing *E. coli* isolates have been recognized as the cause of hospital but also community onset infections (Pitout et al., 2005). These bacteria have been also isolated from livestock (Trott, 2012). In a 'One Health' perspective, epidemiological studies are required to precise a potentially zoonotic transmission of ESBL-producing *E. coli*.

The objective of the present study was to evaluate and to compare the prevalence of EHEC, ExPEC and ESBL-producing *E. coli* in effluents of a WWTP receiving wastewater from a slaughterhouse. The goals were to identify the human or animal origin of such strains, and to evaluate the impact of the treatment on their prevalence. Pathogenic and/or ESBL-producing *E. coli* were further characterized, in order to precise their ability to cause illness in humans, and to allow comparisons between isolates from different origins.

2. Materials and methods

2.1. Wastewater treatment plant and sampling

Samples were taken from a municipal wastewater treatment plant (WWTP) located in France in April 2009. The WWTP employed activated sludge process. It serviced population equivalent to 60,000 and wastewater from a hospital were included. It also received wastewater from a multi-species slaughterhouse. The slaughterhouse plant slaughtered cattle, sheep, pigs and horses up to 9000 tons per year. Wastewater had received a pre-treatment before entering into the WWTP. City wastewater had been screened. Slaughterhouse wastewater had been screened, sieved and treated with ferric chloride (coagulation-flocculation). Samples were taken from (i) city wastewater, (ii) slaughterhouse wastewater, and (iii) treated effluent released into the river. The outlet effluent was taken three days after the inlet effluents in order to take into account the hydraulic residence time. Flows were recorded for wastewater from slaughterhouse and for the outlet treated effluent. For each effluent, an average 24-h sample was performed using automatic samplers. Concerning city wastewater, the automatic sampler was programmed in order to take into account the variations observed in the flows during the 24-h period. Due to the presence of buffer tank in the slaughterhouse and in the WWTP, slaughterhouse wastewater and the outlet effluent were not subjected to these variations. Five liters of slaughterhouse wastewater and the

outlet effluent, and 0.5 L of city wastewater were then transported to the laboratory in isothermal containers with eutectic plates, and processed upon arrival at the laboratory.

2.2. Enumeration and isolation of *E. coli*

Samples were concentrated stepwise to a final volume of 5 mL. Decimal dilutions of the concentrated samples were then plated onto selective medium for *E. coli* (Petrifilm™ Select *E. coli* Count Plate, Grosseron, Saint Herblain, France). The plates were incubated at 42 °C for 24 h; and bacterial enumeration was performed. In a second stage, for each sample, about 20 Petrifilm™ Select *E. coli* Count Plates were inoculated with the dilution giving about 20 well isolated colonies. After incubation, 416 isolates were randomly picked for each sample and were grown separately with agitation at 37 °C in LB broth. They were then stored at –80 °C in LB broth containing 30% glycerol in 96-well microtiter plates for further analysis. In all, 1248 isolates were saved, as 416 isolates were saved for each of the three sampling points.

2.3. Screening for potentially pathogenic *E. coli*

The presence of 3 EHEC-associated genetic markers (*eae*, *stx*₁ and *stx*₂) and 8 ExPEC-associated genetic markers (*sfa/focDE*, *kpsMT K1*, *hlyA*, *papEF*, *afa/draBC*, *clbN*, *f17A* and *cnf*) was investigated in the collection of 1248 isolates. DNA was extracted from overnight cultures using NaOH. It was then subjected to multiplex and uniplex PCR sets. A triplex PCR was performed to detect *eae*, *stx*₁ and *stx*₂ genes as already described (China et al., 1996). EHEC O157:H7 RIMD 050992 (Sakai) was used as a positive control (Hayashi et al., 2001). Concerning the ExPEC, one triplex PCR was performed to detect *sfa/focDE* (Le Bouguenec et al., 1992), *kpsMT K1* (Johnson and Stell, 2000) and *hlyA* (Johnson and Stell, 2000), one duplex PCR to detect *papEF* (Yamamoto et al., 1995) and *afa/draBC* (Johnson and Stell, 2000), and three single PCR assays to detect *clbN* (Johnson et al., 2008b), *f17A* (Bertin et al., 1996b) and *cnf* genes (Yamamoto et al., 1995). Two duplex PCR sets allowed to identify *f17c-A* and *f17a-A*, *f17b-A* and *f111* (Bertin et al., 1996b); and two simplex PCR sets allowed to identify *cnf1* and *cnf2* (Toth et al., 2003). Furthermore, the presence of *fuyA* (Johnson and Stell, 2000) and *hlyF* (Moulin-Schouleur et al., 2007) genes was investigated in isolates positive for at least one of the 8 screened genes associated with ExPEC. Control strain J96 was used as positive control for *sfa/focDE*, *hlyA*, *papEF* and *fuyA* genes (Johnson et al., 1997), SP15 for *kpsMT K1* and *hlyF* (Johnson et al., 2002), A30 for *afa/draBC* (Johnson and Stell, 2000), IHE3034 for *clbN* (Korhonen et al., 1985), 25KH9 for *f17a-A* (Girardeau et al., 1988), S5 for *f17b-A* and *cnf2* (Smith, 1974), 31A for *f17c-A* (Bertin et al., 1996a), 111KH86 for *f111* (Bertels et al., 1989) and 28c for *cnf1* (Dozois et al., 1997). Based on the PCR results, *E. coli* isolates were classified as ExPEC when they carried at least three virulence genes among the 10 tested genes associated with ExPEC. The PCR were performed on two apparatus (PCR System 9700 Gene Amp® and PTC-200 Peltier thermal cyclers MJ Research). Isolates that tested positive for at least one virulence gene were confirmed to be *E. coli* with an API 20E test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.4. Screening for ESBL-producing *E. coli* and detection of β -lactamase genes

In order to detect ESBL-producing *E. coli*, an initial screening was performed on the 1248 isolates. They were inoculated onto Mueller Hinton agar (Biorad Laboratories) containing 1 µg/ml cefotaxime and onto Mueller Hinton agar containing 1 µg/ml ceftazidime, and incubated at 37 °C for 24 h. Isolates growing on plates containing cefotaxime or ceftazidime were confirmed to be *E. coli* with an API 20E test. ESBL-producing *E. coli* isolates were then identified by Etest for cefotaxime and ceftazidime including clavulanic acid, according to manufacturer's instructions (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 were used as control strains. The presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes was investigated by PCR, using primers already described for *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes (Bibbal et al., 2009; Saladin et al., 2002). For the detection of *bla*_{SHV} genes, forward and reverse primers were 5'-AGATCGGCGACAACGTAC-3' and 5'TCATTTCAGTTCGGTTTCCCAG-3', respectively. The *bla*_{TEM} genes were amplified and sequenced, as already described (Coque et al., 2002). Concerning *bla*_{CTX-M} genes, an initial sequencing was performed, in order to identify the CTX-M group (Saladin et al., 2002). Further, gene identification was performed using specific primers and sequencing as described elsewhere (Dutour et al., 2002; Simarro et al., 2000). PCR products were purified using the Min Elute PCR Purification KIT (Qiagen, The Netherlands). Sequences were obtained using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) with an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, USA). *E. coli* JS238(pOFX326) provided by Olivier Fayet (CNRS-IMG-UMR5100, France), *E. coli* 6UZ4 (from our collection), *E. coli* 149 77-3018-11 and *S. Virchow* 75-22438-1 provided by Lisbeth Andersen (National Food Institute, Denmark), were used as control strains.

2.5. Isolation of the five major EHEC

To improve the sensitivity of detection of the five major EHEC (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O111:H8 and O103:H2), a complementary isolation procedure was performed. Concentrated samples (1 mL) were enriched in 15 mL of modified Trypticase soy broth, supplemented with novobiocin at 20 mg/L and acriflavin at 10 mg/L, at 42 °C for 6 h. Immunomagnetic separation of *E. coli* O157, O26, O145, O103, O111 and O103 were performed according to the manufacturer's instructions (Dynabeads, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The beads were plated onto cefixime-tellurite-sorbitol-MacConkey agar (Oxoid, Dardilly, France) for *E. coli* O157, and onto REBECCA® (Rapid Enterobacteria *E. coli* coliform Agar) (AES, Bruz, France) for the other serogroups. Presumed *E. coli* O157, O26, O145, O103, O111 were confirmed with serogroup specific antisera (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) by slide agglutination.

2.6. Phylogenetic group classification

E. coli isolates positive for at least one virulence gene and ESBL-producing *E. coli* were tested for phylogenetic groups using multiplex PCR with the *chuA* and *yjaA* genes and the DNA fragment TSPE4.C2 according to the method described by

Clermont et al. (Clermont et al., 2000). Representative *E. coli* Reference Collection strains were used as template control.

2.7. Antimicrobial susceptibility testing

E. coli isolates positive for at least one virulence gene and ESBL-producing *E. coli* were subjected to antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility tests were performed by using a disk diffusion method according to the CLSI standards (CLSI, 2009a) on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad Laboratories). *E. coli* ATCC 25922 was used as the control strain. The 16 antibiotic disks (Bio-Rad Laboratories) used in this study were ampicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, cephalothin, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, cefuroxime, streptomycin, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim and sulfamethoxazole. Resistance to imipenem was tested for ESBL-producing *E. coli* isolates. The susceptibility breakpoints for all antimicrobials were those recommended by CLSI (CLSI, 2008, 2009b). Isolates were classified as multiresistant when they exhibited resistance to three or more classes of antimicrobial agents (Schwarz et al., 2010). The presence of major resistance genes to beta-lactam antibiotics (*bla_{TEM}*), sulfonamides (*sulI*, *sulII*, *sulIII*), phenicols (*floR*, *cmlA*, *catI*, *catII* and *catIII*); streptomycin- spectinomycin (*strA*-*strB*, *aadA1*), tetracycline (*tetA* and *tetB*) and the presence of the integrase genes *intI1* and *intI2* was investigated in the resistant strains, using specific primers and the *E. coli* control strains described elsewhere (Bibbal et al., 2009).

2.8. Characterization of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* isolates

Subtyping of *stx*₁ and *stx*₂ genes was performed using specific primers and control strains as described by Scheutz et al. (Scheutz et al., 2012). The presence of *eae* β1, γ1, ε and γ2/θ variants was screened in *eae*-positive *E. coli* by real-time PCR, using primers and control strains previously described (Madic et al., 2011). In addition, potential EPEC were PCR-tested for the presence of *bfpA* and EPEC adherence factor (EAF) plasmid as already described (Franke et al., 1994; Gunzburg et al., 1995). E2348/69 was used as control strain (Levine et al., 1985). Based on PCR results, *E. coli* isolates were classified as STEC or atypical EPEC. *E. coli* isolates positive for *stx*₁ and/or *stx*₂ genes were classified as STEC, Isolates positive for *eae* gene, and negative for *stx*₁, *stx*₂, *bfpA* and EPEC adherence factor (EAF) plasmid were classified as atypical EPEC (Trabulsi et al., 2002). The five major serotypes associated with EHEC (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O111:H8 and O103:H2) were investigated in STEC and potential EPEC isolates, by real-time PCR with conditions and control strains described elsewhere (Madic et al., 2011; Perelle et al., 2004, 2005).

2.9. Statistical analysis

A Pearson's Chi-squared test was used to test if STEC, potential EPEC, ExPEC, ESBL producing *E. coli* and virulence genes associated with ExPEC were evenly distributed among sampling points (null hypothesis). The statistical significance was set at a *P* value <0.05. When the null hypothesis was rejected, sampling points were compared in pairs using a chi-square

test, with significance set at a *P* value <0.017, to take into account multiplicity. Statistical tests were performed using Excel 2010.

3. Results

3.1. Characteristics of the effluents of the WWTP

The flow of the outlet treated effluent was 17,323 m³/24 h. Slaughterhouse wastewater contributed up to 1.7% to this outlet effluent. Bacterial counts showed that city wastewater and slaughterhouse wastewater contained 1.9 × 10⁴ CFU/mL and 7.7 × 10¹ CFU/mL *E. coli* respectively. After treatment in the WWTP, the effluent released in the river contained 2.9 × 10² CFU/mL *E. coli*.

3.2. Prevalence and characteristics of ExPEC

ExPEC associated genetic markers (*papEF*, *sfa/focDE afa/draBC*, *cnf*, *f17A*, *hlyA*, *clbN*, and *kpsMT K1*) were screened in the collection of 1248 isolates. ExPEC associated genetic markers were detected in 57 *E. coli* isolated from city wastewater, 7 *E. coli* from slaughterhouse wastewater and 27 *E. coli* from the outlet effluent (Table 1). The prevalence of these virulence genes was lower than 7%, and *papEF*, *clbN*, *kpsMT K1 sfa/focDE*, *hlyA* were the most identified genes (Table 2). Moreover, the prevalence of these 5 virulence genes was significantly higher in city wastewater compared to slaughterhouse wastewater (*P* < 0.017). Concerning the remaining genes, *afa/draBC*, *cnf1*, *f17a-A*, *f17c-A* and *f111* were only detected in city wastewater and/or in the treated effluent; whereas *cnf2* was only detected in the inlet effluent from the slaughterhouse. Isolates positive for at least one of the 8 genes associated with ExPEC were screened for *fyuA* and *hlyF* genes in a second stage. These two genes were only tested in a second stage because preliminary results had shown that their prevalence was very high in *E. coli* isolated from the three effluents. Isolates carrying at least three EHEC-associated

Table 1 – Prevalence of pathogenic and ESBL-producing *E. coli* isolated from city wastewater, slaughterhouse wastewater and treated effluent.

	City wastewater (n = 416)	Slaughterhouse wastewater (n = 416)	Treated effluent (n = 416)
<i>E. coli</i> positive for at least one ExPEC associated genetic marker ^{a,b,c}	13.7% (57)	1.7% (7)	6.5% (27)
ExPEC ^{a,c}	8.4% (35)	1.2% (5)	5.0% (21)
Atypical EPEC	0.7% (3)	0.2% (1)	0.5% (2)
STEC	0.2% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)
ESBL-producing <i>E. coli</i>	1.7% (7)	0.2% (1)	0.2% (1)

Statistically significant differences (*P* < 0.017) in prevalence indicated by superscript letters.

a Between city wastewater and slaughterhouse wastewater.

b Between city wastewater and treated effluent.

c Between slaughterhouse wastewater and treated effluent.

Table 2 – Prevalence of virulence genes in city wastewater, slaughterhouse wastewater and treated effluent.

Virulence genes	City wastewater (n = 416)	Slaughterhouse wastewater (n = 416)	Treated effluent (n = 416)
ExPEC-associated genetic markers			
<i>papEF</i> ^{a,c}	6.3% (26)	0.7% (3)	3.1% (13)
<i>clbN</i> ^{a,c}	5.0% (21)	0.5% (2)	2.9% (12)
<i>kpsMTK1</i> ^{a,b}	5.3% (22)	0.5% (2)	1.4% (6)
<i>sfa/focDE</i> ^a	3.8% (16)	0.5% (2)	2.2% (9)
<i>hlyA</i> ^{a,b}	3.6% (15)	0.2% (1)	0.7% (3)
<i>f17A</i> ^{a,c}	1.4% (6)	0.0% (0)	1.9% (8)
<i>f17a-A</i>	0.5% (2)	0.0% (0)	0.0% (0)
<i>f17c-A</i>	1.0% (4)	0.0% (0)	0.7% (3)
<i>f111</i>	0.0% (0)	0.0% (0)	1.0% (4)
<i>afa/draBC</i>	1.0% (4)	0.0% (0)	1.0% (4)
<i>cnf</i>	0.7% (3)	0.2% (1)	0.7% (3)
<i>cnf1</i>	0.7% (3)	0.0% (0)	0.7% (3)
<i>cnf2</i>	0.0% (0)	0.2% (1)	0.0% (0)
EHEC-associated genetic markers			
<i>eae</i>	0.7% (3)	0.2% (1)	0.5% (2)
<i>stx</i>	0.2% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)

Statistically significant differences ($P < 0.017$) in prevalence indicated by superscript letters.

a Between city wastewater and slaughterhouse wastewater.
 b Between city wastewater and treated effluent.
 c Between slaughterhouse wastewater and treated effluent.

genetic markers were defined as ExPEC. The prevalence of ExPEC was 8.4% in city wastewater, 1.2% in slaughterhouse wastewater and 5.0% in the outlet effluent (Table 1). The prevalence of ExPEC was significantly higher in city wastewater compared to slaughterhouse wastewater ($P < 0.017$). No significant difference was observed between the prevalence of ExPEC

in city wastewater compared to the treated effluent. A significant difference was observed between the prevalence of ExPEC in slaughterhouse wastewater compared to the treated effluent ($P < 0.017$).

ExPEC isolates mainly belonged to phylogroup B2 (82.0%), and to a lesser extent, to phylogroup D (13.1%) and A (4.9%). Concerning the antimicrobial resistance, the results showed that 57.4% of the ExPEC isolates were resistant to at least one antibiotic; and that 31.1% were multiresistant. ExPEC isolates were mainly resistant to ampicillin (44.2%), sulfonamide (36.1%), streptomycin (26.2%) and tetracycline (26.2%). Moreover, 13.1% were resistant to the association amoxicillin plus clavulanic acid; and 4.9% were resistant to ciprofloxacin. Finally, the characteristics of the 14 most potential pathogenic ExPEC, i.e. harboring more than five genes associated with ExPEC, are shown in Table 3. Eleven of these strains were isolated from city wastewater and three from the treated effluent. The main association of virulence genes was the combination of *fyuA*, *papEF*, *hlyA*, *sfa/focDE*, and *clbN* genes. This combination of genes was detected in 9 strains. In addition, all the strains belonged to phylogenetic group B2; and 8 strains were resistant to at least one of the tested antibiotics.

3.3. Prevalence and characteristics of atypical EPEC and STEC

No isolate harboring both *eae* and *stx* genes was detected. Six *eae*-positive *E. coli* isolates were isolated (Table 2). They were negative for *bfpA* and EPEC adherence factor (EAF) plasmid (Table 4), which justified their classification as atypical EPEC (Kaper et al., 2004). Their prevalence was 0.7%, 0.2% and 0.5%, in city wastewater, slaughterhouse wastewater and in the outlet effluent, respectively (Table 1). No significant difference was observed according to the sampling point. A unique STEC isolate was detected in city wastewater.

Table 3 – Characteristics of ExPEC carrying at least five virulence genes isolated from the inlet and outlet effluents of the wastewater treatment plant.

Strain	Location	Combination of virulence genes	Phylogenetic group	Resistance phenotype ^a	Combination of resistance genes
M41	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>kpsMT K1</i>	B2	AMC AMP SMX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>sullI</i>
M46	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i>	B2	AMC AMP STR SMX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>sullI</i>
M50	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>kpsMT K1</i> , <i>hlyF</i> , <i>cnf1</i>	B2	AMC AMP STR SMX TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA</i> , <i>sullI</i> , <i>tetA</i> , <i>intI1</i>
M52	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>cnf1</i>	B2	S	
M60	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>kpsMT K1</i>	B2	AMC AMP	<i>bla</i> _{TEM}
M61	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>clbN</i> , <i>kpsMT K1</i>	B2	S	
M64	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i>	B2	S	
M66	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>kpsMT K1</i>	B2	AMP	
M75	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>kpsMT K1</i>	B2	AMP KAN STR SMX TET	<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA-strB</i> , <i>sullI</i> , <i>tetA</i>
M83	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i>	B2	S	
M94	City wastewater	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>cnf1</i>	B2	S	
M116	Treated effluent	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>cnf1</i>	B2	AMP STR SMX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>sullI</i>
M120	Treated effluent	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i> , <i>cnf1</i>	B2	S	
M122	Treated effluent	<i>fyuA</i> , <i>papEF</i> , <i>hlyA</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>clbN</i>	B2	AMP	<i>bla</i> _{TEM}

a AMC, amoxicillin + clavulanic acid, AMP, ampicillin; KAN, kanamycin, STR, streptomycin; SMX, sulfamethoxazole; TET, tetracycline; S, susceptible to all tested antibiotics.

Table 4 – Characteristics of STEC and atypical EPEC isolated from the inlet and outlet effluents of the wastewater treatment plant.

Strain	Location	Presence of ^a :				Serotype ^c	Phylogenetic group	Resistance phenotype ^d
		<i>eae</i> (variant ^b)	<i>stx</i> (subtype)	<i>bfpA</i>	EAF			
M1	City wastewater	+ (ND)	–	–	–	ND	B2	S
M2	City wastewater	+ (ND)	–	–	–	ND	B2	S
M3	City wastewater	–	+	NA	NA	ND	B1	S
			(<i>stx</i> _{1a} – <i>stx</i> _{2b})					
M4	City wastewater	+ (β 1)	–	–	–	ND	A	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET
M6	Slaughterhouse wastewater	+ (β 1)	–	–	–	O103:H2	B1	S
M7	Treated effluent	+ (ND)	–	–	–	ND	B2	S
M8	Treated effluent	+ (ND)	–	–	–	ND	B2	S

a +, present; –, absent; NA, Not analyzed.

b The presence of *eae* variants β 1, γ 1, ϵ and γ 2/ θ was screened in *eae*-positive isolates; ND, Not detected.

c Serotypes O157:H7, O26:H11, O145:H28, O11:H8 and O103:H2 were investigated; ND, Not detected.

d S, susceptible to all tested antibiotics; AMP, ampicillin; CEF, cephalothin; CXM, cefuroxime; STR, streptomycin; CHL, chloramphenicol; NAL, nalidixic acid; SMX, sulfamethoxazole, TMP, trimethoprim; TET, tetracycline.

In order to precise the ability of *E. coli* strains positive for virulence genes to cause illness in humans, these isolates were better characterized. Among the seven atypical EPEC isolated, *eae*- β 1 was detected in two *E. coli* isolated from wastewater (Table 4). One *eae*- β 1-positive *E. coli* was isolated from city wastewater (strain M4). The second *eae*- β 1-positive *E. coli*, isolated from slaughterhouse wastewater, belonged to the serotype O103:H2 (strain M6). The other isolates were not assigned to the five major serotypes frequently associated with EHEC in France. Atypical EPEC mainly belonged to phylogenetic group B2 (4/6). Concerning the antimicrobial resistance, 5 of the 6 atypical EPEC were susceptible to all of the tested antibiotics. The only resistant atypical EPEC strain, belonging to phylogenetic group A, was resistant to 9 antibiotics and produced ESBL (strain M4). The only STEC, isolated from the inlet effluent from the city, carried both *stx*_{1a} and *stx*_{2b} genes; and was susceptible to all tested antibiotics (strain M3).

The specific detection, after enrichment and immunomagnetic separation, of *E. coli* belonging to the five major serogroups associated with EHEC in France (O157, O26, O145, O103, O111), failed to isolate EHEC.

3.4. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli*

Among the 1248 tested isolates, nine ESBL-producing *E. coli* were detected. Their prevalence was 1.7% in city wastewater, 0.2% in slaughterhouse wastewater and 0.2% in the treated effluent (Table 1). No significant difference was observed between the sampling points. From the seven ESBL-producing *E. coli* isolated from city wastewater, the gene *bla*_{TEM-52} was detected in six isolates, while *bla*_{CTX-M-14} was detected in one isolate (Table 5). The two ESBL-producing *E. coli* isolated from slaughterhouse wastewater and treated effluent harbored *bla*_{CTX-M-1} gene (strains M30 and M19). All ESBL-producing *E. coli* harbored *bla*_{TEM-1} gene, and none of these isolates harbored *bla*_{SHV} gene. Eight isolates were multiresistant, and

one isolate was resistant to ciprofloxacin. Moreover, all ESBL-producing *E. coli* were susceptible to imipenem. Class 1 integron was detected in eight ESBL-producing *E. coli*. The distribution of the ESBL-producing *E. coli* according to the phylogenetic groups shown that eight of the nine isolates belonged to group A. The remaining strain belonged to group B1. Finally, screenings of virulence genes associated with EHEC and ExPEC only detected the presence of *eae*- β 1 gene in one of the 9 tested ESBL-producing *E. coli* (strain M4).

4. Discussion

We sampled outlet and inlet effluents, taken into account the residence time, in order to evaluate the impact of the treatment on the prevalence of pathogenic and/or resistant *E. coli*. The treatment in the WWTP eliminated about 99% of the load of the inlet effluents. However, up to 10² CFU/mL *E. coli* were released into the river, and these values are consistent with what has already been described (Harwood et al., 2005; Pignato et al., 2009; Reinthaler et al., 2003). Among these *E. coli* isolates, we detected pathogenic and/or resistant *E. coli* which had been disseminated in the environment. As the WWTP received inlet effluents from the city and from a slaughterhouse, we were also able to compare the prevalence of pathogenic and/or resistant *E. coli* according to human or animal origin. Nevertheless, isolates from city wastewater were not strictly from human sources, as feces from companion animals or birds might be released into domestic wastewater. However, this contribution should be very low in terms of flow and number of *E. coli*. Moreover, isolates from slaughterhouse wastewater might have a human origin as toilets of workers were released into this effluent. But this contribution to the final effluent should be very low too.

The most prevalent and the most pathogenic isolated *E. coli* strains for humans were ExPEC. The prevalence of ExPEC was significantly higher in city wastewater, compared to slaughterhouse wastewater. After treatment, no significant difference

Table 5 – Characteristics of ESBL-producing *E. coli* isolated from the inlet and outlet effluents of the wastewater treatment plant.

Strain	Location	Type of β-lactamase genes ^a		Resistance phenotype ^b		Combination of resistance genes	Phylogenetic group
		ESBL		Non-ESBL			
		ESBL	Non-ESBL	ESBL	Non-ESBL		
M4	City wastewater	<i>bla</i> _{TEM-52}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	<i>sulII, sulIII, catI, tetA, intI1</i>	A
M16	City wastewater	<i>bla</i> _{TEM-52}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	<i>aadA1, sulI, sulII, catI, tetA, intI1</i>	A
M18	City wastewater	<i>bla</i> _{TEM-52}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM CTX STR CHL NAL SMX TMP TET	AMP CEF CXM CTX STR CHL NAL SMX TMP TET	<i>aadA1, sulI, sulII, catI, tetA, intI1</i>	A
M20	City wastewater	<i>bla</i> _{TEM-52}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	<i>aadA1, sulI, sulII, catI, intI1</i>	A
M24	City wastewater	<i>bla</i> _{TEM-52}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	<i>aadA1, sulI, sulII, catI, tetA, intI1</i>	A
M25	City wastewater	<i>bla</i> _{TEM-52}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	<i>aadA1, sulI, sulII, catI, tetA, intI1</i>	A
M32	City wastewater	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM STR CHL NAL CIP SMX TMP TET	AMP CEF CXM STR CHL NAL CIP SMX TMP TET	<i>aadA1, sulI, sulII, catI, tetA, intI1</i>	B1
M30	Slaughterhouse wastewater	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM SMX TMP	AMP CEF CXM SMX TMP	<i>aadA1, sulIII, cmlA, intI1</i>	A
M19	Treated effluent	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{TEM-1}	AMP CEF CXM CTX	AMP CEF CXM CTX	<i>sulII, intI1</i>	A

^a PCR detection and gene identification were performed for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes.
^b AMP, ampicillin; CEF, cephalothin; CXM, cefuroxime; CTX, cefotaxime; STR, streptomycin; CHL, chloramphenicol; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; SMX, sulfamethoxazole, TMP, trimethoprim; TET, tetracycline.

was observed compared to city wastewater. On the other hand, the outlet prevalence was significantly higher compared to slaughterhouse wastewater. This might be explained by the fact that slaughterhouse wastewater contributed little to the final effluent, in terms of flow and number of *E. coli*. Regarding the prevalence of genetic markers associated with ExPEC, we showed that the prevalence of the main virulence genes (*papEF*, *clbN*, *kpsMT K1*, *sfa/focDE*, *hlyA*) was significantly higher in wastewater from human origin compared to animal origin. This result is consistent with what have been observed by Escobar-Paramo et al. (Escobar-Paramo et al., 2006) comparing the presence of extraintestinal virulence genes (*pap*, *sfa*, *hly* and *aer*) in collections of commensal isolates from human and animal origin. They showed that human isolates exhibited a clearly higher proportion of virulence genes than animal isolates. The *clbN* gene was shown to be significantly associated with bacteremia (Johnson et al., 2008b). Here, we showed that *clbN* gene was detected in *E. coli* isolated from city wastewater, and to a lesser extend in *E. coli* isolated from slaughterhouse wastewater. Concerning the less identified genes, *cnf1* was only detected in city wastewater and in the outlet effluent, whereas *cnf2* was only detected in slaughterhouse wastewater. This result is in agreement with other studies showing that *cnf1*-positive isolates have mostly been isolated from extra-intestinal infections from humans, and *cnf2*-positive isolates have been isolated from calves with septicemia or diarrhea (De Rycke et al., 1999). Finally, *f17a-A*, *f17c-A*, *f111* and *afa/draBC* were only detected in city wastewater and/or in the outlet effluent. The fact that we detected the *f17a-A* gene in two *E. coli* isolated from city wastewater is surprising, as *f17a-A* is known to be detected in pathogenic *E. coli* isolated from bovine with diarrhea (Le Bouguenec and Bertin, 1999).

The screened virulence genes have been detected in *E. coli* isolated from extraintestinal infections (Johnson, 2003; Johnson and Russo, 2005). They encode for virulence factors. The presence of additional virulence factors in the same ExPEC isolate acts in additive fashion, enhancing the cumulative impact of pathogenicity in urinary tract infections (Yamamoto et al., 1996). We identified 14 ExPEC in effluents (city wastewater and treated effluent) harboring more than five virulence genes, and they all belonged to phylogroup B2. Clinical isolates of ExPEC typically belong to phylogenetic groups B2 and, at a lesser extend D (Picard et al., 1999). It is worthy of note that the most potentially pathogenic ExPEC for humans were all isolated in wastewater from human origin and treated effluent. ExPEC released into the river might persist in the environment. In fact, isolates, with the same virulence characteristics that we detected, were isolated from surfac waters in St. Clair River and Detroit River areas, from recreational waters collected in Great Lakes in Canada, from estuarine waters collected in Australia (Hamelin et al., 2006, 2007; Masters et al., 2011). Recently, Anastasi et al. detected identical *E. coli* isolates with uropathogenic characteristics in final effluents of WWTP and in the environment near these effluents had been released (Anastasi et al., 2012). They suggested that *E. coli* strains surviving wastewater treatment can also survive in the environment.

The screening of EHEC associated genetic markers revealed that the prevalence of these genes was very low in effluents. None of these 1248 isolates harbored both *eae* and *stx* genes.

Atypical EPEC were detected in city wastewater, slaughterhouse wastewater and in the treated effluent. Other studies showed the presence of *eae*-positive *E. coli* isolates in effluents from human and animal origin (Awais et al., 2007; Garcia-Aljaro et al., 2005; Holler et al., 1999; Vernozy-Rozand et al., 2004). Loukiadis et al. detected 54 *eae*-positive *E. coli* isolates among 5001 isolates from various effluents from 12 slaughterhouses in France (Loukiadis et al., 2006). Here, we confirmed that the prevalence of *eae*-positive *E. coli* isolates in effluents was very low. Among the five isolated EPEC, two were *eae* β 1-positive, which a subtype frequently detected in atypical EPEC in humans isolates (Hernandes et al., 2009). Hamilton et al. detected *eae*-positive *E. coli* isolates with the same characteristics in Avalon Bay, CA. Most of these isolates were atypical EPEC and also carried the β intimin subtype (Hamilton et al., 2010). These results suggest that, as ExPEC, atypical EPEC released by WWTP might persist in the environment. The pathogenic potential of atypical EPEC remains controversial, but recently atypical EPEC have been linked to outbreaks of human diseases (Ochoa and Contreras, 2011).

We only detected one STEC in city wastewater. Using colony hybridization, Garcia-Aljaro et al. (2004) detected one *stx2*-positive *E. coli* isolate per 1000 coliform colonies in municipal sewage. These results are in agreement with what we observed. It is worthy of note that we did not isolate STEC in slaughterhouse wastewater, whereas Garcia-Aljaro et al. detected one *stx2*-positive *E. coli* isolate per 100 coliform colonies in wastewater from animal origin (Garcia-Aljaro et al., 2004). Moreover, we did not detect any STEC in the outlet effluent. This might be explained by the low prevalence of STEC in the studied effluents, and this is consistent with the fact that we did not isolate EHEC after enrichment and immunomagnetic separation of *E. coli* belonging to the five major serogroups.

Finally, we detected ESBL-producing *E. coli* in inlet and outlet effluents at a low prevalence. These isolates were multiresistant, as observed for the majority of clinical ESBL producers (Livermore et al., 2007). They did not harbor virulence genes, with the exception of one isolate which was *eae* β 1-positive. ESBL-producing *E. coli* were mainly detected in city wastewater. Amongst these strains, the gene *bla*_{TEM-52} was predominant. Only one isolate harbored a *bla*_{CTX-M-14} gene. This distribution differs from that published for ESBL-producing *E. coli* isolated from healthy subjects and patients in France, where CTX-M-producing isolates were predominant (Arpin et al., 2009; Janvier et al., 2011; Nicolas-Chanoine et al., 2013). It is worthy of note that differences in the distribution of *bla*_{CTX-M} were also observed between these studies, confirming the fact that many factors may affect the digestive carriage of ESBL-producing *E. coli*. In our study, it would be interesting to evaluate the genetic relatedness of *E. coli* isolates carrying the gene *bla*_{TEM-52}, in order to precise if a clonal isolate was widespread in city wastewater. One CTX-M-1-producing *E. coli* was isolated from slaughterhouse effluent. This is in agreement with other studies showing that *bla*_{CTX-M} genes are predominant in ESBL-producing *E. coli* isolated from cattle and pig in France (Madec et al., 2008; Meunier et al., 2006; Valat et al., 2012). Finally, one CTX-M-1-producing *E. coli* was isolated from the treated effluent and was released in the river. Here, we confirmed the fact that WWTP failed to eliminate ESBL-producing *E. coli*, in agreement with other studies (Dolejska et al., 2011; Galvin et al., 2010).

5. Conclusion

- In conclusion, we have shown that STEC, atypical EPEC, ExPEC and/or ESBL-producing *E. coli* were present in effluents of a WWTP, receiving slaughterhouse effluents.
- Among the investigated strains, the most prevalent and the most potentially pathogenic were ExPEC. The prevalence of ExPEC was significantly higher in wastewater from the city compared to the slaughterhouse. Moreover, the prevalence of ExPEC was not impacted by treatment in the WWTP.
- ESBL-producing *E. coli* had mainly a human origin too.
- The prevalence of atypical EPEC was very low, and a unique STEC was isolated from human wastewater.
- ExPEC, atypical EPEC and ESBL-producing *E. coli*, discharged into the river might persist in the environment and could be transmitted to humans and animals.

Acknowledgments

This work was supported by grant 08004687 from the Conseil Régional de Midi Pyrénées. We thank Djamel Boudjerba (Université de Jijel, Algérie) and Sébastien Gorecki (INSERM UMR1043, Toulouse) for their involvement in the study, Michele Bourry (INSERM UMR1043, Toulouse) and Nathalie Arpaillange (UMR1331 Toxalim, Toulouse) for their technical assistance, Didier Concordet (UMR1331 Toxalim, Toulouse) for his assistance in statistical analysis, Emmanuelle Sandrin-Gabriel (Biogram Society, Toulouse) for her assistance in effluents sampling, Frédéric Auvray (ANSES, Maisons-Alfort) for the detection of *eae* variants and *fliC* genes, and the Genomic Platform of Toulouse Midi Pyrénées Genopole for sequencing.

REFERENCES

- Anastasi, E.M., Matthews, B., Gundogdu, A., Vollmerhausen, T.L., Ramos, N.L., Stratton, H., Ahmed, W., Katouli, M., 2010. Prevalence and persistence of *Escherichia coli* strains with uropathogenic virulence characteristics in sewage treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5882–5886.
- Anastasi, E.M., Matthews, B., Stratton, H.M., Katouli, M., 2012. Pathogenic *Escherichia coli* found in sewage treatment plants and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5536–5541.
- Arpin, C., Quentin, C., Grobost, F., Cambau, E., Robert, J., Dubois, V., Coulange, L., Andre, C., 2009. Nationwide survey of extended-spectrum (beta)-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 1205–1214.
- Awais, R., Miyayama, K., Unno, H., Tanji, Y., 2007. Occurrence of virulence genes associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw municipal sewage. *Biochemical Engineering Journal* 33, 53–59.
- Belanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C.M., 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 62, 1–10.
- Bertels, A., Pohl, P., Schlicker, C., Van Driessche, E., Charlier, G., De Greve, H., Lintermans, P., 1989. Isolatie van het Att111 fimbriële antigen op *Escherichia coli* geïsoleerd uit kalverdiarree: karakterizatie en evaluatie van de noodzaak tot aanpassing

- van de vaccins ter bestrijding van neonatale colidiarree. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 58, 118–122.
- Bertin, Y., Girardeau, J.P., Darfeuille-Michaud, A., Contrepois, 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. *Infection and Immunity* 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. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2921–2928.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Prère, M.F., Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2009. Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2999–3006.
- Blanch, A.R., Garcia-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., 2003. Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx2* gene from urban sewage. *Water Science and Technology* 47, 109–116.
- Bonacorsi, S., Bingen, E., 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *International Journal of Medical Microbiology* 295, 373–381.
- China, B., Pirson, V., Mainil, J.G., 1996. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3462–3465.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4555–4558.
- Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., Denamur, E., 2011. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 654–662.
- CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals—third Edition. Document M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
- CLSI, 2009a. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—tenth Edition. CLSI document M02-A10. CLSI, Wayne, PA.
- CLSI, 2009b. Performance Standards for Antimicrobial Testing; 19th Informational Supplement. Document M100-S19. CLSI, Wayne, PA.
- Coque, T.M., Oliver, A., Perez-Diaz, J.C., Baquero, F., Canton, R., 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 500–510.
- Craun, G.F., Calderon, R.L., Craun, M.F., 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *International Journal of Environmental Health Research* 15, 243–262.
- Curtis, T., 2003. Bacterial pathogen removal from wastewater treatment plants. In: Duncan, M., Horan, N. (Eds.), *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Elsevier, pp. 477–490.
- De Rycke, J., Milon, A., Oswald, E., 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research* 30, 221–233.
- Dho-Moulin, M., Fairbrother, J.M., 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* 30, 299–316.
- Dolejska, M., Frolkova, P., Florek, M., Jamborova, I., Purgertova, M., Kutilova, I., Cizek, A., Guenther, S., Literak, I., 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 2784–2790.
- Dozois, C.M., Clement, S., Desautels, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M., 1997. Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. *FEMS Microbiology Letters* 152, 307–312.
- Dutour, C., Bonnet, R., Marchandin, H., Boyer, M., Chanal, C., Sirot, D., Sirot, J., 2002. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 534–537.
- Escobar-Paramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Skurnik, D., Denamur, E., 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology* 8, 1975–1984.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H., 2012. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 646–655.
- Ferens, W.A., Hovde, C.J., 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens* 8, 465–487.
- Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L.H., Baljer, G., Beutin, L., Karch, H., 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2460–2463.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D., Cormican, M., 2010. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4772–4779.
- Garcia-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J., Blanch, A.R., 2005. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiology Letters* 246, 55–65.
- Garcia-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J., Blanch, A.R., 2004. Prevalence of the *stx2* gene in coliform populations from aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3535–3540.
- 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. *Infection and Immunity* 56, 2180–2188.
- Girardeau, J.P., Lalioui, L., Said, A.M., De Champs, C., Le Bouguenec, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 218–226.
- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., Riley, L.W., 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1375–1377.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.a., Bekal, S., Fairbrother, J.M., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R., 2006. A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4200–4206.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.a., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R., 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 477–484.

- Hamilton, M.J., Hadi, A.Z., Griffith, J.F., Ishii, S., Sadowsky, M.J., 2010. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water Research* 44, 5463–5473.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3163–3170.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., Shinagawa, H., 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Research* 8, 11–22.
- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A., Gomes, T.A., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 297, 137–149.
- Holler, C., Koschinsky, S., Witthuhn, D., 1999. Isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from municipal sewage. *Lancet* 353, 2039.
- Hunter, P.R., 2003. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. *Journal of Water and Health* 1, 65–72.
- Janvier, F., Merens, A., Delaune, D., Soler, C., Cavallo, J.D., 2011. Fecal carriage of third-generation cephalosporins-resistant *Enterobacteriaceae* in asymptomatic young adults: evolution between 1999 and 2009. *Pathologie Biologie* 59, 97–101.
- Johnson, J.R., 2003. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infectious Disease Clinics of North America* 17, 261–278. viii.
- Johnson, J.R., Clabots, C., Kuskowski, M.A., 2008a. Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 4078–4082.
- Johnson, J.R., Oswald, E., O'Bryan, T.T., Kuskowski, M.A., Spanjaard, L., 2002. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *Journal of Infectious Diseases* 185, 774–784.
- Johnson, J.R., Owens, K., Gajewski, A., Clabots, C., 2008b. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *Journal of Infectious Diseases* 197, 218–224.
- Johnson, J.R., Russo, T.A., 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology* 295, 383–404.
- Johnson, J.R., Russo, T.A., Scheutz, F., Brown, J.J., Zhang, L., Palin, K., Rode, C., Bloch, C., Marrs, C.F., Foxman, B., 1997. Discovery of disseminated J96-like strains of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing genes for both PapG(J96) (class I) and PrsG(J96) (class III) Gal(alpha1-4)Gal-binding adhesins. *Journal of Infectious Diseases* 175, 983–988.
- Johnson, J.R., Stell, A.L., 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases* 181, 261–272.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123–140.
- Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* 140, 360–370.
- Korhonen, T.K., Valtonen, M.V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S.B., Makela, P.H., 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and Immunity* 48, 486–491.
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A., 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1189–1193.
- Le Bouguenec, C., Bertin, Y., 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Veterinary Research* 30, 317–342.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-Cas, E., 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews In Microbiology* 28, 371–409.
- Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Clements, M.L., O'Brien, A.D., 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *Journal of Infectious Diseases* 152, 550–559.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N., 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 165–174.
- Loukiadis, E., Kerouredan, M., Beutin, L., Oswald, E., Brugere, H., 2006. Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3245–3251.
- Madec, J.Y., Lazizzera, C., Chatre, P., Meunier, D., Martin, S., Lepage, G., Menard, M.F., Lebreton, P., Rambaud, T., 2008. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1566–1567.
- Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C.P., Marault, M., Scheutz, F., Brugere, H., Jamet, E., Auvray, F., 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2035–2041.
- Manges, A.R., Johnson, J.R., 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clinical Infectious Diseases* 55, 712–719.
- Marshall, B.M., Levy, S.B., 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* 24, 718–733.
- Masters, N., Wiegand, A., Ahmed, W., Katouli, M., 2011. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *Water Research* 45, 6321–6333.
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortes, P., Gonzalez, J.J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F., 2006. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 211–215.
- Meunier, D., Jouy, E., Lazizzera, C., Kobisch, M., Madec, J.Y., 2006. CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *International Journal of Antimicrobial Agents* 28, 402–407.
- Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., Schouler, C., 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3366–3376.
- Nicolas-Chanoine, M.H., Gruson, C., Bialek-Davenet, S., Bertrand, X., Thomas-Jean, F., Bert, F., Moyat, M., Meiller, E.,

- Marcon, E., Danchin, N., Noussair, L., Moreau, R., Leflon-Guibout, V., 2013. 10-Fold increase (2006–11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 562–568.
- Ochoa, T.J., Contreras, C.A., 2011. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion In Infectious Diseases* 24, 478–483.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P., 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes* 18, 185–192.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P., 2005. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1162–1168.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahim, N., Bingen, E., Elion, J., Denamur, E., 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity* 67, 546–553.
- Pignato, S., Coniglio, M.A., Faro, G., Weill, F.X., Giammanco, G., 2009. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *Journal of Water and Health* 7, 251–258.
- Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B., Poirel, L., 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 52–59.
- Poole, K., 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 2200–2223.
- Reinthal, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., Marth, E., 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research* 37, 1685–1690.
- Ron, E.Z., 2006. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 9, 28–32.
- Russo, T.A., Johnson, J.R., 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases* 181, 1753–1754.
- Sabate, M., Prats, G., Moreno, E., Balleste, E., Blanch, A.R., Andreu, A., 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research In Microbiology* 159, 288–293.
- Saladin, M., Cao, V.T., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., Arlet, G., 2002. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters* 209, 161–168.
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A.D., 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2951–2963.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gastra, W., 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 601–604.
- Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miro, E., Gomez, J., Mirelis, B., 2000. *Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4676–4678.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2009. Broad-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 295–316.
- 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. *Journal of general microbiology* 83, 95–111.
- Toth, 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). *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4285–4291.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Tardelli Gomes, T.A., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* 8, 508–513.
- Trott, D., 2012. beta-lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from animals. *Current Pharmaceutical Design* 19, 239–249.
- Valat, C., Auvray, F., Forest, K., Metayer, V., Gay, E., Peytavin de Garam, C., Madec, J.Y., Haenni, M., 2012. Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 4677–4682.
- Vernozzy-Rozand, C., Montet, M.P., Bertin, Y., Trably, F., Girardeau, J.P., Martin, C., Livrelli, V., Beutin, L., 2004. Serotyping, *stx2* subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2556–2559.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* 85, 11–19.
- Wu, J., Long, S.C., Das, D., Dorner, S.M., 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *Journal of Water and Health* 9, 265–278.
- Yamamoto, S., Nakata, K., Yuri, K., Katae, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O., 1996. Assessment of the significance of virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* in experimental urinary tract infection in mice. *Microbiology and Immunology* 40, 607–610.
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O., 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 12, 85–90.
- Yamamoto, S., Tsukamoto, T., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O., 1997. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *Journal of Urology* 157, 1127–1129.

VII.3.2. Poster N° 1

«Prevalence and characterization of pathogenic and extend-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewaters of an urban wastewater treatment plant collecting slaughterhouse effluents»

Diallo Alpha Amadou, Bibbal Delphine, Gorecki Sébastien, Dupouy Véronique, Kérourédan Monique, Arpaillange Nathalie, Toutain Pierre-Louis, Oswald Eric, Bousquet-Mélou Alain et Brugère Hubert

Poster présenté lors des journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies à Toulouse 21 avril 2012.

Introduction: EHEC (enterohaemorrhagic *E. coli*), are an intestinal pathogen causing severe human diseases. They are characterized by two main virulence factors (Stx and eae). The ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) exhibit considerable genome diversity and possess a broad range of virulence-associated factors. While the extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) are a group of enzymes mediating resistance to most beta-lactams used in human and veterinary medicines.

Objectives: The objectives of this study were: to evaluate the prevalence of ESBL-producing *E. coli* and *E. coli* harboring genes associated with EHEC and ExPEC in effluents of an urban Wasterwater treatment plant; to characterize these strains in order to compare the strains of human origin and animal origin; and to evaluate the possible dissemination of these strains in the environment.

Methods: A total of 1248 *E. coli* isolates were collected and was screened by PCR for 11 virulence genes associated with EHEC (*stx₁*, *stx₂*, and *eae*) and ExPEC (*papEF*, *afa/Dra*, *sfa/focDC*, *hlyA*, *cnfx*, *f17*, *clbN* and *KpsMT*). For the research of ESBL-producing *E. coli*, the *E. coli* isolates were tested with both ceftazidime and cefotaxime.

Results: A total of 61 ExPEC, 6 *eae*-positives *E. coli* and 1 *stx*-positive *E. coli* were isolated from the collection. The prevalence of genes associated with ExPEC in the effluent from the city was significantly higher than the effluent from the slaughterhouse. Nine ESBL-producing *E. coli* were detected in the collection including 2 *E. coli* isolates in the effluent from city and 2 *E. coli* isolates in the effluent from the slaughterhouse and the outlet treated effluent, expressing CTX-M-14 and CTX-M-1 respectively.

Conclusion: A potential pathogenic *E. coli* escape from urban wastewater treatment system. Thus, the river forms a final destination for virulence and resistance genes and might serve as an environmental reservoir. The *E. coli* isolates carrying virulence genes associated with ExPEC was the most prevalent in the environment. The contribution of the slaughterhouse in the dissemination of the pathogenic *E. coli* was less important than the effluents from city, which are actually the main origin of ExPEC, EHEC and ESBL-producing *E. coli*.

Prevalence and characterization of pathogenic and extend-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewaters of an urban wastewater treatment plant collecting slaughterhouse effluents

Diallo Alpha Amadou^{1,4}, Bibbal Delphine¹, Gorecki Sébastien¹, Dupouy Véronique², Kérouédan Monique¹, Arpaillange Nathalie¹, Toutain Pierre-Louis¹, Oswald Eric¹, Bousquet-Mélou Alain¹ and Brugère Hubert¹

¹UMR1043, INSERM, INRA USC1360, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France ²ISRA / INERV, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Dakar-Hann, Sénégal ³UMR1331 Toxalim, INRA, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France ⁴INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France

Introduction

Livestock is a reservoir of pathogenic and/or antibiotic resistant *E. coli* strains. However, humans can also harbor these strains. We have looked for these strains in effluents of a urban wastewater treatment plant (WWTP) collecting slaughterhouse effluents. We focused on EHEC (enterohaemorrhagic *E. coli*), ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) and extend-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli*. EHEC are an intestinal pathogens causing severe human diseases. They are characterized by two main virulence factors (Stx and eae). ExPEC exhibit considerable genome diversity and possess a broad range of virulence-associated factors. While the ESBLs are a group of enzymes mediating resistance to most beta-lactams used in human and veterinary medicine. These enzymes are now widely distributed worldwide in Gram-negative bacteria, with a specific and still growing expansion of those of the CTX-M-type.

Objectives

To evaluate the prevalence of ESBL-producing *E. coli* and *E. coli* harboring genes associated with EHEC and ExPEC in effluents of a urban WWTP collecting slaughterhouse effluents; and to characterize these strains in order to :

- ✓ to compare the strains of human origin (input effluent from the city) and animal origin (input effluent from the slaughterhouse)
- ✓ to evaluate the dissemination of these strains in the environment (output treated effluent).

Materials and Methods

3 sampling sites :

P1 = input effluent from the city
P2 = input effluent from the slaughterhouse
P3 = output treated effluent

P: Sampling location (number of *E. coli* isolated)

Targeted genes associated with ExPEC: *fwA*, *afa/draBC*, *papEF*, *hlyA*, *afa/focDE*, *K1*, *clbN*, *hlyF*, *fli7* at *oxyS*

Targeted genes associated with EHEC: *eae*, *stx1* et *stx2*

Phenotypes were attributed to *E. coli* isolates according to their set of virulence genes or markers: for STEC, *stx1* and/or *stx2*; for AEEC, *eae* and for ExPEC, *E. coli* strains carrying at least three among these genes: *papEF*, *afa/foc*, *afa/dra*, *clbN*, *hlyF*, *hlyA*, *clbN*, *fwA* and *kpsMT* (*K1*). The remainder *E. coli* isolates were defined as "Others".

Results

Prevalence of EHEC, ExPEC and ESBL-producing *E. coli*

		Sampling sites		
		P1 (n=416)	P2 (n=416)	P3 (n=416)
Enteric pathogens	AEEC	0.7 % (3)	0.2 % (1)	0.5 % (2)
	STEC	0.2 % (1)	0.0 % (0)	0.0 % (0)
Extraintestinal pathogens	ExPEC	8.2 % (34)	1.2 % (5)	5.3 % (22)
	"Others"	6.0 % (22)	0.5 % (2)	2.0 % (6)
ESBL - producing <i>E. coli</i>		1.6 % (7)	0.2 % (1)	0.2 % (1)

Characterization of ESBL-producing *E. coli*

Phenotypical resistance	CTX-M	Resistance genes
AMX CF CIM STR C NA SSS TMP	CTX-M-14	<i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{CTX-M14}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i>
AMX CF CIM NA	-	<i>bla_{TEM-52}</i>
AMX CF CIM NA	-	<i>bla_{TEM-52}</i>
AMX CF CIM NA	-	<i>bla_{TEM-52}</i>
AMX AMC CF CIM STR C NA SSS TMP TET	-	<i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{CTX-M14}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i>
AMX AMC CF CIM STR C NA SSS TMP TET	-	<i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{CTX-M14}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i>
AMX CF CIM	CTX-M-14	<i>bla_{TEM-52}</i>
AMX CF CIM SSS TMP	CTX-M-1	-
AMX CF CIM STR C NA CIP SSS TMP	CTX-M-1	<i>bla_{TEM-52}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i>

Characterization of STEC and AEEC

Strains code	genes	Sub-type, Serotype	Phylogenetic groups	Antibiotic resistance
M1	<i>eae</i>	ND	B2	S
M2	<i>eae</i>	ND	B2	S
M3	<i>stx1-stx2</i>	<i>stx1a</i> and <i>stx2b</i>	B1	S
M4	<i>eae</i>	<i>eae</i> β1	A	ESBL (CTX-M14)
M5	<i>eae</i>	<i>eae</i> β1, O158:H2	B1	S
M6	<i>eae</i>	ND	B2	S
M7	<i>eae</i>	ND	B2	S

Essential points

EHEC :

- ✓ No EHEC strain was isolated.
- ✓ One STEC strain was observed in the effluent from the city and contained both *stx_{1a}* and *stx_{2b}*.
- ✓ The *stx*-positive and *eae*-positive *E. coli* isolates were susceptible to all tested antibiotics; except one AEEC strain harboring *bla_{CTX-M14}* gene.

ExPEC :

- ✓ The prevalence of ExPEC was higher in P1 than in P2.
- ✓ ExPEC isolated from the city harbored more genes than ExPEC isolated from the slaughterhouse; and they mainly belonged to B2 phylogenetic group.
- ✓ 85% of ExPEC isolates were multidrug resistant. The large majority of isolates carrying more than 3 genes were resistant to less than 4 antibiotics.

ESBL-producing *E. coli* :

- ✓ The prevalence of ESBL - producing *E. coli* was higher in P1 (2%) than P2 (0.2%) and P3 (0.2%).
- ✓ Two isolates from P1 and the P2 harboring *bla_{CTX-M14}* and one isolate from P1 harboring *bla_{CTX-M14}* genes were detected among these ESBL-producing *E. coli*.

Characterization of ExPEC

Phylogenetic groups of ExPEC according to the number of genes and the sampling point

Antibiotic resistance of *E. coli* of ExPEC

Conclusion

- ✓ Presence of potentially pathogenic and/or resistant *E. coli* released in the environment (possible contamination of humans).
- ✓ In this study, the main reservoir of ExPEC and BLSE-producing *E. coli* seemed to be the city.

Study was supported by

144

VII.3.3. Porter N°2

«Antimicrobial resistance of shiga toxine gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of an urban wastewater treatment plant collecting slaughterhouse effluents»

D. Bibbal, V. Dupouy, **A.A. Diallo**, M. Kérourédan, N. Arpaillange, P.L. Toutain, E. Oswald, A. Bousquet-Mélou et H. Brugère.

Poster présenté lors :

- 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment, 26-29 juin 2012, Aix-en-Provence, France.
- 9ème congrès national de la Société Française de Microbiologie, 7 et 8 février 2013, Lille France.
- 4th “Toulouse-München-Zaragoza” Symposium on Veterinary Sciences, 11-12 avril 2013, Toulouse, France.

Introduction & Objectives: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains are responsible for severe clinical symptoms in humans. Typical EHEC strains carry *stx* and *eae* genes. The objective of this study was to determine the antimicrobial resistance of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* strains, previously isolated from wastewaters of an urban WWTP, collecting slaughterhouse effluents.

Material & Methods: The antimicrobial resistance of 143 *stx*- and/or *eae*-positive isolates was investigated by disk diffusion method. These isolates were obtained from the input effluents from the slaughterhouse (55), and the city (41), and from the output treated effluent (47 isolates, among which four *stx2*- and *eae*-positive *E. coli* O157:H7 isolates).

Results: Concerning the animal isolates, 71% were resistant, mainly to tetracycline. Concerning the human isolates, 24% were resistant, mainly to ampicillin and tetracycline. However, we have detected an ESBL-producing *E. coli* in the input effluent from the city. This isolate was positive for the *eae-β1* gene. Concerning the output effluent, 28% of the isolates were resistant. The four *stx2*- and *eae*-positive *E. coli* O157:H7 isolates were susceptible to all tested antibiotics.

Conclusions: Our results suggest that the profile of antimicrobial resistance of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* seemed to be different between human and animal origin. In addition, the isolates showing high virulence for humans were susceptible to all tested antibiotics.

Antimicrobial resistance of shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of an urban wastewater treatment plant collecting slaughterhouse effluents

D. Bibbal¹, V. Dupouy², A.A. Diallo^{1,3}, M. Kérourédan¹, N. Arpaillange², P.L. Toutain²,
E. Oswald¹, A. Bousquet-Mélou² and H. Brugère¹ (h.brugere@envt.fr)

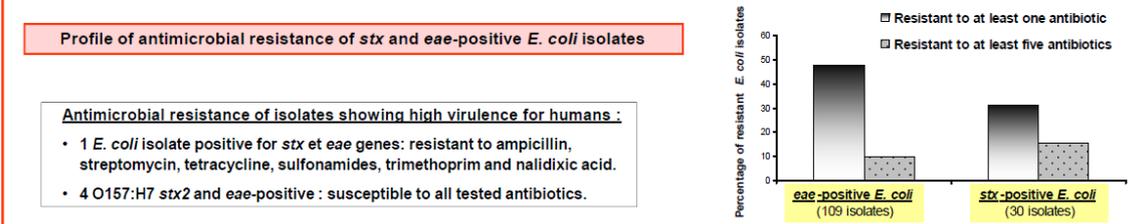
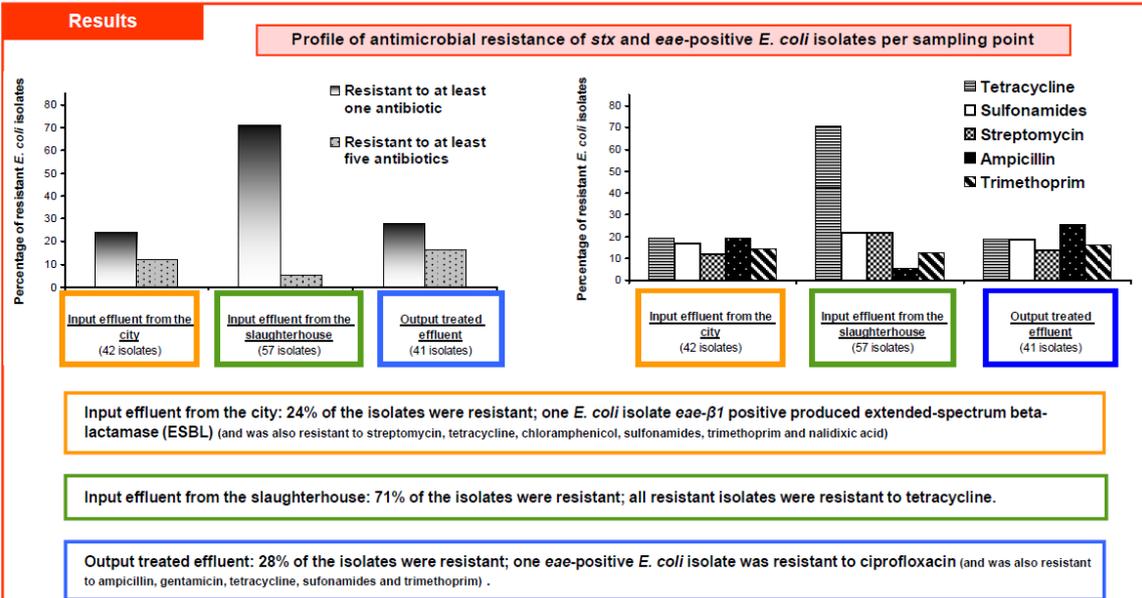
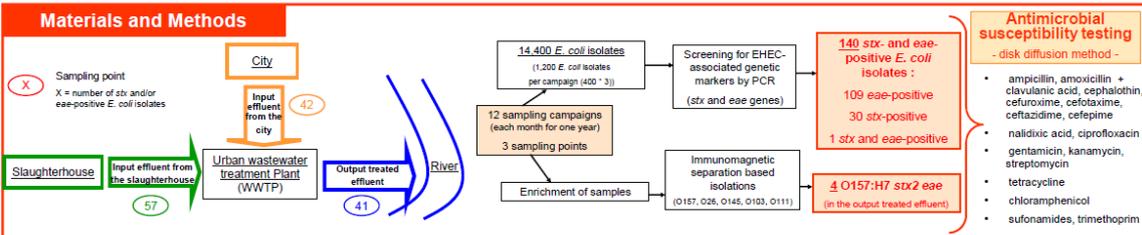


¹UMR1043, INSERM, INRA USC1360, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France ³ISRA/LNERV, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Dakar-Hann, Sénégal
²UMR1331 Toxalim, INRA, INP-ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France ⁴INSERM UMR1043, INRA USC1360, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France



Introduction Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains are responsible for severe clinical symptoms in humans. Typical EHEC strains carry both *stx* and *eae* genes. The objective of this study was to determine the antimicrobial resistance of *stx* and *eae*-positive *E. coli* strains, previously isolated from wastewater of an urban wastewater treatment plant (WWTP), collecting slaughterhouse effluents in order to :

- compare the antimicrobial resistance of *stx* and *eae*-positive *E. coli* isolates from human and animal origin,
- determine the antimicrobial resistance of *stx* and *eae*-positive *E. coli* released in the environment.



Conclusions

- * The profile of antimicrobial resistance of *stx*- and *eae*-positive *E. coli* isolates seemed to be different between human and animal origin.
- * One *eae*β1- positive *E. coli* isolate (human origin) produced extended-spectrum beta-lactamase (ESBL).
- * Isolates showing high virulence for humans (4 O157:H7 *stx*2 and *eae*-positive) were susceptible to all tested antibiotics.



Chapitre 8 : DISCUSSION

Les objectifs de nos études étaient : i) d'évaluer la prévalence des souches EHEC et ExPEC et les souches productrices de BLSE dans les effluents d'origine humaine ou animale; ii) de caractériser ces souches pour les comparer et enfin iii) d'évaluer une éventuelle dissémination de ces souches dans l'environnement.

- Dans un premier temps, en France, une série de résultats, qui pourrait amener à une meilleure compréhension sur la prévalence et les caractéristiques moléculaires des souches porteuses de gènes associés aux EHEC dans les effluents d'origine animale et humaine, a été obtenue. Des isolats de *E. coli* possédant des gènes *eae* et/ou *stx* ont été retrouvés à des prévalences de 0,80%, 1,15% et 0,80% respectivement dans les effluents urbains, des effluents d'abattoirs et des effluents traités à la sortie d'une station d'épuration où étaient collectés et traités à la fois les effluents urbains et ceux de l'abattoir. De nos jours, peu de données sont disponibles sur la contamination de l'environnement par les eaux usées et plus particulièrement les effluents d'origine animale et humaine par des souches EHEC. Toutefois, une étude française portant sur des eaux usées urbaines a révélé la présence de souches de *E. coli* O157:H7 potentiellement pathogènes (458). Une autre étude réalisée sur 12 abattoirs en France montre sur une collection de 5 001 *E. coli*, que 25% des échantillons des souches *stx*⁺ et/ou *eae*⁺; elle étaient trouvées respectivement dans 13% et 3% des échantillons d'effluents traités avant rejet dans l'environnement et des boues d'épuration destinées à l'épandage (279).

Dans notre étude, la prévalence des souches porteuses de gènes associés aux EHEC était plus élevée dans les effluents d'origine animale que dans les effluents urbains. Ce résultat confirme le postulat que les animaux sont les réservoirs de souches *E. coli* porteuses de gènes associés aux EHEC. Des études ont montré que les ruminants domestiques sont le principal réservoir animal, particulièrement les bovins (172) et, à un moindre degré, les moutons et probablement les chèvres (250). Une étude réalisée en Allemagne montre une corrélation positive entre les infections provoquées par différents sérotypes de STEC et la densité des bovins par secteur. Ainsi, à partir des données issues de plus de 3 000 cas d'infections à STEC, les analyses ont montré que le risque pour la survenue de l'infection augmente de 68% par 100 bovins additionnels/km² (144). Néanmoins, la présence de souches potentiellement EHEC dans les effluents humains a aussi été décrite dans plusieurs études. Holler et al. (192) ont été les premiers chercheurs à signaler la présence de EHEC dans les eaux usées

municipales. Ils ont isolé une souche de *E. coli* O157:H7 dans les effluents d'entrée d'une station d'épuration de 55 000 équivalents-habitants.

Par ailleurs, notre étude, contrairement à ce qui a été décrit dans les études antérieures, montre que la prévalence des souches porteuses des marqueurs de virulence des EHEC était plus élevée en automne et particulièrement au mois de novembre. Dans la littérature des variations ont été observées, une nette variation a été notée entre la saison chaude et l'hiver avec une prévalence beaucoup plus importante pendant la saison chaude. Ainsi des études réalisées sur des bovins à l'abattoir ont permis de constater une nette diminution d'*E. coli* O157:H7 à partir du mois d'octobre (463). Cependant, nos résultats corroborent ceux obtenus en Ecosse sur l'excrétion animale des souches potentiellement EHEC (436). Ces résultats pourraient être dus à la saisonnalité de l'excrétion animale des EHEC. La plupart des études menées en Europe ainsi que dans beaucoup d'autres régions du monde ont montré une forte saisonnalité de l'excrétion, la prévalence atteint un sommet en été et début d'automne (134, 180, 312, 379).

Les résultats combinés des enquêtes épidémiologiques et des études expérimentales montrent que la production de Stx2 est davantage associée à la maladie chez l'homme (48, 63). Lors d'une infection par des souches STEC qu'elles soient O157 ou non, elle serait même significativement associée à un risque plus élevé de développer un SHU (63). Parmi les 35 souches STEC mises en évidence dans les trois effluents étudiés, la majorité (28/35) possèdent au moins un gène *stx2* et peuvent donc être considérées potentiellement pathogènes pour l'homme. L'action des toxines Stx est potentialisée par la présence du gène *eae* qui assure l'attachement des souches EHEC aux cellules hôtes par interaction entre l'intimine et son récepteur. L'attachement peut également être augmenté par l'interaction de l'intimine avec la nucléoline, un récepteur à intimine localisé à la surface des cellules hôtes dont l'expression est augmentée par Stx2 (385). Lors du criblage par PCR conventionnelle, une souche portait à la fois les gènes *eae* et *stx1a* et était du sérotype O111:H8 isolé dans les épidémies de EHEC en France.

Par ailleurs, l'absence du gène *bfp* parmi nos souches *eae*-positives, a permis de les classer dans le groupe des EPEC « atypiques ». Plusieurs études montrent que les souches EPEC « typiques » capables de synthétiser à la fois l'intimine et le gène *bfp* étaient plus fréquentes chez les souches humaines, à l'exception de quelques souches EPEC « typiques » isolées chez le chien et le chat (11, 24).

Dans notre étude, nous avons recherché les 5 sérogroupes majeurs (O157, O26, O103, O145 et O111) par IMS spécifique après enrichissement pour les 12 campagnes de prélèvement et par PCR à temps réel sur les souches STEC, AEEC et pEHEC identifiées dans la collection d'isolats de *E. coli*. Les souches O111 et O103 étaient plus fréquentes. En France, la plupart des épidémies à EHEC sont dues à des souches non O157 comme les souches O26:H11, O26:H-, O111:H-, O103:H2, O145:H-. Les EHEC non O157 sont responsables d'épidémies associées à des cas de diarrhée, des colites hémorragiques et au SHU chez l'homme (63, 187).

La classification phylogénétique des souches AEEC, STEC et pEHEC a été réalisée afin de déterminer la relation entre la virulence et l'appartenance aux quatre groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D. Nos résultats montrent que les souches AEEC d'origine animale étaient majoritairement du groupe phylogénétique B1. Ces résultats corroborent ceux observés dans l'étude de Clermont et al. (88) où ils ont montré que la plupart des souches pathogènes intestinales ou InPEc (« Intestinal Pathogenic *E. coli* ») appartenaient aux groupes phylogénétiques A et B1.

Le développement de la résistance aux antibiotiques est un problème global qui nécessite des actions de recherche et de surveillance notamment au niveau de l'environnement. Nos résultats montrent que le pourcentage de souches *E. coli* résistantes aux antibiotiques était de 64% dans les effluents des abattoirs contre 16% dans les effluents des villes. La majorité des souches étaient résistantes aux tétracyclines. Par exemple, dans les effluents d'origine animale, l'ensemble des souches porteuses de gènes de virulence associés aux EHEC étaient résistantes aux tétracyclines. Ces résultats peuvent expliquer par l'utilisation élevée des antibiotiques dans le traitement des maladies en élevage et particulièrement les tétracyclines. L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est la conséquence de la pression de sélection exercée sur le microbiote intestinal des hommes et des animaux sous antibiothérapie. Une fois rejetées dans les eaux, les bactéries fécales résistantes aux antibiotiques et les gènes correspondants contribueraient à enrichir le résistome (ensemble des gènes de résistance) des communautés autochtones de l'environnement, notamment en disséminant ces gènes par transfert horizontal et/ou transposition (475).

Sur les dix dernières années, le tonnage global d'antibiotiques utilisés annuellement en France dans le secteur de l'élevage est de l'ordre de 1300 tonnes (399) et représente le double du tonnage consommé chez l'Homme (322). Les tétracyclines représentent la moitié de ce

tonnage d'antibiotiques. Les sulfamides, les macrolides et les bêta-lactamines viennent en deuxième position.

Dans notre étude, un grand nombre de souches STEC étaient résistantes à plus de 5 antibiotiques et des niveaux plus élevés de résistance aux antibiotiques ont été observés dans les isolats de *E. coli* des effluents d'origine animale que dans les effluents urbains. De plus les effluents en sortie de la STEP sont contaminés par des *E. coli* porteurs de gènes *stx* et *eae* potentiellement pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques, ces souches sont rejetées dans l'environnement et représentent donc un risque pour la santé publique par contamination des eaux usées superficielles et des végétaux.

- Dans un deuxième temps, sur une des campagnes de prélèvement en France nous avons étudié la prévalence des souches portant les gènes de virulence des ExPEC.

Les études épidémiologiques récentes réalisées chez l'animal démontrent que des souches cliniques isolées chez l'animal peuvent notamment porter les gènes *sfa/focDE*, *fyuA*, *hlyF*, *papEF*, *f17*, *cnf1*, *hlyA* (130, 158, 212). Notre étude a montré que les souches de *E. coli* d'origine humaine et animale partageaient un certain nombre de gènes de virulence associés aux ExPEC mais que les souches potentiellement ExPEC (ayant plus de trois gènes) étaient associées préférentiellement au réservoir humain (8,5% contre 1,2%). Peu de données existent quant à la prévalence de ces souches dans ces deux réservoirs puisque la plupart des études ont été effectuées sur des isolats cliniques.

Cependant, les mêmes résultats ont été obtenus sur des souches *E. coli* isolées à partir des eaux de surfaces de la rivière St. Clair, la rivière de Detroit ; à partir des eaux de baignade dans les Grands Lacs au Canada et à partir des eaux d'estuaires recueillies en Australie (177, 178, 301). Récemment, Anastasi *et al.* ont isolé des souches *E. coli* porteuses des gènes de virulence caractéristiques des souches uropathogènes dans les effluents terminaux de station d'épuration et dans l'environnement proche des rejets d'effluents (14).

Dans une étude comparative entre des isolats d'hommes sains et d'animaux (oiseaux, bovins) il a été démontré que les souches humaines portaient significativement plus de gènes de virulence associés aux ExPEC que les souches d'origine animale (dont *hlyA*, *sfa/foc* et *pap*) (127) ; ce qui va dans le sens de nos résultats. Il semblerait en effet que le portage de gènes de

virulence associés aux infections par des *E. coli* extra-intestinales séjournant dans l'intestin soit beaucoup plus fréquent chez l'homme que chez l'animal (439).

Par ailleurs, dans notre étude, la faible prévalence de souches porteuses de gènes de virulence dans le réservoir animal pourrait être due à l'espèce animale étudiée. En effet, l'abattoir traite en majorité des porcs et en moins grande quantité des ruminants. Or, les études tendent à montrer que les souches d'origine aviaires partagent un plus grand nombre de facteurs de virulence avec notamment les souches UPEC et NMEC isolées chez l'homme (129). Certains facteurs de virulence sont également communs entre des souches bovines et humaines (155). Il est donc possible que dans un abattoir spécialisé en volailles ou ayant une activité bovine plus marquée nous puissions trouver des résultats différents.

Enfin d'un point de vue épidémiologique, l'abattoir contribuerait de manière négligeable au rejet de souches potentiellement ExPEC par rapport à la ville. En effet, l'effluent de l'abattoir était cent fois moins chargé que l'effluent urbain (2 log d'écart du nombre d'*E. coli*), et possédait un débit cinquante fois moindre (environ 2% de P1). De plus la proportion de souches potentiellement ExPEC était sept fois moindre (5 souches potentiellement ExPEC sur 416 souches au niveau de l'abattoir contre 35 sur 416 dans l'effluents urbain). Soit un débit 35 000 fois moindre en termes de nombre de souches potentiellement ExPEC s'écoulant par unité de temps.

L'étude de la prévalence des gènes de virulence associés aux ExPEC en sortie de la station d'épuration nous a permis d'évaluer les risques de dissémination. De plus, une comparaison entre les effluents urbains et les effluents de sortie a permis d'appréhender un éventuel effet traitement.

Tout d'abord, nous avons pu constater qu'en sortie subsistaient des souches porteuses de ces gènes. Globalement, nous avons trouvé moins de souches porteuses de gènes de virulence associés aux ExPEC dans l'effluent de la ville que dans les effluents traités même si le nombre de souches ayant plus de trois gènes de virulence était le même pour les deux points de prélèvement. Cela est dû au fait que certains gènes et plus particulièrement *hlyA* et *K1* avaient une prévalence beaucoup plus faible en sortie. Malgré ces constatations il est difficile de conclure quant à un effet traitement. Nous ne pouvons en effet nous appuyer sur aucune étude pour émettre une telle hypothèse. Une étude de notre équipe non publiée, effectuée sur

plusieurs abattoirs munis de stations d'épuration a montré que la proportion de souches porteuses des gènes de virulence *f17*, *papEF* et *sfa/focDE* ne variait pas aux différents stades du traitement épuratoire. En outre, le traitement biologique ne s'est pas accompagné d'un abattement spécifique des souches porteuses de gènes de virulence. Quelques études montrent cependant que certaines espèces bactériennes résistent moins bien au traitement biologique que d'autres (469). L'effet d'abattement spécifique que nous avons constaté peut tout à fait être dû à l'échantillonnage ; d'autres campagnes devraient être étudiées afin de confirmer ou infirmer ces résultats.

Cela dit, un nombre relativement important de souches potentiellement ExPEC ont été rejetées dans l'environnement (environ 5% des *E.coli*). Le traitement biologique a permis un abattement de 2 log de la population d'*E. coli* totale mais un nombre non négligeable des $2,9 \times 10^2$ *E.coli*/mL recueillies au niveau du rejet final étaient porteuses de gènes de virulence associées aux ExPEC. Ce qui tendrait à prouver qu'il y a donc bien eu une dissémination de souches potentiellement ExPEC. Certains de ces gènes sont présents sur le chromosome au niveau d'îlots de pathogénicité ou sur des plasmides qui sont des éléments génétiques mobiles pouvant participer au transfert horizontal de gènes (309, 338) à d'autres bactéries. La capacité de l'espèce *E. coli* à porter de nouvelles combinaisons de gènes pourrait conduire à des souches très agressives provenant de l'environnement, comme ce fut lors de la récente épidémie à *E. coli* O104:H4 en Allemagne et en France (310).

La comparaison de la distribution de souches porteuses de gènes de virulence associés aux ExPEC dans les effluents d'un couple abattoir/station d'épuration nous a permis de constater que les souches d'origine animale partagent des facteurs de virulence avec les souches d'origine humaine. Cependant, une quantité négligeable est retrouvée au niveau de l'abattoir ; le principal réservoir de souches potentiellement ExPEC serait donc humain. Dans notre étude, la contribution de l'abattoir à la dissémination de ces souches serait négligeable par rapport à la ville.

Une caractérisation plus fine des souches rejetées a permis de mettre en évidence que ces souches sont munies d'un grand éventail de facteurs de virulence portés pour certains par des éléments génétiques mobiles. De plus elles appartiennent essentiellement aux groupes B2 et D, signe de leur potentielle virulence. Tous points de prélèvement confondus, les souches d'intérêt appartenaient majoritairement aux groupes phylogénétiques B2 et D (81%). Par

ailleurs nous avons pu constater que c'étaient les souches qui portaient le plus de gènes de virulence qui appartenait aux groupes B2 et D. En effet 95% de celles ayant plus de trois gènes étaient réparties dans les groupes B2 et D. Cette relation entre facteurs de virulence et groupe phylogénétique est rapportée dans la littérature, les souches *E. coli* porteuses de facteurs de virulence associées aux maladies extra-intestinales sont réparties majoritairement dans le groupe B2 et de manière moindre dans le groupe D, les souches commensales appartenant plutôt aux groupes B1 et A (40, 211). Le gène *papEF* serait particulièrement réparti dans les groupes B2 et D (117) ce que nous avons pu constater par ailleurs dans notre étude. Les souches identifiées dans notre étude seraient donc bien potentiellement pathogènes.

En ce qui concerne la situation de la résistance dans les milieux médicaux et communautaires, la multiplication des bactéries pathogènes productrices de BLSE pose un problème particulier. Une variabilité de la prévalence des BLSE est observées sur le plan international. En Europe, la prévalence en France, en Italie et au Portugal est entre 20 et 30%, en Scandinavie, en Espagne, aux Pays-Bas et en Allemagne, elle est nettement plus faible avec une prévalence comprise entre 5 et 10% (119).

Les denrées alimentaires d'origine animale et l'environnement sont avec les animaux eux-mêmes, les principaux réservoirs d'agents pathogènes zoonotiques et le taux de détection de souches *E. coli* productrices de β -lactamases a augmenté ces dernières années. Dans notre étude sur 1 248 isolats de *E. coli*, 9 souches de *E. coli* productrices de BLSE ont été détectées. Les souches BLSE étaient toutes multi résistantes. Sur les trois souches BLSE avec un gène CTX-M, nos recherches sur la résistance associée ont montré également la présence du gène TEM1. Les mêmes résultats ont été rapportés dans l'étude de Reinthaler (377), sur 15 souches BLSE porteuses de gènes CTX-M, 4 souches étaient porteuses avec d'autres gènes de résistance. Des études antérieures ont montré que les plasmides qui interviennent dans la résistance aux BLSE peuvent transporter plus d'un gène bêta-lactamase comme CTX-M et TEM (474), ce qui peut potentialiser l'action des bêta-lactamases (234). Les gènes *bla*_{TEM-1} et *bla*_{TEM-52} sont portés par le même plasmide conjugatif et peuvent être transférés dans d'autres souches (207). Nos résultats montrent que 6 souches parmi les 9 portaient en même temps les gènes *bla*_{TEM-1} et *bla*_{TEM-52}.

Les bêta-lactamases de type TEM sont décrites depuis assez longtemps. Aujourd'hui, plus de 100 dérivés de bêta-lactamase de type TEM sont décrits et beaucoup d'entre eux sont des

BLSE. Contrairement aux bêta-lactamases de type TEM, le groupe des CTX-M bêta-lactamases a connu une évolution rapide ces dernières années (122, 349).

Mesa et al. (311) ont trouvé des souches productrices de BLSE dans de nombreux échantillons provenant de fermes (porcs, poulets et lapins) et ont également pu en isoler à partir d'échantillons de boues d'épuration. Nos résultats montrent qu'il existe des *E. coli* productrices de BLSE dans les effluents urbains et dans les effluents d'abattoir, et qu'ils représentent donc une source de dissémination de ces bactéries dans l'environnement. La dissémination est possible à partir des boues d'épuration destinées à l'épandage et des eaux traitées rejetées dans les rivières dont l'eau peut être utilisée pour usage agricole.

Des comparaisons entre des souches d'origine animale et humaine ont pu mettre en évidence des différences phylogénétiques. Les souches humaines seraient beaucoup plus fréquemment associées aux groupes B2 et D que les souches d'origine animale majoritairement B1 (78). De plus en plus de souches appartenant aux groupes B2 se retrouvent dans la flore intestinale de l'homme, surtout dans les populations occidentales et elles peuvent être plus importantes parmi les *E. coli* constituant la flore dominante (126, 262). Cependant, dans notre étude vu le faible nombre de souches issues du réservoir animal étudiées nous ne pouvons pas comparer les souches humaines et animales sur la base de leur groupe phylogénétique.

Pour les souches porteuses de gènes de virulence des ExPEC les taux de résistance les plus élevés étaient pour l'ampicilline (53%), les sulfonamides (48%), la streptomycine (40%) et la tétracycline (38%). De tels niveaux de résistance ont précédemment été décrits chez des souches de *E. coli* isolées chez l'homme et l'animal sains (450). Les β -lactamases et les fluoroquinolones constituent le traitement de base pour les ITU. Dans notre étude, aucune souche n'était productrice de BLSE mais il est intéressant de relever qu'un nombre non négligeable de ces souches étaient résistantes à l'acide nalidixique et la ciprofloxacine qui sont des fluoroquinolones. Enfin, un nombre important (16%) de souches étaient résistantes à l'association amoxicilline + acide clavulanique qui est un inhibiteur de β -lactamase ; cela signe que ces souches sont productrices d'enzymes particulières les « *Inhibitor resistant TEM* » (IRT) (82). Globalement, un nombre important de souches multi-résistantes a été rejeté en sortie de la station d'épuration ce qui a déjà été décrit (178, 390). Or la plupart des gènes de résistance sont portés par des plasmides et intégrons qui pourraient être transmis à d'autres souches de l'environnement.

En comparant le nombre de gènes de virulence et le nombre de résistances nous avons montré que les souches les plus virulentes étaient globalement résistantes à moins d'antibiotiques que celles moins virulentes. Il semblerait en effet que les souches résistantes à différents antibiotiques dont les β -lactamines et fluoroquinolones aient moins de gènes de virulence que celles sensibles à ces antibiotiques. Les traitements antibiotiques pourraient en effet favoriser la perte de gènes par excision des îlots de pathogénicité (223, 459).

L'étude de prévalence des gènes de virulence associés aux ExPEC en sortie de la station d'épuration nous a permis d'évaluer les risques de dissémination. Il a été démontré que des souches ExPEC étaient capables de survivre à un traitement biologique. Une étude a permis la détection d'une proportion importante d'*E. coli* porteuses de gènes associés aux ExPEC dans une rivière en aval d'une station d'épuration, mais aussi dans des écosystèmes relativement éloignés de toute activité humaine, prouvant que de telles souches peuvent se propager et perdurer dans l'environnement (178). Un nombre non négligeable de souches porteuses de gènes de virulence a été rejeté dans l'environnement. Certains de ces gènes sont présents sur le chromosome au niveau d'îlots de pathogénicité qui sont des éléments génétiques mobiles pouvant participer au transfert horizontal de gènes (338). C'est le cas notamment pour le gène *papEF* (codant pour une fimbriae de type P), et les gènes *hlyA* et *cnf1* (codant pour deux toxines) qui sont associés dans un îlot de pathogénicité chez certaines souches responsables d'épisodes d'ITU (390). Or, dans notre étude 2 souches présentaient la combinaison de ces trois facteurs de virulence, et 4 souches combinaient deux de ces trois facteurs, témoignant de la présence de cet îlot. Il en est de même pour le gène *sfa/focDE* (dont la prévalence était de 2,2% en sortie de station d'épuration) qui code pour un *fimbriae* impliqué dans des cas de méningites et pyélonéphrites (288). Il existe des preuves de l'implication de *pap* dans le développement d'ITU. Une étude a mis en évidence que 80% des souches responsables de pyélonéphrites exprimaient *papG* qui partage la même famille avec *PapEF* (442). Dans cette même étude, il a été démontré que les *fimbriae* P permettaient d'échapper à l'action des neutrophiles mobilisés lors des infections et que cette action était due à *papG* (442). Il est associé dans un îlot de pathogénicité à un autre gène *iroN* impliqué dans la captation du fer (110). Enfin, *clbN* dont la prévalence était très élevée dans notre étude code pour la colibactine, une génotoxine associée aux souches responsables de maladies extra-intestinales et est porté par l'îlot de pathogénicité *pks* (212, 330). Les gènes marqueurs de l'îlot dont fait

partie le gène *clbN* ont été significativement associés à une bactériémie, et principalement identifiés chez des bactéries du groupe phylogénétique B2 avec une virulence très élevée.

Enfin, certains des gènes que nous avons trouvés sont codés par des plasmides susceptibles d'être transmis à d'autres souches (309). C'est le cas de *hlyF* dont le rôle dans les infections extra-intestinales demeure inconnu. Ce gène est porté par certains plasmides impliqués dans différentes maladies extra-intestinales ; or ces plasmides sont connus pour porter d'autres gènes de virulence mais aussi des gènes de résistance aux antibiotiques (354, 485). Enfin, le gène *cnf2* qui code pour une toxine impliquée dans des maladies animales se trouve sur le plasmide Vir hautement virulent (344). Il était d'ailleurs porté par une souche d'origine animale dans notre étude. Ce résultat corrobore ceux d'études précédentes qui avaient montré que *cnf2* (NTEC-2) était le plus souvent associé à des souches d'origine animale (103, 225, 453).

Les souches retrouvées en sortie de station d'épuration portaient donc des gènes de virulence associés à des maladies chez l'homme et pouvant être transmises à d'autres souches dans l'environnement. Enfin, notre étude souligne l'importance de la surveillance des flux des gènes de virulence des *E. coli* pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques dans les populations bactériennes de l'environnement afin de prévenir les risques environnementaux pour la santé publique.

- Dans un troisième temps nous avons voulu pouvoir comparer les résultats obtenus en France avec ceux pouvant être obtenu au Sénégal. Dans le contexte actuel, l'utilisation d'eaux usées en agriculture est une pratique de plus en plus répandue au Sénégal, en particulier dans la zone périurbaine de Dakar, où la culture grâce aux eaux pluviales ne peut se faire sur une longue période. Par ailleurs, les infrastructures d'assainissement, dans des villes à urbanisation galopante, n'arrivent pas à suivre les besoins. A partir des usines, des ménages, des marchés, des hôpitaux, etc... les eaux usées débouchent dans les rues, les lits de rivières, les canaux d'eaux pluviales ou dans des stations d'épuration à faible capacité de traitement. C'est généralement autour de ces eaux usées, plus ou moins stagnantes, que les sites de maraichage sont créés, par des populations pauvres des zones périurbaines et/ou immigrantes des campagnes. La pratique de l'utilisation de toutes sortes d'eaux usées s'y opère alors de manière non planifiée et non contrôlée dans les activités d'agriculture urbaine, incluant l'arrosage de légumes consommables crus. Le principal risque de la réutilisation des eaux

usées est d'ordre sanitaire, liée à la survie des germes pathogènes dans ces eaux comme nous l'avons montré avec les prélèvements en France.

De nombreuses études indiquent que des isolats bactériens résistants et/ou pathogènes d'origine humaine ou animale sont excrétés dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux usées (203, 368, 481).

Les connaissances sur le comportement et les caractéristiques des souches d'*E. coli* pathogènes et/ou résistantes dans l'environnement, en particulier au cours des phases de traitement des eaux usées, sont mal connues et aucun plan de surveillance de ces bactéries dans l'environnement n'a été mis en place au Sénégal. Ainsi, afin de documenter les risques microbiens liés à l'utilisation des eaux usées de la station d'épuration urbaine et des abattoirs, nous avons caractérisé les souches de *E. coli* isolées dans ces deux types de prélèvement.

Les résultats obtenus au Sénégal ont montré que la charge en *E. coli* dans les effluents des abattoirs était le double de celle des effluents d'origine humaine (3×10^6 contre $1,5 \times 10^6$). Cependant, nos résultats de dénombrement étaient plus élevés à ceux obtenus dans notre étude en France pour les eaux usées des effluents urbains et ceux des travaux de Tsai et *al.* dans les effluents d'hôpitaux (449). Contrairement aux résultats obtenus en France, le traitement par chloration à la sortie de la STEP a permis d'éliminer les *E. coli* au niveau du rejet final. Aucune souche de *E. coli* n'a été isolée dans les effluents urbains traités. Par ailleurs, ce résultat s'oppose à ceux obtenus par Vernozzy-Rozand et *al.* (458) où 60% des souches STEC isolées d'effluents d'élevages et de stations d'épurations urbaines étaient retrouvées dans les effluents traités et rejetés dans le milieu extérieur. Cette différence observée pourrait se justifier par les techniques de prélèvement, la diversité des méthodes de traitement des eaux usées utilisées d'une station d'épuration à une autre et la destination de cette eau traitée. Au Sénégal, les eaux issues du traitement sont souvent réutilisées pour l'arrosage des légumes en culture maraîchère et des espaces verts et par les entreprises de construction. Par contre en France et dans la plupart des pays développés, le traitement des eaux usées est destiné à réduire la charge microbienne avant leur rejet dans l'environnement.

Nous avons détecté des *E. coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les eaux usées brutes avant traitement et dans les effluents de l'abattoir, ce qui indique un risque potentiel de contamination de l'environnement. Les prévalences des gènes *stx* et *eae* associés aux EHEC

dans les effluents des abattoirs étaient respectivement de 0,7 % et 0,7%. Les effluents d'abattoir sont moins contaminés par des gènes de virulence associés aux EHEC que les effluents d'abattoir en France. Aucune souche porteuse de gènes de virulence associés aux EHEC n'a été isolée dans les effluents urbains de Dakar. Nos résultats en France et dans plusieurs autres études, il a été démontré la présence de *E. coli* eae-positifs et stx-positives dans les effluents d'origine humaine et animale (2, 19, 22, 28, 62).

La prévalence des souches ExPEC a été recherchée sur la collection des 540 isolats. Nos résultats ont montré que les gènes de virulence associés aux ExPEC étaient présents dans les effluents d'origine humaine et animale. Les mêmes résultats ont été observés dans plusieurs études montrant que les souches de *E. coli* porteuses de facteurs de virulence associés aux ExPEC étaient présentes dans les eaux usées d'origine humaine (1, 7, 19, 47) et d'origine animale (57). Les prévalences des gènes *fuyA* et *f17* étaient plus élevées. Les souches porteuses du gène *f17* ont été uniquement isolées dans les effluents d'origine humaine. Or, en général, les souches *E. coli f17* sont le plus souvent isolées chez les animaux en particulier lors des cas cliniques de mammite chez les bovins. Par exemple, aux Pays-Bas 55% des souches de *E. coli* isolées du lait de vaches associées à des cas de mammite exprimaient les fimbriae FI7 (41, 48). Contrairement aux résultats obtenus en France où a été montrée une forte association des gènes de virulence (souches porteuses de plus de cinq gènes de virulence), les souches isolées au Sénégal à partir des effluents urbains et des effluents d'abattoir avaient une faible association de gènes de virulence. Les gènes *sfa/foc* et *kpsMT* étaient absents sur toute la collection. La caractérisation des isolats a révélé que les souches porteuses des gènes de virulence associés aux ExPEC appartenaient au groupe B1. Cela pourrait s'expliquer par une très faible association de gènes observée chez ces souches. Deux souches étaient du groupe B2 dont une portait les gènes *clbN* / *papEF* / *fuyA* et la deuxième portait le gène *clbN*. Le gène *clbN* est un marqueur de la région 3' de l'îlot PKS et intervient dans la synthèse de la colibactine qui est un génotoxique entraînant des cassures double-brin de l'ADN dans les cellules eucaryotes, et il a été démontré que l'îlot PKS était significativement associé à la bactériémie (33, 49). Les études épidémiologiques antérieures ont montré que les souches *E. coli* isolées d'infections extra-intestinales portaient plusieurs gènes de virulence et appartenaient principalement au groupe phylogénétique B2 et dans une moindre mesure au groupe D (6, 9, 34, 53). Les souches portant des gènes de virulence associés aux ExPEC isolées au Sénégal ne peuvent pas être considérées comme des souches

potentiellement ExPEC. Cependant, ces souches restent un danger pour la santé publique en raison de leur croissance rapide et de la plasticité de leur génome. Elles peuvent échanger du matériel génétique par transfert horizontal et devenir pathogènes.

L'étude de l'antibiorésistance sur les souches isolées au Sénégal montre que les effluents urbains avaient plus de souches résistantes aux antibiotiques que les effluents d'abattoir (63,2 % versus 14,5%). Ces résultats s'opposent à ceux obtenus sur les souches isolées en France où les souches d'origine animale étaient plus résistantes aux antibiotiques que les souches d'origine humaine. Il en est de même dans l'étude réalisée par Martel et *al.*, qui ont observé des résistances très élevées sur des souches *E. coli* d'origine bovine vis-à-vis de l'ampicilline, à la streptomycine, à la kanamycine, au chloramphénicol, à la tétracycline et des sulfonamides (296). 32,6 % des souches de *E. coli* isolées des eaux usées urbaines étaient résistantes à plus de 4 antibiotiques, mais le profil de résistance le plus commun était l'association entre l'ampicilline, la streptomycine et la tétracycline. Nos résultats confirment ceux obtenus par (29) sur des *E. coli* à partir des boues d'épuration, la résistance la plus fréquente était celle à la streptomycine (56,5%), suivie de la doxycycline (54,7%) et l'ampicilline (19,8%). En outre, nos résultats corroborent ceux obtenus par (58) qui a montré que 75 % des souches de *E. coli* résistantes à l'ampicilline étaient également résistantes à la streptomycine et la tétracycline.

La faible résistance des souches d'*E. coli* isolées de l'abattoir vis-à-vis de ces antibiotiques pourrait s'expliquer par l'utilisation très limitée des antibiotiques dans les élevages bovins extensifs au Sénégal. Autrement dit, dans le système extensif les éleveurs ne font pas recours systématiquement à la thérapie médicamenteuse et utilisent le plus souvent des connaissances traditionnelles, même si cette tendance se renverse progressivement. A l'inverse, nous observons un haut niveau de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées des animaux d'élevage en Europe notamment en France, où non seulement les antibiotiques sont utilisés à des fins thérapeutiques mais aussi à titre prophylactique.

La présente étude montre que les eaux usées brutes sont un réservoir pour une variété de facteurs de virulence associés aux ExPEC et aux EHEC et pour des *E. coli* résistantes aux antibiotiques et que le traitement des effluents ne permet de réduire que le nombre de *E. coli* susceptible d'être rejeté dans l'environnement. Des souches potentiellement pathogènes et résistantes rejetées dans les eaux superficielles représentent donc un risque pour la santé publique.

Chapitre 9 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons évalué la contamination des effluents d'un couple abattoir/station d'épuration urbaine, en région Midi-Pyrénées, par des *Escherichia coli* porteuses de gènes de virulence et/ou résistantes aux antibiotiques au cours d'une année.

Dans le couple abattoir/station d'épuration urbaine étudié, la contribution des effluents de l'abattoir était relativement faible (5% des débits et moindre population d'*E. coli*).

La recherche des souches porteuses de gènes associés aux EHEC a été réalisée sur l'ensemble de la collection, et a montré que les souches *eae* et/ou *stx* positives sont ubiquistes dans les effluents d'eaux usées et des abattoirs. Au total 144 (140 + 4) souches porteuses de gènes associés aux EHEC ont été isolées dont 109 *eae* positives, 30 *stx* positives et 5 *eae/stx* positives. Les prévalences respectives étaient de 0,8%, 1,1% et 0,8% dans les eaux usées, les effluents d'abattoir et le rejet final. La prévalence de ces souches reste néanmoins très faible. Les 5 souches *eae/stx* positives étaient isolées à partir des effluents destinés à être rejetés dans l'environnement. Les effluents rejetés dans l'environnement contenaient des souches potentiellement EHEC qui pouvaient participer à l'entretien du cycle épidémiologique des EHEC, la voie environnementale étant une source de contamination pour les bovins d'une part, chez lesquels elles font l'objet d'un portage asymptomatique, et chez les hommes d'autre part, chez lesquels elles sont responsables d'infections graves.

Après caractérisation de ces souches, nous avons démontré que 50% des souches *eae* positives appartenaient à l'un des variants *eae* $\beta 1$, *eae* $\gamma 1$, *eae* θ et *eae* ϵ . Le variant *eae* $\beta 1$ était majoritaire et ce variant était retrouvé sur 39% des souches d'origine animale contre 3,7% des souches d'origine humaine. Au contraire, la prévalence de souches *stx* positives était plus élevée dans les souches d'origine humaine que dans les souches d'origine animale (43,7% contre 15,6%) et les variants *stx*_{1d}, *stx*_{2g} et *stx*_{2f} étaient absents parmi les souches *stx* positives. Par ailleurs, nous avons démontré que 70% des souches porteuses de gènes associés aux EHEC d'origine animale étaient résistantes aux tétracyclines contre 20% chez les souches d'origine humaine.

La recherche des souches porteuses de gènes associés aux ExPEC et les souches productrices de BLSE a été réalisée que sur la campagne 2, et a montré que les souches ExPEC provenaient majoritairement des eaux usées urbaines. De plus, la caractérisation plus fine de

ces souches (sur le plan de la phylogénie et de la résistance aux antibiotiques) a montré que les souches potentiellement ExPEC appartenaient au groupe phylogénétique B2 et provenaient essentiellement des eaux usées urbaines et seraient donc d'origine humaine, en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. La prévalence des souches porteuses de gènes associés aux ExPEC était très faible dans les effluents de l'abattoir. Ces souches potentiellement ExPEC sont aussi retrouvées dans l'effluent rejeté dans l'environnement mais en moindre proportion, indiquant une probable efficacité du traitement épuratoire.

Des souches productrices de BLSE ont été isolées dans les effluents parmi la population d'*E. coli* d'origine humaine et animale. La prévalence de ces souches reste néanmoins très faible. Les souches productrices de BLSE d'origine humaine étaient majoritaires et elles appartenaient toutes au groupe phylogénétique A. L'étude génotypique des BLSE révèle que 6 des 7 souches d'origine humaine portaient le gène *bla*_{TEM-52}. Deux souches portant le gène *bla*_{CTX-M-1} ont été isolées dans les effluents d'abattoir et dans les effluents traités.

Les eaux usées et les effluents des abattoirs d'animaux en France sont contaminés par des *E. coli* porteuses de gènes de virulence et/ou de résistance et donc potentiellement pathogènes pour l'homme.

Bien que la majorité d'entre elles aient été détectées dans les effluents à l'entrée de la STEP, certaines souches ont été retrouvées dans les effluents traités destinés à être rejetés dans la rivière. Ces dernières semblent avoir été capables de survivre au cours du traitement épuratoire des effluents et il conviendrait d'étudier plus précisément la contamination en amont et en aval du point de rejet des effluents traités dans la rivière afin d'évaluer la contribution des STEP sur la contamination de l'environnement par des souches *E. coli* pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques.

Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent que le rejet des effluents des abattoirs participe à l'entretien du cycle environnemental de souches *E. coli* potentielles pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques. Le rejet des effluents dans les eaux de surface ou vers des stations d'épuration urbaines pourraient ainsi contribuer à disséminer largement dans l'environnement des souches d'*E. coli* potentiellement pathogènes pour l'homme.

L'environnement constituerait dès lors un réservoir de souches d'*E. coli* possédant des gènes associés à la virulence des EHEC, des ExPEC et des BLSE. Or, la plupart de ces gènes sont

portés par des éléments génétiques mobiles et les échanges de gènes au sein des populations d'*E. coli* présentes non seulement dans les effluents mais aussi dans les matrices environnementales où ils sont rejetés pourraient être nombreux. L'étude de la distribution de *cif* conduit par Loukiadis (280) a d'ailleurs permis de démontrer que ce gène de virulence pouvait avoir été disséminé au sein des populations d'*E. coli* de l'environnement par transfert horizontal. Néanmoins, même si les gènes phagiques constituent un métagénome considérable pour les populations d'*E. coli* et semblent jouer un rôle important dans leur évolution, les mécanismes impliqués dans l'émergence de nouveaux clones EHEC et ExPEC pathogènes sont complexes et encore mal connus. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'environnement pourrait être l'un des principaux réservoirs où s'effectueraient de nombreux échanges de gènes à l'origine de l'émergence de nouveaux clones pathogènes et/ou résistants pour l'homme. Ils soulignent l'importance de la surveillance des flux de gènes de virulence des EHEC et des ExPEC dans les populations bactériennes de l'environnement afin de prévenir les risques environnementaux pour la santé publique.

La comparaison des résultats obtenus en France et au Sénégal montre que les prévalences des souches *E. coli* potentiellement pathogènes étaient plus élevées dans les effluents rejetés en France.

REFERENCES

1. **Aarestrup, F. M., H. Hasman, Y. Agero, L. B. Jensen, S. Harksen, and B. Svensmark.** 2006. First description of blaCTX-M-1-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production. *J Antimicrob Chemother* **57**:1258-9.
2. **Aarestrup, F. M., H. Hasman, and L. B. Jensen.** 2005. Resistant *Salmonella virchow* in quail products. *Emerg Infect Dis* **11**:1984-5.
3. **Abe, A., L. J. Arend, L. Lee, C. Lingwood, R. O. Brady, and J. A. Shayman.** 2000. Glycosphingolipid depletion in fabry disease lymphoblasts with potent inhibitors of glucosylceramide synthase. *Kidney Int* **57**:446-54.
4. **Abe, C. M., F. A. Salvador, I. N. Falsetti, M. A. Vieira, J. Blanco, J. E. Blanco, M. Blanco, A. M. Machado, W. P. Elias, R. T. Hernandez, and T. A. Gomes.** 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**:397-406.
5. **Adlerberth, I., L. A. Hanson, C. Svanborg, A. M. Svennerholm, S. Nordgren, and A. E. Wold.** 1995. Adhesins of *Escherichia coli* associated with extra-intestinal pathogenicity confer binding to colonic epithelial cells. *Microb Pathog* **18**:373-85.
6. **AFSSA.** 2010. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. Maisons-Alfort:Afssa **19 p.**
7. **Ahn, C. K., N. J. Holt, and P. I. Tarr.** 2009a. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and the hemolytic uremic syndrome: what have we learned in the past 25 years? *Adv Exp Med Biol* **634**:1-17.
8. **Ahn, C. K., A. J. Russo, K. R. Howell, N. J. Holt, P. L. Sellenriek, R. J. Rothbaum, A. M. Beck, L. J. Luebbering, and P. I. Tarr.** 2009b. Deer sausage: a newly identified vehicle of transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *J Pediatr* **155**:587-9.
9. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1999. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol* **7**:410-3.
10. **Allen, P. M., I. Roberts, G. J. Boulnois, J. R. Saunders, and C. A. Hart.** 1987. Contribution of capsular polysaccharide and surface properties to virulence of *Escherichia coli* K1. *Infect Immun* **55**:2662-8.
11. **Ambler, R. P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**:321-31.
12. **Amirlak, I., and B. Amirlak.** 2006. Haemolytic uraemic syndrome: an overview. *Nephrology (Carlton)* **11**:213-8.
13. **Ananias, M., and T. Yano.** 2008. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res* **41**:877-83.
14. **Anastasi, E. M., Matthews, B., Stratton, H.M., Katouli, M.,.** 2012. Pathogenic *Escherichia coli* found in sewage treatment plants and environmental waters. *Appl Environ Microbiol* **78**:5536-5541.
15. **Andersson, D. I., and D. Hughes.** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* **8**:260-71.
16. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-37.
17. **Antao, E. M., C. Ewers, D. Gurlebeck, R. Preisinger, T. Homeier, G. Li, and L. H. Wieler.** 2009. Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin. *PLoS One* **4**:e7796.
18. **Antao, E. M., L. H. Wieler, and C. Ewers.** 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* **1**:22.

19. **Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, and M. Ohta.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1612-5.
20. **Arpin, C., L. Coulange, V. Dubois, C. Andre, I. Fischer, S. Fourmaux, F. Grobost, J. Jullin, B. Dutilh, J. F. Couture, P. Noury, I. Lagrange, A. Ducastaing, H. P. Doermann, and C. Quentin.** 2007. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3440-4.
21. **Ateba, C. N., and C. C. Bezuidenhout.** 2008. Characterisation of *Escherichia coli* O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. *Int J Food Microbiol* **128**:181-8.
22. **Avery, S. M., and S. Buncic.** 2003. *Escherichia coli* O157 diversity with respect to survival during drying on concrete. *J Food Prot* **66**:780-6.
23. **Babic, M., A. M. Hujer, and R. A. Bonomo.** 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* **9**:142-56.
24. **Backhed, F., B. Alsen, N. Roche, J. Angstrom, A. von Euler, M. E. Breimer, B. Westerlund-Wikstrom, S. Teneberg, and A. Richter-Dahlfors.** 2002. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem* **277**:18198-205.
25. **Barker, J., T. J. Humphrey, and M. W. Brown.** 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* **173**:291-5.
26. **Batchelor, M., E. J. Threlfall, and E. Liebana.** 2005. Cephalosporin resistance among animal-associated Enterobacteria: a current perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther* **3**:403-17.
27. **Bauernfeind, A., and G. Horl.** 1987. Novel R-factor borne beta-lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infection* **15**:257-9.
28. **Bennett, P. M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S347-57.
29. **Bertels, A., P. Pohl, C. Schlicker, E. Van Driessche, G. Charlier, H. De Greve, and P. Lintermans.** 1989. Isolatie van het Att111 fimbriële antigen op *Escherichia coli* geïsoleerd uit kalverdiarree: karakterisatie en evaluatie van de noodzaak tot aanpassing van de vaccins ter bestrijding van neonatale colidiarree. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* **58**:118-122.
30. **Bertin, Y., K. Boukhors, N. Pradel, V. Livrelli, and C. Martin.** 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* **39**:3060-5.
31. **Bertin, Y., J. P. Girardeau, A. Darfeuille-Michaud, and M. Contrepois.** 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**:332-42.
32. **Bertin, Y., C. Martin, E. Oswald, and J. P. Girardeau.** 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**:2921-8.
33. **Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. Grimont, and J. M. Collard.** 2006. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J Clin Microbiol* **44**:2897-903.
34. **Bettelheim, K. A., L. Beutin, K. Gleier, J. L. Pearce, R. K. Luke, and S. Zimmermann.** 2003. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne, Australia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**:55-63.
35. **BEUTIN, L.** 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res* **30**:285-298.

36. **Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* **42**:1099-108.
37. **Bibbal, D., V. Dupouy, J. P. Ferre, P. L. Toutain, O. Fayet, M. F. Prere, and A. Bousquet-Melou.** 2007. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in Enterobacteriaceae and excretion of blaTEM genes in swine feces. *Appl Environ Microbiol* **73**:4785-90.
38. **Bibbal, D., V. Dupouy, M. F. Prère, P. L. Toutain, and A. Bousquet-Mélou.** 2009. Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:2999-3006.
39. **Bidet, P., F. Mahjoub-Messai, J. Blanco, M. Dehem, Y. Aujard, E. Bingen, and S. Bonacorsi.** 2007. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis* **196**:297-303.
40. **Bingen-Bidois, M., O. Clermont, S. Bonacorsi, M. Terki, N. Brahimi, C. Loukil, D. Barraud, and E. Bingen.** 2002. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* **70**:3216-26.
41. **Blanc, V., R. Mesa, M. Saco, S. Lavilla, G. Prats, E. Miro, F. Navarro, P. Cortes, and M. Llagostera.** 2006. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* **118**:299-304.
42. **Blanco, J., M. Blanco, J. E. Blanco, A. Mora, E. A. Gonzalez, M. I. Bernardez, M. P. Alonso, A. Coira, A. Rodriguez, J. Rey, J. M. Alonso, and M. A. Usera.** 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**:345-51.
43. **Blanco, J. E., M. Blanco, M. P. Alonso, A. Mora, G. Dahbi, M. A. Coira, and J. Blanco.** 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* **42**:311-9.
44. **Blanco, M., J. E. Blanco, M. P. Alonso, and J. Blanco.** 1996. Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *Eur J Epidemiol* **12**:191-8.
45. **Blanco, M., J. E. Blanco, G. Dahbi, M. P. Alonso, A. Mora, M. A. Coira, C. Madrid, A. Juarez, M. I. Bernardez, E. A. Gonzalez, and J. Blanco.** 2006. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol* **9**:103-10.
46. **Blum, G., V. Falbo, A. Caprioli, and J. Hacker.** 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett* **126**:189-95.
47. **Blum, G., R. Marre, and J. Hacker.** 1995. Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection* **23**:234-6.
48. **Boerlin, P.** 1999. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* **56**:735-41.
49. **Boisen, N., C. Struve, F. Scheutz, K. A. Krogh, and J. P. Nataro.** 2008. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun* **76**:3281-92.
50. **Bolton, D. J., C. M. Byrne, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, and I. S. Blair.** 1999. The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **86**:407-11.
51. **Bommarius, B., D. Maxwell, A. Swimm, S. Leung, A. Corbett, W. Bornmann, and D. Kalman.** 2007. Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir is an SH2/3 ligand that recruits and activates tyrosine kinases required for pedestal formation. *Mol Microbiol* **63**:1748-68.

52. **Bonacorsi, S., and E. Bingen.** 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol* **295**:373-81.
53. **Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1-14.
54. **Booher, S. L., N. A. Cornick, and H. W. Moon.** 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. *Vet Microbiol* **89**:69-81.
55. **Bornet, C., A. Davin-Regli, C. Bosi, J. M. Pages, and C. Bollet.** 2000. Imipenem resistance of enterobacter aerogenes mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol* **38**:1048-52.
56. **Bouvet, J., M. P. Montet, R. Rossel, A. Le Roux, C. Bavai, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy, V. Atrache, and C. Vernozy-Rozand.** 2002. Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* **77**:99-108.
57. **Bouvet, J., V. Livrelli, P. Mariani-Kurkdjan, and E. Oswald.** 2003. Pathologie humaine et animale liée aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). In AFSSA (ed.), Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). AFSSA:29-39.
58. **Bradford, P. A.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**:933-51, table of contents.
59. **Brain, M. C.** 1978. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries (Moschcowitz 1925). *Thromb Haemost* **40**:9-10.
60. **Brinas, L., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Saenz, M. C. Porrero, L. Dominguez, and C. Torres.** 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1262-4.
61. **Brinas, L., M. A. Moreno, T. Teshager, M. Zarazaga, Y. Saenz, C. Porrero, L. Dominguez, and C. Torres.** 2003. Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain. *Microb Drug Resist* **9**:201-9.
62. **Brinas, L., M. Zarazaga, Y. Saenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres.** 2002. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3156-63.
63. **Brooks, J. T., E. G. Sowers, J. G. Wells, K. D. Greene, P. M. Griffin, R. M. Hoekstra, and N. A. Strockbine.** 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis* **192**:1422-9.
64. **Buetow, L., G. Flatau, K. Chiu, P. Boquet, and P. Ghosh.** 2001. Structure of the Rho-activating domain of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nat Struct Biol* **8**:584-8.
65. **Burk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bulte, and E. Martlbauer.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* **41**:2106-12.
66. **Bush, K., and G. A. Jacoby.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:969-76.
67. **Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-33.
68. **Calderon, V. E., Q. Chang, M. McDermott, M. B. Lytle, G. McKee, K. Rodriguez, D. A. Rasko, V. Sperandio, and A. G. Torres.** 2011. Outbreak caused by cad-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111, Oklahoma. *Foodborne Pathog Dis* **7**:107-9.

69. **Calderwood, S. B., Akeson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J. and Griffin, P.M.** 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* **62** 118-119.
70. **Cambray, G., A. M. Guerout, and D. Mazel.** 2010. Integrons. *Annu Rev Genet* **44**:141-66.
71. **Campellone, K. G., D. Robbins, and J. M. Leong.** 2004. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* **7**:217-28.
72. **Campos, L. C., M. R. Franzolin, and L. R. Trabulsi.** 2004. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**:545-52.
73. **Canton, R., and T. M. Coque.** 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**:466-75.
74. **Canton, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 1**:144-53.
75. **Caprioli, A., V. Falbo, L. G. Roda, F. M. Ruggeri, and C. Zona.** 1983. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* **39**:1300-6.
76. **Carattoli, A., S. Lovari, A. Franco, G. Cordaro, P. Di Matteo, and A. Battisti.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:833-5.
77. **Cardinale, E., P. Colbachini, J. D. Perrier-Gros-Claude, A. Gassama, and A. Aidara-Kane.** 2001. Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 35:c:1,2. *J Clin Microbiol* **39**:2373-4.
78. **Carlos, C., M. M. Pires, N. C. Stoppe, E. M. Hachich, M. I. Sato, T. A. Gomes, L. A. Amaral, and L. M. Ottoboni.** 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol* **10**:161.
79. **Caron, E., and A. Hall.** 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**:1717-21.
80. **CDC.** 2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Two multistate outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections linked to beef from a single slaughter facility - United States, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **59**:557-60.
81. **Cerna, J. F., Nataro, J.P., Estrada-García, T.,** 2003. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2138-2140.
82. **Chaibi, E. B., D. Sirot, G. Paul, and R. Labia.** 1999. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* **43**:447-58.
83. **Chapman, P. A., C. A. Siddons, A. T. Gerdan Malo, and M. A. Harkin.** 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect* **119**:245-50.
84. **Chark, D., A. Nutikka, N. Trusevych, J. Kuzmina, and C. Lingwood.** 2004. Differential carbohydrate epitope recognition of globotriaosyl ceramide by verotoxins and a monoclonal antibody. *Eur J Biochem* **271**:405-17.
85. **China, B., V. Pirson, and J. G. Mainil.** 1996. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3462-5.
86. **Clegg, S., and D. C. Old.** 1979. Fimbriae of *Escherichia coli* K-12 strain AW405 and related bacteria. *J Bacteriol* **137**:1008-12.
87. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4555-8.

88. **Clermont, O., M. Olier, C. Hoede, L. Diancourt, S. Brisse, M. Keroudean, J. Glodt, B. Picard, E. Oswald, and E. Denamur.** 2011. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol* **11**:654-62.
89. **Cloekaert, A., K. Praud, B. Doublet, A. Bertini, A. Carattoli, P. Butaye, H. Imberechts, S. Bertrand, J. M. Collard, G. Arlet, and F. X. Weill.** 2007. Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase blaTEM-52 gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1872-5.
90. **CLSI.** 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals-third edition. . Document M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
91. **CLSI.** 2009a. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-tenth edition. . CLSI document M02-A10. CLSI, Wayne, PA.
92. **CLSI.** 2009b. Performance standards for antimicrobial testing ; 19th informational supplement. . Document M100-S19. CLSI, Wayne, PA. .
93. **Coimbra, R. S., F. Grimont, P. Lenormand, P. Burguiere, L. Beutin, and P. A. Grimont.** 2000. Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res Microbiol* **151**:639-54.
94. **Conedera, G., E. Mattiazzi, F. Russo, E. Chiesa, I. Scorzato, S. Grandesso, A. Bessegato, A. Fioravanti, and A. Caprioli.** 2007. A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. *Epidemiol Infect* **135**:311-4.
95. **Contamin, S., A. Galmiche, A. Doye, G. Flatau, A. Benmerah, and P. Boquet.** 2000. The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol Biol Cell* **11**:1775-87.
96. **Coque, T. M., F. Baquero, and R. Canton.** 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* **13**.
97. **Coque, T. M., A. Oliver, C. Pe, and F. Baquero.** 2002. Genes Encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 Extended-Spectrum Bêta-Lactamases Are Carried by Multiple *Klebsiella pneumoniae* Clones in a Single Hospital (Madrid , 1989 to 2000). *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:500-510.
98. **Costa, D., P. Poeta, L. Brinas, Y. Saenz, J. Rodrigues, and C. Torres.** 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **54**:960-1.
99. **Croxen, M. A., and B. B. Finlay.** 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:26-38.
100. **Crump, J. A., A. C. Sulka, A. J. Langer, C. Schaben, A. S. Crielly, R. Gage, M. Baysinger, M. Moll, G. Withers, D. M. Toney, S. B. Hunter, R. M. Hoekstra, S. K. Wong, P. M. Griffin, and T. J. Van Gilder.** 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* **347**:555-60.
101. **Czajkowska, D., H. Boszczyk-Maleszak, I. R. Sikorska, and A. Sochaj.** 2008. Studies on the survival of enterohemorrhagic and environmental *Escherichia coli* strains in wastewater and in activated sludges from dairy sewage treatment plants. *Pol J Microbiol* **57**:165-71.
102. **Darfeuille-Michaud, A.** 2002. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* **292**:185-93.
103. **De Rycke, J., A. Milon, and E. Oswald.** 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Res* **30**:221-33.
104. **Dean, P., and B. Kenny.** 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* **12**:101-9.
105. **Decludt, B., P. Bouvet, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, P. A. Grimont, B. Hubert, and C. Loirat.** 2000. Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

- infection in children in France. The Societe de Nephrologie Pediatrique. *Epidemiol Infect* **124**:215-20.
106. **Delihis, N., and S. Forst.** 2001. MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol* **313**:1-12.
107. **Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3597-602.
108. **Dias, R. C., D. V. Marangoni, S. P. Smith, E. M. Alves, F. L. Pellegrino, L. W. Riley, and B. M. Moreira.** 2009. Clonal composition of *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* **15**:303-8.
109. **Doane, C. A., P. Pangloli, H. A. Richards, J. R. Mount, D. A. Golden, and F. A. Draughon.** 2007. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse farm environments. *J Food Prot* **70**:6-10.
110. **Dobrindt, U., G. Blum-Oehler, G. Nagy, G. Schneider, A. Johann, G. Gottschalk, and J. Hacker.** 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **70**:6365-72.
111. **Doit, C., P. Mariani-Kurkdjian, and E. Bingen.** 2010. [Extended-spectrum beta-lactamase producing-enterobacteriaceae]. *Arch Pediatr* **17 Suppl 4**:S140-4.
112. **Dontorou, C., C. Papadopoulou, G. Filioussis, V. Economou, I. Apostolou, G. Zakkas, A. Salamoura, A. Kansouzidou, and S. Levidiotou.** 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Int J Food Microbiol* **82**:273-9.
113. **Doyle, M. P., and J. L. Schoeni.** 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* **53**:2394-6.
114. **Dozois, C. M., S. Clement, C. Desautels, E. Oswald, and J. M. Fairbrother.** 1997. Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. *FEMS Microbiol Lett* **152**:307-12.
115. **Dubois, D., J. Delmas, A. Cady, F. Robin, A. Sivignon, E. Oswald, and R. Bonnet.** 2010. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **48**:2122-9.
116. **Ducluzeau, R.** 1983. Contribution à l'étude de la pollution des eaux par les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie. . Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de Nantes, Nantes.
117. **Duriez, P., O Clermont, S Bonacorsi, E Bingen, A Chaventré, J Elion, B Picard, et E Denamur.** 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology (Reading, England)* **147**, no. Pt 6 (Jun).1671-1676.
118. **Dziva, F., and M. P. Stevens.** 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol* **37**:355-66.
119. **EARSS.** 2008. European Antimicrobial Resistance Surveillance System; Annual Report. <http://www.rivm.nl/earss>.
120. **Eden, C. S., and H. A. Hansson.** 1978. *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. *Infect Immun* **21**:229-37.
121. **Effler, E., M. Isaacson, L. Arntzen, R. Heenan, P. Canter, T. Barrett, L. Lee, C. Mambo, W. Levine, A. Zaidi, and P. M. Griffin.** 2001. Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. *Emerg Infect Dis* **7**:812-9.
122. **Eisner, A., E. J. Fagan, G. Feierl, H. H. Kessler, E. Marth, D. M. Livermore, and N. Woodford.** 2006. Emergence of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:785-7.

123. **Erdem, A. L., F. Avelino, J. Xicohtencatl-Cortes, and J. A. Giron.** 2007. Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**:7426-35.
124. **Eriksson, E., E. Nerbrink, E. Borch, A. Aspan, and A. Gunnarsson.** 2003. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the Swedish pig population. *Vet Rec* **152**:712-7.
125. **Erwert, R. D., K. T. Eiting, J. C. Tupper, R. K. Winn, J. M. Harlan, and D. D. Bannerman.** 2003. Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis. *Microb Pathog* **35**:87-93.
126. **Escobar-Paramo, P., K. Grenet, A. Le Menac'h, L. Rode, E. Salgado, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, M. C. Rahimy, A. Andremont, E. Denamur, and R. Ruimy.** 2004. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**:5698-700.
127. **Escobar-Paramo, P., A. Le Menac'h, T. Le Gall, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, D. Skurnik, and E. Denamur.** 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* **8**:1975-84.
128. **Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol* **75**:184-92.
129. **Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laternus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* **297**:163-76.
130. **Ewers, C., Traute Janssen, et Lothar H Wieler.** . 2003. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 116, no. 9-10 (Octobre):: 381-395.
131. **Fabbri, A., M. Gauthier, and P. Boquet.** 1999. The 5' region of *cnf1* harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin. *Mol Microbiol* **33**:108-18.
132. **Farfan, M. J., K. G. Inman, and J. P. Nataro.** 2008. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **76**:4378-84.
133. **Feder, I., J. T. Gray, R. A. Pearce, P. M. Fratamico, E. Bush, A. Porto-Fett, F. M. Wallace, P. J. Fedorka-Cray, and J. B. Luchansky.** 2007. Testing of swine feces obtained through the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* **70**:1489-92.
134. **Fernandez, D., E. M. Rodriguez, G. H. Arroyo, N. L. Padola, and A. E. Parma.** 2009. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J Appl Microbiol* **106**:1260-7.
135. **Fischbach, M. A., H. Lin, D. R. Liu, and C. T. Walsh.** 2006. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol* **2**:132-8.
136. **Flatau, G., E. Lemichez, M. Gauthier, P. Chardin, S. Paris, C. Fiorentini, and P. Boquet.** 1997. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**:729-33.
137. **Foster, G. H., C. S. Armstrong, R. Sakiri, and V. L. Tesh.** 2000. Shiga toxin-induced tumor necrosis factor alpha expression: requirement for toxin enzymatic activity and monocyte protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Infect Immun* **68**:5183-9.
138. **Frank, C., D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M. J. Kemper, P. Follin, L. Muller, L. A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, and G. Krause.** 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* **365**:1771-80.

139. **Franke, J., S. Franke, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, L. H. Wieler, G. Baljer, L. Beutin, and H. Karch.** 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol* **32**:2460-3.
140. **Frankel, G., and A. D. Phillips.** 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol* **10**:549-56.
141. **Fraser, M. E., M. Fujinaga, M. M. Cherney, A. R. Melton-Celsa, E. M. Twiddy, A. D. O'Brien, and M. N. James.** 2004. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **279**:27511-7.
142. **Freter, R., H. Brickner, J. Fekete, M. M. Vickerman, and K. E. Carey.** 1983. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun* **39**:686-703.
143. **Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch.** 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**:74-84.
144. **Friesema, I. H., V. D. K. J., D. E. J. CM, A. E. Heuvelink, and V. A. N. P. W.** 2010. Geographical association between livestock density and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. *Epidemiol Infect*:1-7.
145. **Fukushima, H., K. Hoshina, and M. Gomyoda.** 1999. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **65**:5177-81.
146. **Fuller, C. A., C. A. Pellino, M. J. Flagler, J. E. Strasser, and A. A. Weiss.** 2011. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun* **79**:1329-37.
147. **G. Arlet, R.** 2006. Les nouvelles BLSE Conférence Hôpital Tenon. Université Pierre et Marie Curie. Disponible: <http://www.microbe-edu.org/mecanisme/conference/garicai.pdf>.
148. **Gannon, V. P., C. Teerling, S. A. Masri, and C. L. Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol* **136**:1125-35.
149. **Gansmandel, T.** 2011. Etude épidémiologique des résistances d'*Escherichia coli* BLSE au centre hospitalier de Valenciennes en 2006. Université du droit et de la santé (Lille). thèse. *pharma*. **145**:N°: 2011LIL2E008
150. **Garcia-Sanchez, A., S. Sanchez, R. Rubio, G. Pereira, J. M. Alonso, J. Hermoso de Mendoza, and J. Rey.** 2007. Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Vet Microbiol* **121**:373-7.
151. **Garmendia, J., A. D. Phillips, M. F. Carlier, Y. Chong, S. Schuller, O. Marches, S. Dahan, E. Oswald, R. K. Shaw, S. Knutton, and G. Frankel.** 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**:1167-83.
152. **Garrido, P., M. Blanco, M. Moreno-Paz, C. Briones, G. Dahbi, J. Blanco, and V. Parro.** 2006. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem* **52**:192-201.
153. **Gault G, W. F., Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-da Silva N, King L, Aldabe B, et al. .** 2011. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, South-West France, June 2011. pii=19905. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19905>. *Euro Surveill*. **16(26)**::Disponible à : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19905>.
154. **Geser, N., R. Stephan, and H. Hachler.** 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* **8**:21.

155. **Ghanbarpour, R., and E. Oswald.** 2010. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Res Vet Sci* **88**:6-10.
156. **Gibreel, T. M., A. R. Dodgson, J. Cheesbrough, A. J. Fox, F. J. Bolton, and M. Upton.** 2012. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *J Antimicrob Chemother* **67**:346-56.
157. **Girardeau, J. P., M. Der Vartanian, J. L. Ollier, and M. Contrepois.** 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **56**:2180-8.
158. **Girardeau, J. P., L. Lalioui, A. M. Said, C. De Champs, and C. Le Bouguenec.** 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**:218-26.
159. **Girlich, D., L. Poirel, A. Carattoli, I. Kempf, M. F. Lartigue, A. Bertini, and P. Nordmann.** 2007. Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* **73**:4681-5.
160. **Gniadkowski, M.** 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* **7**:597-608.
161. **Gobert, A. P., M. Vareille, A. L. Glasser, T. Hindre, T. de Sablet, and C. Martin.** 2007. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-kappaB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J Immunol* **178**:8168-74.
162. **Gossert, A. D., P. Bettendorff, C. Puorger, M. Vetsch, T. Herrmann, R. Glockshuber, and K. Wuthrich.** 2008. NMR structure of the *Escherichia coli* type 1 pilus subunit FimF and its interactions with other pilus subunits. *J Mol Biol* **375**:752-63.
163. **Grant, J., A. M. Wendelboe, A. Wendel, B. Jepson, P. Torres, C. Smelser, and R. T. Rolfs.** 2008. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis* **14**:1633-6.
164. **Grape, M., A. Farra, G. Kronvall, and L. Sundström.** 2005. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:185-92.
165. **Guardabassi, L., L. Dijkshoorn, J. M. Collard, J. E. Olsen, and A. Dalsgaard.** 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J. Med. Microbiol.* **49**:929-36.
166. **Guh, A., Q. Phan, R. Nelson, K. Purviance, E. Milardo, S. Kinney, P. Mshar, W. Kasacek, and M. Cartter.** 2010. Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with raw milk, Connecticut, 2008. *Clin Infect Dis* **51**:1411-7.
167. **Gunzburg, S. T., N. G. Tornieporth, and L. W. Riley.** 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* **33**:1375-7.
168. **Gupta, V.** 2007. An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res* **126**:417-27.
169. **Guttman, J. A., Y. Li, M. E. Wickham, W. Deng, A. W. Vogl, and B. B. Finlay.** 2006. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption in vivo. *Cell Microbiol* **8**:634-45.
170. **Guyer, D. M., I. R. Henderson, J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2000. Identification of *sat*, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **38**:53-66.
171. **Guyer, D. M., S. Radulovic, F. E. Jones, and H. L. Mobley.** 2002. *Sat*, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun* **70**:4539-46.
172. **Gyles, C. L.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* **85**:E45-62.
173. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**:641-79.

174. **Hacker, J., H. Kestler, H. Hoschutzky, K. Jann, F. Lottspeich, and T. K. Korhonen.** 1993. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an Escherichia coli O18:K1 meningitis isolate. *Infect Immun* **61**:544-50.
175. **Hall, A.** 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**:509-14.
176. **Hall, R. M., C. M. Collis, M. J. Kim, S. R. Partridge, G. D. Recchia, and H. W. Stokes.** 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci* **870**:68-80.
177. **Hamelin, K., G. Bruant, A. El-Shaarawi, S. Hill, T. a. Edge, S. Bekal, J. M. Fairbrother, J. Harel, C. Maynard, L. Masson, and R. Brousseau.** 2006. A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in Escherichia coli isolates from Great Lakes recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:4200-6.
178. **Hamelin, K., G. Bruant, A. El-Shaarawi, S. Hill, T. a. Edge, J. Fairbrother, J. Harel, C. Maynard, L. Masson, and R. Brousseau.** 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in Escherichia coli isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:477-84.
179. **Hamon, M. A., E. Batsche, B. Regnault, T. N. Tham, S. Seveau, C. Muchardt, and P. Cossart.** 2007. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:13467-72.
180. **Hancock, D., T. Besser, J. Lejeune, M. Davis, and D. Rice.** 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* **66**:71-8.
181. **Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, E. D. Ebel, D. E. Herriott, and L. V. Carpenter.** 1998. Multiple sources of Escherichia coli O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* **35**:11-9.
182. **Hancock, R. E.** 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol* **5**:37-42.
183. **Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier, and P. H. Roy.** 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* **184**:1712-21.
184. **Harrington, S. M., E. G. Dudley, and J. P. Nataro.** 2006. Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection. *FEMS Microbiol Lett* **254**:12-8.
185. **Hasman, H., D. Mevius, K. Veldman, I. Olesen, and F. M. Aarestrup.** 2005. beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant Salmonella from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* **56**:115-21.
186. **Hawkey, P. M., and A. M. Jones.** 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* **64 Suppl 1**:i3-10.
187. **Hedican, E. B., C. Medus, J. M. Besser, B. A. Juni, B. Koziol, C. Taylor, and K. E. Smith.** 2009. Characteristics of O157 versus non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli infections in Minnesota, 2000-2006. *Clin Infect Dis* **49**:358-64.
188. **Herau, V.** 2003. Risque sanitaire microbiologique lié aux effluents d'abattoirs: comparaison d'une synthèse bibliographique avec une étude de terrain. . Thèse. Med. Vet., Toulouse. N°32.
189. **Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye, and T. S. Whittam.** 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of Escherichia coli. *J Bacteriol* **172**:6175-81.
190. **Heuvelink, A. E., J. T. Zwartkruis-Nahuis, F. L. van den Biggelaar, W. J. van Leeuwen, and E. de Boer.** 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol* **52**:67-75.
191. **Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S. M. Faruque, R. Woodgate, and M. K. Waldor.** 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in vibrio cholerae O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2991-3000.
192. **Holler, C., S. Koschinsky, and D. Witthuhn.** 1999. Isolation of enterohaemorrhagic Escherichia coli from municipal sewage. *Lancet* **353**:2039.

193. **Hull, R. A., R. E. Gill, P. Hsu, B. H. Minshew, and S. Falkow.** 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect Immun* **33**:933-8.
194. **Hussein, H. S.** 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* **85**:E63-72.
195. **Hussein, H. S., and L. M. Bollinger.** 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot* **68**:2224-41.
196. **Hyland, R. M., J. Sun, T. P. Griener, G. L. Mulvey, J. S. Klassen, M. S. Donnenberg, and G. D. Armstrong.** 2008. The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetylglucosamine-specific lectin. *Cell Microbiol* **10**:177-87.
197. **Iizumi, Y., H. Sagara, Y. Kabe, M. Azuma, K. Kume, M. Ogawa, T. Nagai, P. G. Gillespie, C. Sasakawa, and H. Handa.** 2007. The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe* **2**:383-92.
198. **Imamovic, L., J. Jofre, H. Schmidt, R. Serra-Moreno, and M. Muniesa.** 2009. Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* **75**:1764-8.
199. **Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc, and P. M. Sherman.** 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**:3316-26.
200. **Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda, and M. Nishibuchi.** 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog* **8**:47-60.
201. **Jakobsen, L., P. Garneau, G. Bruant, J. Harel, S. S. Olsen, L. J. Porsbo, A. M. Hammerum, and N. Frimodt-Møller.** 2011. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:1121-9.
202. **Jakobsen, L., A. M. Hammerum, and N. Frimodt-Møller.** 2010. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. *Appl Environ Microbiol* **76**:8281-4.
203. **Jakobsen, L., D. Sandvang, L. H. Hansen, L. Bagger-Skjøt, H. Westh, C. Jørgensen, D. S. Hansen, B. M. Pedersen, D. L. Monnet, N. Frimodt-Møller, S. J. Sørensen, and A. M. Hammerum.** 2008. Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. *Environment international* **34**:108-15.
204. **Jakobsen, L., D. J. Spangholm, K. Pedersen, L. B. Jensen, H. D. Emborg, Y. Agero, F. M. Aarestrup, A. M. Hammerum, and N. Frimodt-Møller.** 2010. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int J Food Microbiol* **142**:264-72.
205. **Jauréguy, F.** 2009. Déterminants cliniques et bactériens au cours des infections extra-intestinales dues à *Escherichia coli*. *Med Sci (Paris)* **25**.
206. **Jaureguy, F., L. Landraud, V. Passet, L. Diancourt, E. Frapy, G. Guigon, E. Carbonnelle, O. Lortholary, O. Clermont, E. Denamur, B. Picard, X. Nassif, and S. Brisse.** 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**:560.
207. **Jeong, Y., S., Je Chul Lee, Hee Young Kang, Hak Sun Yu, Eun Young Lee, Chul Hee Choi, Seong Ho Tae, Yoo Chul Lee, Dong Taek Cho, Sung Yong Seol.** 2003. Epidemiology of Nalidixic Acid Resistance and TEM-1- and TEM-52-Mediated Ampicillin Resistance of *Shigella sonnei* Isolates Obtained in Korea between 1980 and 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3719-3723.

208. **Jiang, X., J. Morgan, and M. P. Doyle.** 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol* **68**:2605-9.
209. **Johnson, J. R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**:80-128.
210. **Johnson, J. R., P. Delavari, T. T. O'Bryan, K. E. Smith, and S. Tatini.** 2005a. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999-2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* **2**:38-49.
211. **Johnson, J. R., P. Delavari, A. L. Stell, T. S. Whittam, U. Carlino, and T. A. Russo.** 2001. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *J Infect Dis* **183**:154-9.
212. **Johnson, J. R., B. Johnston, M. a. Kuskowski, J.-P. Nougayrede, and E. Oswald.** 2008. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3906-11.
213. **Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, K. Owens, C. Clabots, and R. S. Singer.** 2009. Virulence genotypes and phylogenetic background of fluoroquinolone-resistant and susceptible *Escherichia coli* urine isolates from dogs with urinary tract infection. *Vet Microbiol* **136**:108-14.
214. **Johnson, J. R., M. E. Menard, T. L. Lauderdale, C. Kosmidis, D. Gordon, P. Collignon, J. N. Maslow, A. T. Andrasevic, and M. A. Kuskowski.** 2011. Global distribution and epidemiologic associations of *Escherichia coli* clonal group A, 1998-2007. *Emerg Infect Dis* **17**:2001-9.
215. **Johnson, J. R., A. C. Murray, A. Gajewski, M. Sullivan, P. Snippes, M. A. Kuskowski, and K. E. Smith.** 2003a. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2161-2168.
216. **Johnson, J. R., A. C. Murray, M. A. Kuskowski, S. Schubert, M. F. Prere, B. Picard, R. Colodner, and R. Raz.** 2005b. Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerg Infect Dis* **11**:141-5.
217. **Johnson, J. R., E. Oswald, T. T. O'Bryan, M. A. Kuskowski, and L. Spanjaard.** 2002. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* **185**:774-84.
218. **Johnson, J. R., K. Owens, A. Gajewski, and C. Clabots.** 2008. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *J Infect Dis* **197**:218-24.
219. **Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2005c. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**:383-404.
220. **Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2002. Uropathogenic *Escherichia coli* as Agents of Diverse Non-Urinary Tract Extraintestinal Infections. *J. Infect. Dis.* **186**:859-864.
221. **Johnson, J. R., T. A. Russo, F. Scheutz, J. J. Brown, L. Zhang, K. Palin, C. Rode, C. Bloch, C. F. Marrs, and B. Foxman.** 1997. Discovery of disseminated J96-like strains of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing genes for both PapG(J96) (class I) and PrsG(J96) (class III) Gal(alpha1-4)Gal-binding adhesins. *J Infect Dis* **175**:983-8.
222. **Johnson, J. R., and a. L. Stell.** 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* **181**:261-72.
223. **Johnson, T. J., C. DebRoy, S. Belton, M. L. Williams, M. Lawrence, L. K. Nolan, and J. L. Thorsness.** 2010. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **144**:100-9.
224. **Johnson, W. M., H. Lior, and G. S. Bezanson.** 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* **1**:76.

225. **Kadhun, H. J., D. Finlay, M. T. Rowe, I. G. Wilson, and H. J. Ball.** 2008. Occurrence and characteristics of cytotoxic necrotizing factors, cytolethal distending toxins and other virulence factors in *Escherichia coli* from human blood and faecal samples. *Epidemiol Infect* **136**:752-60.
226. **Kalman, D., O. D. Weiner, D. L. Goosney, J. W. Sedat, B. B. Finlay, A. Abo, and J. M. Bishop.** 1999. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol* **1**:389-91.
227. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.
228. **Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior.** 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **151**:775-82.
229. **Kauffmann, F.** 1947. The serology of the coli group. *J Immunol* **57**:71-100.
230. **Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-20.
231. **Khan, N. A., Y. Wang, K. J. Kim, J. W. Chung, C. A. Wass, and K. S. Kim.** 2002. Cytotoxic necrotizing factor-1 contributes to *Escherichia coli* K1 invasion of the central nervous system. *J Biol Chem* **277**:15607-12.
232. **Kim, J., A. Thanabalasuriar, T. Chaworth-Musters, J. C. Fromme, E. A. Frey, P. I. Lario, P. Metalnikov, K. Rizg, N. A. Thomas, S. F. Lee, E. L. Hartland, P. R. Hardwidge, T. Pawson, N. C. Strynadka, B. B. Finlay, R. Schekman, and S. Gruenheid.** 2007. The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. *Cell Host Microbe* **2**:160-71.
233. **Kim, K. J., S. J. Elliott, F. Di Cello, M. F. Stins, and K. S. Kim.** 2003. The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **5**:245-52.
234. **Kiratisin, P., A. Apisarnthanarak, C. Laesripa, and P. Saifon.** 2008. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2818-24.
235. **Kirchner, M., H. Wearing, K. L. Hopkins, and C. Teale.** 2011. Characterization of plasmids encoding cefotaximases group 1 enzymes in *Escherichia coli* recovered from cattle in England and Wales. *Microb Drug Resist* **17**:463-70.
236. **Kist, M. L., I. E. Salit, and T. Hofmann.** 1990. Purification and characterization of the Dr hemagglutinins expressed by two uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **58**:695-702.
237. **Klemm, P., G. Christiansen, B. Kreft, R. Marre, and H. Bergmans.** 1994. Reciprocal exchange of minor components of type 1 and F1C fimbriae results in hybrid organelles with changed receptor specificities. *J Bacteriol* **176**:2227-34.
238. **Klemm, P., I. Orskov, and F. Orskov.** 1982. F7 and type 1-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections: protein chemical and immunological aspects. *Infect Immun* **36**:462-8.
239. **Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and S. Mitsuhashi.** 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**:315-7.
240. **Kojima, A., Y. Ishii, K. Ishihara, H. Esaki, T. Asai, C. Oda, Y. Tamura, T. Takahashi, and K. Yamaguchi.** 2005. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3533-7.

241. **Korhonen, T. K., V. Vaisanen, H. Saxen, H. Hultberg, and S. B. Svenson.** 1982. P-antigen-recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **37**:286-91.
242. **Korhonen, T. K., M. V. Valtonen, J. Parkkinen, V. Vaisanen-Rhen, J. Finne, F. Orskov, I. Orskov, S. B. Svenson, and P. H. Makela.** 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **48**:486-91.
243. **Kostakioti, M., and C. Stathopoulos.** 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **72**:5548-54.
244. **Kovacs, M. J., J. Roddy, S. Gregoire, W. Cameron, L. Eidus, and J. Drouin.** 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* **88**:177-9.
245. **Krause, G., S. Zimmermann, and L. Beutin.** 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet Microbiol* **106**:87-95.
246. **Krogfelt, K. A., H. Bergmans, and P. Klemm.** 1990. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* **58**:1995-8.
247. **Kudva, I. T., K. Blanch, and C. J. Hovde.** 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* **64**:3166-74.
248. **Kuehn, M. J., J. Heuser, S. Normark, and S. J. Hultgren.** 1992. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* **356**:252-5.
249. **Kurmanova, A., A. Llorente, A. Polesskaya, O. Garred, S. Olsnes, J. Kozlov, and K. Sandvig.** 2007. Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **357**:144-9.
250. **La Ragione, R. M., A. Best, M. J. Woodward, and A. D. Wales.** 2009. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiol Rev* **33**:394-410.
251. **La Ragione, R. M., W. A. Cooley, and M. J. Woodward.** 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol* **49**:327-38.
252. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**:27-35.
253. **Labigne-Roussel, A., M. A. Schmidt, W. Walz, and S. Falkow.** 1985. Genetic organization of the afimbrial adhesin operon and nucleotide sequence from a uropathogenic *Escherichia coli* gene encoding an afimbrial adhesin. *J Bacteriol* **162**:1285-92.
254. **Labigne-Roussel, A. F., D. Lark, G. Schoolnik, and S. Falkow.** 1984. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **46**:251-9.
255. **Lambert, P. A.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:1471-85.
256. **Landraud, L., M. Gauthier, T. Fosse, and P. Boquet.** 2000. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol* **30**:213-6.
257. **Lane, M. C., V. Lockett, G. Monterosso, D. Lamphier, J. Weinert, J. R. Hebel, D. E. Johnson, and H. L. Mobley.** 2005. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun* **73**:7644-56.
258. **Lane, M. C., and H. L. Mobley.** 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* **72**:19-25.
259. **Langermann, S., S. Palaszynski, M. Barnhart, G. Auguste, J. S. Pinkner, J. Burlein, P. Barren, S. Koenig, S. Leath, C. H. Jones, and S. J. Hultgren.** 1997. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* **276**:607-11.

260. **Le Bouguenec, C., M. Archambaud, and A. Labigne.** 1992. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**:1189-93.
261. **Le Bouguenec, C., L. Lalioui, L. du Merle, M. Jouve, P. Courcoux, S. Bouzari, R. Selvarangan, B. J. Nowicki, Y. Germani, A. Andremont, P. Gounon, and M. I. Garcia.** 2001. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J Clin Microbiol* **39**:1738-45.
262. **Le Gall, T., O. Clermont, S. Gouriou, B. Picard, X. Nassif, E. Denamur, and O. Tenaillon.** 2007. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol* **24**:2373-84.
263. **Leclerc, H., and C. Oger.** 1975. [Slaughterhouse waste waters and their influence on epidemiology (author's transl)]. *Rev Epidemiol Med Soc Sante Publique* **23**:429-44.
264. **Lemichez, E., G. Flatau, M. Bruzzone, P. Boquet, and M. Gauthier.** 1997. Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains. *Mol Microbiol* **24**:1061-70.
265. **Lemonnier, M., L. Landraud, and E. Lemichez.** 2007. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev* **31**:515-34.
266. **Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, and W. C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**:7549-53.
267. **Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-89.
268. **Levine, M. M., and R. Edelman.** 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* **6**:31-51.
269. **Li, X. Z., D. Ma, D. M. Livermore, and H. Nikaido.** 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1742-52.
270. **Licence, K., K. R. Oates, B. A. Syngé, and T. M. Reid.** 2001. An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol Infect* **126**:135-8.
271. **Liebana, E., M. Batchelor, K. L. Hopkins, F. A. Clifton-Hadley, C. J. Teale, A. Foster, L. Barker, E. J. Threlfall, and R. H. Davies.** 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* **44**:1630-4.
272. **Lindberg, F., B. Lund, L. Johansson, and S. Normark.** 1987. Localization of the receptor-binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus. *Nature* **328**:84-7.
273. **Lisle, J. T., S. C. Broadaway, A. M. Prescott, B. H. Pyle, C. Fricker, and G. A. McFeters.** 1998. Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **64**:4658-62.
274. **Livermore, D. M.** 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**:557-84.
275. **Livermore, D. M., R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel, and N. Woodford.** 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* **59**:165-74.
276. **Lockman, H. A., R. A. Gillespie, B. D. Baker, and E. Shakhnovich.** 2002. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect Immun* **70**:2708-14.
277. **Loirat, C., Baudouin, V., Sonsino, E., Mariani-Kurkdjian, P. and Elion, J.** 1992. Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant : aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques. In *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker*. Flammarion-Médecine-Sciences (ed.) Paris,:133-158.

278. **Louise, C. B., and T. G. Obrig.** 1995. Specific interaction of Escherichia coli O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* **172**:1397-401.
279. **Loukiadis, E., M. Kerouredan, L. Beutin, E. Oswald, and H. Brugere.** 2006. Characterization of Shiga toxin gene (stx)-positive and intimin gene (eae)-positive Escherichia coli isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Appl Environ Microbiol* **72**:3245-51.
280. **Loukiadis, E., R. Nobe, S. Herold, C. Tramuta, Y. Ogura, T. Ooka, S. Morabito, M. Kerouredan, H. Brugere, H. Schmidt, T. Hayashi, and E. Oswald.** 2008. Distribution, functional expression, and genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. *J Bacteriol* **190**:275-85.
281. **Low, A. S., N. Holden, T. Rosser, A. J. Roe, C. Constantinidou, J. L. Hobman, D. G. Smith, J. C. Low, and D. L. Gally.** 2006. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Environ Microbiol* **8**:1033-47.
282. **Luce Landraud, A. D., Caroline Buisson-Touati, Patrice Boquet et Emmanuel Lemichez.** 2003. L'activation/dégradation protéasomique des GTPases Rho par CNF1 confère des capacités invasives aux E. coli uropathogènes / Action of cytotoxic necrotizing factor from E. coli. *Med Sci (Paris)* **19**:403-405.
283. **Lung, A. J., C. M. Lin, J. M. Kim, M. R. Marshall, R. Nordstedt, N. P. Thompson, and C. I. Wei.** 2001. Destruction of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enteritidis in cow manure composting. *J Food Prot* **64**:1309-14.
284. **Mabilat, C., and S. Goussard.** 1995. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases,. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. . American Society for Microbiology, Washington, D.C.:553–557.
285. **Machado, J., F. Grimont, and P. A. Grimont.** 1998. Computer identification of Escherichia coli rRNA gene restriction patterns. *Res Microbiol* **149**:119-35.
286. **Madec, J. Y., L. Poirel, E. Saras, A. Gourguechon, D. Girlich, P. Nordmann, and M. Haenni.** 2011. Non-ST131 Escherichia coli from cattle harbouring human-like bla(CTX-M-15)-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* **67**:578-81.
287. **Madic, J., N. Vingadassalon, C. P. de Garam, M. Marault, F. Scheutz, H. Brugere, E. Jamet, and F. Auvray.** 2011. Detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:2035-41.
288. **MAINIL, J.** 2003. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'Escherichia coli : Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Méd. Vét.* **94**:159-165.
289. **Mainil, J.** 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic Escherichia coli in animals. *Vet Res* **30**:235-57.
290. **Mainil, J. G.** 2000. Le point des connaissances sur les entérites à Escherichia coli chez le veau. *Ann. Méd. Vét* **144**:121-136.
291. **Mainil, J. G., and G. Daube.** 2005. Verotoxigenic Escherichia coli from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* **98**:1332-44.
292. **Malyukova, I., K. F. Murray, C. Zhu, E. Boedeker, A. Kane, K. Patterson, J. R. Peterson, M. Donowitz, and O. Kovbasnjuk.** 2009. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G78-92.
293. **Manges, A. R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton, and L. W. Riley.** 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant Escherichia coli clonal group. *N Engl J Med* **345**:1007-13.

294. **Manges, A. R., S. P. Smith, B. J. Lau, C. J. Nuval, J. N. Eisenberg, P. S. Dietrich, and L. W. Riley.** 2007. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. *Foodborne Pathog Dis* **4**:419-31.
295. **Marches, O., V. Covarelli, S. Dahan, C. Cougoule, P. Bhatta, G. Frankel, and E. Caron.** 2008. EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsonophagocytosis. *Cell Microbiol* **10**:1104-15.
296. **Martel, J. L., F. Tardy, P. Sanders, and J. Boisseau.** 2001. New trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Vet Res* **32**:381-92.
297. **Martinez-Medina, M., A. Mora, M. Blanco, C. Lopez, M. P. Alonso, S. Bonacorsi, M. H. Nicolas-Chanoine, A. Darfeuille-Michaud, J. Garcia-Gil, and J. Blanco.** 2009. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* **47**:3968-79.
298. **Martinez, J. L.** 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* **276**:2521-30.
299. **Martinez, J. L., and F. Baquero.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1771-7.
300. **Massova, I., and S. Mobashery.** 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1-17.
301. **Masters, N., Wiegand, A., Ahmed, W., Katouli, M.,.** 2011. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface waters as an indicator of water quality. *Water Research* **45**:6321-6333.
302. **Matsumoto, Y., F. Ikeda, T. Kamimura, Y. Yokota, and Y. Mine.** 1988. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:1243-6.
303. **Maynard, C., S. Bekal, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, and S. Larivie.** 2004. Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5444-5452.
304. **Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere, and J. Harel.** 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3214-21.
305. **Mazel, D., B. Dychinco, and V. A. Webb.** 2000. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection : Integrons and Identification of a Novel aad Gene Antibiotic Resistance in the ECOR Collection : Integrons and Identification of a Novel aad Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1568-1574.
306. **Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies.** 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* **280**:605-8.
307. **McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1664-8.
308. **MEDAD.** 2004. Arrêté du 30 Avril 2004 relatif aux prescriptions applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation sous la rubrique n° 2210 "abattage d'animaux". NOR: DEVP0430124A. *Journal officiel de la république française* **141**:11034.
309. **Mellata, M., J. W. Touchman, and R. Curtiss.** 2009. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* chi7122 (O78:K80:H9). *PLoS One* **4**:e4232.
310. **Mellmann, A., D. Harmsen, C. A. Cummings, E. B. Zentz, S. R. Leopold, A. Rico, K. Prior, R. Szczepanowski, Y. Ji, W. Zhang, S. F. McLaughlin, J. K. Henkhaus, B. Leopold, M. Bielaszewska, R. Prager, P. M. Brzoska, R. L. Moore, S. Guenther, J. M. Rothberg, and H. Karch.** 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic

- Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* **6**:e22751.
311. **Mesa, R. J., V. Blanc, A. R. Blanch, P. Cortes, J. J. Gonzalez, S. Lavilla, E. Miro, M. Muniesa, M. Saco, M. T. Tortola, B. Mirelis, P. Coll, M. Llagostera, G. Prats, and F. Navarro.** 2006. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* **58**:211-5.
312. **Milnes, A. S., A. R. Sayers, I. Stewart, F. A. Clifton-Hadley, R. H. Davies, D. G. Newell, A. J. Cook, S. J. Evans, R. P. Smith, and G. A. Paiba.** 2009. Factors related to the carriage of Verocytotoxigenic *E. coli*, Salmonella, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in cattle, sheep and pigs at slaughter. *Epidemiol Infect* **137**:1135-48.
313. **Miriagou, V., P. T. Tassios, N. J. Legakis, and L. S. Tzouveleakis.** 2004. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid Salmonella. *Int J Antimicrob Agents* **23**:547-55.
314. **Mokady, D., U. Gophna, and E. Z. Ron.** 2005. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **43**:66-73.
315. **Mora, A., M. Blanco, D. Yamamoto, G. Dahbi, J. E. Blanco, C. Lopez, M. P. Alonso, M. A. Vieira, R. T. Hernandez, C. M. Abe, R. M. Piazza, D. W. Lacher, W. P. Elias, T. A. Gomes, and J. Blanco.** 2009. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. *Int Microbiol* **12**:243-51.
316. **Mora, A., A. Herrera, R. Mamani, C. Lopez, M. P. Alonso, J. E. Blanco, M. Blanco, G. Dahbi, F. Garcia-Garrote, J. M. Pita, A. Coira, M. I. Bernardez, and J. Blanco.** 2010. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol* **76**:6991-7.
317. **Mora, A., A. Herrera, C. Lopez, G. Dahbi, R. Mamani, J. M. Pita, M. P. Alonso, J. Llovo, M. I. Bernardez, J. E. Blanco, M. Blanco, and J. Blanco.** 2011a. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol* **14**:121-41.
318. **Mora, A., S. L. Leon, M. Blanco, J. E. Blanco, C. Lopez, G. Dahbi, A. Echeita, E. A. Gonzalez, and J. Blanco.** 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol* **114**:204-10.
319. **Mora, A., C. Lopez, A. Herrera, S. Viso, R. Mamani, G. Dhabbi, M. P. Alonso, M. Blanco, J. E. Blanco, and J. Blanco.** 2011b. Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111:H4-D-ST2085 and O111:H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. *Vet Microbiol* **156**:347-52.
320. **Morabito, S., G. Dell'Omo, U. Agrimi, H. Schmidt, H. Karch, T. Cheasty, and A. Caprioli.** 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol* **82**:275-83.
321. **Moulin-Schouleur, M., M. Répérant, S. Laurent, A. Brée, S. Mignon-Grasteau, P. Germon, D. Rasschaert, and C. Schouler.** 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3366-76.
322. **Moulin, G., P. Cavalie, I. Pellanne, A. Chevance, A. Laval, Y. Millemann, P. Colin, and C. Chauvin.** 2008. A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *J Antimicrob Chemother* **62**:617-25.
323. **Naas, T., Y. Mikami, T. Imai, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol* **183**:235-49.

324. **Naas, T., C. Oxacelay, and P. Nordmann.** 2007. Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:223-30.
325. **Naseer, U., and A. Sundsfjord.** 2011. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist* **17**:83-97.
326. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
327. **Natvig, E. E., S. C. Ingham, B. H. Ingham, L. R. Cooperband, and T. R. Roper.** 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl Environ Microbiol* **68**:2737-44.
328. **Nikaido, H.** 1996. Outer membrane. In: Neidhardt FC, ed. *Escherichia coli and Salmonella. . Cellular and molecular biology* Washington DC: ASM Press.:29-47.
329. **Nougayrede, J. P., and M. S. Donnenberg.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* **6**:1097-111.
330. **Nougayrede, J. P., S. Homburg, F. Taieb, M. Boury, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, C. Buchrieser, J. Hacker, U. Dobrindt, and E. Oswald.** 2006. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**:848-51.
331. **Nowicki, B., J. P. Barrish, T. Korhonen, R. A. Hull, and S. I. Hull.** 1987. Molecular cloning of the *Escherichia coli* O75X adhesin. *Infect Immun* **55**:3168-73.
332. **Nowicki, B., R. Selvarangan, and S. Nowicki.** 2001. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**:S24-7.
333. **O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **180**:65-94.
334. **O'Brien, A. O., T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman, and S. B. Formal.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* **1**:702.
335. **O'Brien, S. J., G. K. Adak, and C. Gilham.** 2001. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg Infect Dis* **7**:1049-51.
336. **Ochman, H., and R. K. Selander.** 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**:690-3.
337. **Ochoa, T. J., and T. G. Cleary.** 2003. Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr Opin Infect Dis* **16**:259-63.
338. **Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt, and J. Hacker.** 2002. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents* **19**:517-21.
339. **Ogura, Y., T. Ooka, A. Iguchi, H. Toh, M. Asadulghani, K. Oshima, T. Kodama, H. Abe, K. Nakayama, K. Kurokawa, T. Tobe, M. Hattori, and T. Hayashi.** 2009. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:17939-44.
340. **Okuda, T., N. Tokuda, S. Numata, M. Ito, M. Ohta, K. Kawamura, J. Wiels, T. Urano, O. Tajima, and K. Furukawa.** 2006. Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem* **281**:10230-5.
341. **Olsen, A., M. J. Wick, M. Morgelin, and L. Bjorck.** 1998. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun* **66**:944-9.

342. **Orden, J. A., G. Dominguez-Bernal, S. Martinez-Pulgarin, M. Blanco, J. E. Blanco, A. Mora, J. Blanco, and R. de la Fuente.** 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* **10**:47-55.
343. **ORSKOV F., O. I.** 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.* **14**:43-112.
344. **Oswald, E., M. Tabouret, R. Boivin, and J. De Rycke.** 1994. Detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type two (CNF2) by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* **40**:209-18.
345. **Overvest, I., I. Willemsen, M. Rijnsburger, A. Eustace, L. Xu, P. Hawkey, M. Heck, P. Savelkoul, C. Vandenbroucke-Grauls, K. van der Zwaluw, X. Huijsdens, and J. Kluytmans.** 2011. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* **17**:1216-22.
346. **Pages, J. M.** 2004. [Bacterial porin and antibiotic susceptibility]. *Med Sci (Paris)* **20**:346-51.
347. **Parkkinen, J., J. Finne, M. Achtman, V. Vaisanen, and T. K. Korhonen.** 1983. *Escherichia coli* strains binding neuraminyl alpha 2-3 galactosides. *Biochem Biophys Res Commun* **111**:456-61.
348. **Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* **33**:757-84.
349. **Paterson, D. L., and R. A. Bonomo.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**:657-86.
350. **Paton, A. W., L. Beutin, and J. C. Paton.** 1995. Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. *Gene* **153**:71-4.
351. **Paton, A. W., and J. C. Paton.** 1998. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* **36**:598-602.
352. **Pei, S., A. Doye, and P. Boquet.** 2001. Mutation of specific acidic residues of the CNF1 T domain into lysine alters cell membrane translocation of the toxin. *Mol Microbiol* **41**:1237-47.
353. **Peiffer, G.** 2002. Impact environnemental des effluents d'abattoir: actualités techniques et réglementaires. . Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, Toulouse.
354. **Peigne, C., P. Bidet, F. Mahjoub-Messai, C. Plainvert, V. Barbe, C. Medigue, E. Frapy, X. Nassif, E. Denamur, E. Bingen, and S. Bonacorsi.** 2009. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infect Immun* **77**:2272-84.
355. **Perelle, S., F. Dilasser, J. Grout, and P. Fach.** 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* **18**:185-92.
356. **Perelle, S., F. Dilasser, J. Grout, and P. Fach.** 2005. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* **98**:1162-8.
357. **Perreten, V., and P. Boerlin.** 2003. A New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1169-1172.
358. **Peter, M. G., and C. A. Lingwood.** 2000. Apparent cooperativity in multivalent verotoxin-globotriaosyl ceramide binding: kinetic and saturation binding studies with [(125)I]verotoxin. *Biochim Biophys Acta* **1501**:116-24.
359. **Philippon, A., G. Arlet, and P. H. Lagrange.** 1994. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13 Suppl 1**:S17-29.

360. **Phillips, N., R. D. Hayward, and V. Koronakis.** 2004. Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat Cell Biol* **6**:618-25.
361. **Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahim, E. Bingen, J. Elion, and E. Denamur.** 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**:546-53.
362. **Pierard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers.** 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **36**:3317-22.
363. **Pitout, J. D.** 2010. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs* **70**:313-33.
364. **Pluschke, G., J. Mayden, M. Achtman, and R. P. Levine.** 1983. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun* **42**:907-13.
365. **Pohl, P., Lintermans, B., Mainil, J. and Deprez, P.** 1989. Production de vérocytotoxine par les *Escherichia coli* du porc. *Ann. Méd. Vét.* **133**:31-38.
366. **Pollock, K. G., D. Young, T. J. Beattie, and W. T. Todd.** 2008. Clinical surveillance of thrombotic microangiopathies in Scotland, 2003-2005. *Epidemiol Infect* **136**:115-21.
367. **Poole, K.** 1994. Bacterial multidrug resistance--emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **34**:453-6.
368. **Prado, T., W. C. Pereira, D. M. Silva, L. M. Seki, a. P. D. a. Carvalho, and M. D. Asensi.** 2008. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**:136-41.
369. **Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson, and T. J. Silhavy.** 1996. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**:911-7.
370. **Pruimboom-Brees, I. M., T. W. Morgan, M. R. Ackermann, E. D. Nystrom, J. E. Samuel, N. A. Cornick, and H. W. Moon.** 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:10325-9.
371. **Quale, J., S. Bratu, J. Gupta, and D. Landman.** 2006. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1633-41.
372. **Quitard, S., P. Dean, M. Maresca, and B. Kenny.** 2006. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. *Cell Microbiol* **8**:972-81.
373. **Ramade, F.** 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. . Ediscience International, Paris. .
374. **Ramade, F.** 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. . Ediscience International, Paris.
375. **Ramchandani, M., A. R. Manges, C. DebRoy, S. P. Smith, J. R. Johnson, and L. W. Riley.** 2005. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* **40**:251-7.
376. **Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, G. S. Myers, E. F. Mongodin, W. F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebahia, N. R. Thomson, R. Chaudhuri, I. R. Henderson, V. Sperandio, and J. Ravel.** 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* **190**:6881-93.
377. **Reinthaler, F. F., G. Feierl, H. Galler, D. Haas, E. Leitner, F. Mascher, A. Melkes, J. Posch, I. Winter, G. Zarfel, and E. Marth.** 2010. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water research* **44**:1981-5.

378. **Rendon, M. A., Z. Saldana, A. L. Erdem, V. Monteiro-Neto, A. Vazquez, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron.** 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:10637-42.
379. **Rhoades, J. R., G. Duffy, and K. Koutsoumanis.** 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiol* **26**:357-76.
380. **Riano, I., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Saenz, L. Dominguez, and C. Torres.** 2006. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *J Antimicrob Chemother* **58**:844-7.
381. **Rice, D. H., D. D. Hancock, and T. E. Besser.** 2003. Faecal culture of wild animals for *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Rec* **152**:82-3.
382. **Richards, H. A., D. Perez-Conesa, C. A. Doane, B. E. Gillespie, J. R. Mount, S. P. Oliver, P. Pangloli, and F. A. Draughon.** 2006. Genetic characterization of a diverse *Escherichia coli* O157:H7 population from a variety of farm environments. *Foodborne Pathog Dis* **3**:259-65.
383. **Riegman, N., R. Kusters, H. Van Veggel, H. Bergmans, P. Van Bergen en Henegouwen, J. Hacker, and I. Van Die.** 1990. F1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the foc gene cluster and identification of minor subunits. *J Bacteriol* **172**:1114-20.
384. **Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**:681-685.
385. **Robinson, C. M., J. F. Sinclair, M. J. Smith, and A. D. O'Brien.** 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:9667-72.
386. **Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, M. K. Fakhr, and L. K. Nolan.** 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**:2097-110.
387. **Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea, and C. Mugnaioli.** 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 1**:33-41.
388. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**:1753-4.
389. **Rutjes, N. W., B. A. Binnington, C. R. Smith, M. D. Maloney, and C. A. Lingwood.** 2002. Differential tissue targeting and pathogenesis of verotoxins 1 and 2 in the mouse animal model. *Kidney Int* **62**:832-45.
390. **Sabate, M., G. Prats, E. Moreno, E. Balleste, A. R. Blanch, and A. Andreu.** 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res Microbiol* **159**:288-93.
391. **Saenz, Y., L. Brinas, E. Dominguez, J. Ruiz, M. Zarazaga, J. Vila, and C. Torres.** 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3996-4001.
392. **Sakarya, S., G. T. Ertem, S. Oncu, I. Kocak, and N. Erol.** 2003. *Escherichia coli* bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence. *FEMS Immunol Med Microbiol* **39**:45-50.
393. **Saladin, M., V. T. Cao, T. Lambert, J. L. Donay, J. L. Herrmann, Z. Ould-Hocine, C. Verdet, F. Delisle, A. Philippon, and G. Arlet.** 2002. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* **209**:161-8.
394. **Salih, O., H. Remaut, G. Waksman, and E. V. Orlova.** 2008. Structural analysis of the Saf pilus by electron microscopy and image processing. *J Mol Biol* **379**:174-87.

395. **Samba-Louaka, A., J. P. Nougayrede, C. Watrin, G. Jubelin, E. Oswald, and F. Taieb.** 2008. Bacterial cyclomodulin Cif blocks the host cell cycle by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. *Cell Microbiol* **10**:2496-508.
396. **Samba-Louaka, A., J. P. Nougayrede, C. Watrin, E. Oswald, and F. Taieb.** 2009. The enteropathogenic *Escherichia coli* effector Cif induces delayed apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* **77**:5471-7.
397. **Samie, A., C. L. Obi, R. Dillingham, R. C. Pinkerton, and R. L. Guerrant.** 2007. Enteropathogenic *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. *Am J Trop Med Hyg* **77**:142-50.
398. **Sanchez, S., R. Martinez, A. Garcia, D. Vidal, J. Blanco, M. Blanco, J. E. Blanco, A. Mora, S. Herrera-Leon, A. Echeita, J. M. Alonso, and J. Rey.** 2009. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet Microbiol* **143**:420-3.
399. **SANDERS, P., BOUSQUET-MELOU, A., CHAUVIN, C., TOUTAIN, P.-L. .** 2011. Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Prod. Anim.* **24**:199-204.
400. **Sandvig, K., J. Bergan, A. B. Dyve, T. Skotland, and M. L. Torgersen.** Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* **56**:1181-5.
401. **Savageau, M. A.** 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene-control. *Am Nat* **122**:732-744.
402. **Scheutz, F., L. D. Teel, L. Beutin, D. Pierard, G. Buvens, H. Karch, A. Mellmann, A. Caprioli, R. Tozzoli, S. Morabito, N. A. Strockbine, A. R. Melton-Celsa, M. Sanchez, S. Persson, and A. D. O'Brien.** 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing stx nomenclature. *J Clin Microbiol* **50**:2951-63.
403. **Schmidt, G., J. Selzer, M. Lerm, and K. Aktories.** 1998. The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity. Cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity. *J Biol Chem* **273**:13669-74.
404. **Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler, and H. Karch.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**:1205-8.
405. **Schmieder, R., and R. Edwards.** 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol* **7**:73-89.
406. **Schoeni, J. L., and M. P. Doyle.** 1994. Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol* **60**:2958-62.
407. **Scholl, D., S. Adhya, and C. Merrill.** 2005. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl Environ Microbiol* **71**:4872-4.
408. **Schuller, S., G. Frankel, and A. D. Phillips.** 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol* **6**:289-301.
409. **Schuller, S., R. Heuschkel, F. Torrente, J. B. Kaper, and A. D. Phillips.** 2007. Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa. *Microbes Infect* **9**:35-9.
410. **Schwarz, S., P. Silley, S. Simjee, N. Woodford, E. van Duijkeren, A. P. Johnson, and W. Gastra.** 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* **65**:601-4.
411. **Servin, A. L.** 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**:264-92.
412. **Shiraki, Y., N. Shibata, Y. Doi, and Y. Arakawa.** 2004. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis* **10**:69-75.

413. **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.
414. **Snedeker, K. G., D. J. Shaw, M. E. Locking, and R. J. Prescott.** 2009. Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC Infect Dis* **9**:144.
415. **Snyder, L., and W. Champness.** 2007. *Molecular genetics of bacteria*. Washington, D.C. ASM Press.
416. **Sodha, S. V., M. Lynch, K. Wannemuehler, M. Leeper, M. Malavet, J. Schaffzin, T. Chen, A. Langer, M. Glenshaw, D. Hoefler, N. Dumas, L. Lind, M. Iwamoto, T. Ayers, T. Nguyen, M. Biggerstaff, C. Olson, A. Sheth, and C. Braden.** 2011. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with a national fast-food chain, 2006: a study incorporating epidemiological and food source traceback results. *Epidemiol Infect* **139**:309-16.
417. **SOJKAW.J.** 1965. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Part I : General characteristics and biochemical behaviour of *Escherichia coli*. Commonwealth Agricultural Bureaux : Farnham Royal **1**:63.
418. **Sommer, R., M. Lhotsky, T. Haider, and A. Cabaj.** 2000. UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. *J Food Prot* **63**:1015-20.
419. **Soto, S. M., Martín, M. C., and Mendoza, M. C. .** 2003. Distinctive human and swine strains of *Salmonella enterica* serotype Wien carry large self-transferable R-plasmids. A plasmid contains a class 1-qacEΔ1-sul1 integron with the *dfrA1-aadA1a* cassette configuration. *Food microbiology* **20**:9–16.
420. **Spencer, R. C., P. F. Wheat, T. G. Winstanley, D. M. Cox, and S. J. Plested.** 1987. Novel beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **20**:919-21.
421. **Stahl, A. L., L. Sartz, A. Nelsson, Z. D. Bekassy, and D. Karpman.** 2009. Shiga toxin and lipopolysaccharide induce platelet-leukocyte aggregates and tissue factor release, a thrombotic mechanism in hemolytic uremic syndrome. *PLoS One* **4**:e6990.
422. **Stamm, W. E., and S. R. Norrby.** 2001. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**:S1-4.
423. **Stathopoulos, C., D. L. Provence, and R. Curtiss, 3rd.** 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect Immun* **67**:772-81.
424. **Stenutz, R., A. Weintraub, and G. Widmalm.** 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* **30**:382-403.
425. **Stevenson, G., A. Kessler, and P. R. Reeves.** 1995. A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. *FEMS Microbiol Lett* **125**:23-30.
426. **Strachan, N. J., D. R. Fenlon, and I. D. Ogden.** 2001. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* **203**:69-73.
427. **Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**:1116-22.
428. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**:135-40.
429. **Sugiyama, T., N. Kido, Y. Kato, N. Koide, T. Yoshida, and T. Yokochi.** 1997. Evolutionary relationship among *rfb* gene clusters synthesizing mannose homopolymer as O-specific polysaccharides in *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Gene* **198**:111-3.

430. **Sunde, M., and M. Norström.** 2005. The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:87-90.
431. **Sunde, M., and M. Norström.** 2006. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:741-747.
432. **Sunde, M., and H. Sørum.** 2001. Self-transmissible multidrug resistance plasmids in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of healthy swine. *Microbial drug resistance* **7**:191-6.
433. **Swerdlow, D. L., B. A. Woodruff, R. C. Brady, P. M. Griffin, S. Tippen, H. D. Donnell, Jr., E. Geldreich, B. J. Payne, A. Meyer, Jr., J. G. Wells, and et al.** 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* **117**:812-9.
434. **Swimm, A., B. Bommarius, Y. Li, D. Cheng, P. Reeves, M. Sherman, D. Veach, W. Bornmann, and D. Kalman.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Mol Biol Cell* **15**:3520-9.
435. **Swimm, A. I., and D. Kalman.** 2008. Cytosolic extract induces Tir translocation and pedestals in EPEC-infected red blood cells. *PLoS Pathog* **4**:e4.
436. **Synge, B. A., M. E. Chase-Topping, G. F. Hopkins, I. J. McKendrick, F. Thomson-Carter, D. Gray, S. M. Rusbridge, F. I. Munro, G. Foster, and G. J. Gunn.** 2003. Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows. *Epidemiol Infect* **130**:301-12.
437. **Tam, P., R. Mahfoud, A. Nutikka, A. A. Khine, B. Binnington, P. Paroutis, and C. Lingwood.** 2008. Differential intracellular transport and binding of verotoxin 1 and verotoxin 2 to globotriaosylceramide-containing lipid assemblies. *J Cell Physiol* **216**:750-63.
438. **Tarr, P. I., C. A. Gordon, and W. L. Chandler.** 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**:1073-86.
439. **Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur.** 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **8**:207-17.
440. **Terai, A., S. Yamamoto, K. Mitsumori, Y. Okada, H. Kurazono, Y. Takeda, and O. Yoshida.** 1997. *Escherichia coli* virulence factors and serotypes in acute bacterial prostatitis. *Int J Urol* **4**:289-94.
441. **Tesh, V. L., J. A. Burris, J. W. Owens, V. M. Gordon, E. A. Wadolkowski, A. D. O'Brien, and J. E. Samuel.** 1993. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun* **61**:3392-402.
442. **Tewari, R., T. Ikeda, R. Malaviya, J. I. MacGregor, J. R. Little, S. J. Hultgren, and S. N. Abraham.** 1994. The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun* **62**:5296-304.
443. **Thanabalasuriar, A., A. Koutsouris, A. Weflen, M. Mimee, G. Hecht, and S. Gruenheid.** 2009. The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **12**:31-41.
444. **Tiba, M. R., T. Yano, and S. Leite Dda.** 2008. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **50**:255-60.
445. **Tivendale, K. A., C. M. Logue, S. Kariyawasam, D. Jordan, A. Hussein, G. Li, Y. Wannemuehler, and L. K. Nolan.** 2010. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect Immun* **78**:3412-9.
446. **Tostain J., A. C., Blanc F., Castro R., Li G.** 1999. Cystites aiguës et autres maladies inflammatoires bénignes de la vessie féminine. in : *Encycl. in : Encycl. Med. Chir. Néphrologie-urologie.* Elsevier ed, Paris.:18-221-A-199 p.16.

447. Touchon, M., C. Hoede, O. Tenaillon, V. Barbe, S. Baeriswyl, P. Bidet, E. Bingen, S. Bonacorsi, C. Bouchier, O. Bouvet, A. Calteau, H. Chiapello, O. Clermont, S. Cruveiller, A. Danchin, M. Diard, C. Dossat, M. E. Karoui, E. Frapy, L. Garry, J. M. Ghigo, A. M. Gilles, J. Johnson, C. Le Bouguenec, M. Lescat, S. Mangenot, V. Martinez-Jehanne, I. Matic, X. Nassif, S. Oztas, M. A. Petit, C. Pichon, Z. Rouy, C. S. Ruf, D. Schneider, J. Turret, B. Vacherie, D. Vallenet, C. Medigue, E. P. Rocha, and E. Denamur. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* **5**:e1000344.
448. Tozzi, A. E., A. Caprioli, F. Minelli, A. Gianviti, L. De Petris, A. Edefonti, G. Montini, A. Ferretti, T. De Palo, M. Gaido, and G. Rizzoni. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg Infect Dis* **9**:106-8.
449. Tsai, C. T., J. S. Lai, and S. T. Lin. 1998. Quantification of pathogenic micro-organisms in the sludge from treated hospital wastewater. *J Appl Microbiol* **85**:171-6.
450. Unno, T., D. Han, J. Jang, S. N. Lee, J. H. Kim, G. Ko, B. G. Kim, J. H. Ahn, R. A. Kanaly, M. J. Sadowsky, and H. G. Hur. 2010. High diversity and abundance of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam Province, South Korea. *Sci Total Environ* **408**:3499-506.
451. Vail, J. H., R. Morgan, C. R. Merino, F. Gonzales, R. Miller, and J. L. Ram. 2003. Enumeration of waterborne *Escherichia coli* with petrifilm plates: comparison to standard methods. *J Environ Qual* **32**:368-73.
452. Valat, C., F. Auvray, K. Forest, V. Metayer, E. Gay, C. Peytavin de Garam, J. Y. Madec, and M. Haenni. 2012. Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle. *Appl Environ Microbiol* **78**:4677-82.
453. Van Bost, S., M. H. Bâbe, E. Jacquemin, and J. G. Mainil. 2001. Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Vet. Microbiol.* **82**:311-20.
454. Van Bost, S., E. Jacquemin, E. Oswald, and J. Mainil. 2003. Multiplex PCRs for identification of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **41**:4480-2.
455. Van Dijk, W. C., H. A. Verbrugh, M. E. van der Tol, R. Peters, and J. Verhoef. 1979. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infect Immun* **25**:603-9.
456. van Hoek, A. H., D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A. P. Roberts, and H. J. Aarts. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* **2**:203.
457. Varma, J. K., K. D. Greene, M. E. Reller, S. M. DeLong, J. Trottier, S. F. Nowicki, M. DiOrion, E. M. Koch, T. L. Bannerman, S. T. York, M. A. Lambert-Fair, J. G. Wells, and P. S. Mead. 2003. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* **290**:2709-12.
458. Vernozy-Rozand, C., M. P. Montet, F. Lequerrec, E. Serillon, B. Tilly, C. Bavai, S. Ray-Gueniot, J. Bouvet, C. Mazuy-Cruchaudet, and Y. Richard. 2002. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol* **93**:473-8.
459. Vila, J., K. Simon, J. Ruiz, J. P. Horcajada, M. Velasco, M. Barranco, A. Moreno, and J. Mensa. 2002. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis* **186**:1039-42.
460. Vincent, C., P. Boerlin, D. Daignault, C. M. Dozois, L. Dutil, C. Galanakis, R. J. Reid-Smith, P. P. Tellier, P. A. Tellis, K. Ziebell, and A. R. Manges. 2010. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis* **16**:88-95.
461. Vingadassalom, D., A. Kazlauskas, B. Skehan, H. C. Cheng, L. Magoun, D. Robbins, M. K. Rosen, K. Saksela, and J. M. Leong. 2009. Insulin receptor tyrosine kinase substrate links the

- E. coli O157:H7 actin assembly effectors Tir and EspF(U) during pedestal formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:6754-9.
462. **Wahl, E., L. Vold, B. A. Lindstedt, T. Bruheim, and J. E. Afset.** 2011. Investigation of an *Escherichia coli* O145 outbreak in a child day-care centre--extensive sampling and characterization of *eae*- and *stx1*-positive *E. coli* yields epidemiological and socioeconomic insight. *BMC Infect Dis* **11**:238.
463. **Wallace, B. J., J. J. Guzewich, M. Cambridge, S. Altekruze, and D. L. Morse.** 1999. Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994. *Am J Prev Med* **17**:48-54.
464. **Walsh, T. R.** 2006. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol* **9**:476-82.
465. **Wang, Y., Z. G. Wen, and K. S. Kim.** 2004. Role of S fimbriae in *Escherichia coli* K1 binding to brain microvascular endothelial cells in vitro and penetration into the central nervous system in vivo. *Microb Pathog* **37**:287-93.
466. **Weber, D. A., C. C. Sanders, J. S. Bakken, and J. P. Quinn.** 1990. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **162**:460-5.
467. **Weill, F. X., R. Lailier, K. Praud, A. Kerouanton, L. Fabre, A. Brisabois, P. A. Grimont, and A. Cloeckaert.** 2004. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol* **42**:5767-73.
468. **Weiss, S. M., M. Ladwein, D. Schmidt, J. Ehinger, S. Lommel, K. Stading, U. Beutling, A. Disanza, R. Frank, L. Jansch, G. Scita, F. Gunzer, K. Rottner, and T. E. Stradal.** 2009. IRSp53 links the enterohemorrhagic *E. coli* effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation. *Cell Host Microbe* **5**:244-58.
469. **Wery, N., V. Bru-Adan, C. Minervini, J. P. Delgenes, L. Garrelly, and J. J. Godon.** 2008. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Appl Environ Microbiol* **74**:3030-7.
470. **WHO, W. H. O.** 1980. *Escherichia coli* diarrhoea. *Bulletin of the World Health Organization* **58**:23-36.
471. **Wiles, T. J., B. K. Dhakal, D. S. Eto, and M. A. Mulvey.** 2008a. Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell* **19**:1427-38.
472. **Wiles, T. J., R. R. Kulesus, and M. A. Mulvey.** 2008b. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**:11-9.
473. **Wong, T. L., S. Macdiarmid, and R. Cook.** 2009. *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* biotype 1 in a pilot survey of imported and New Zealand pig meats. *Food Microbiol* **26**:177-82.
474. **Woodford, N., A. Carattoli, E. Karisik, A. Underwood, M. J. Ellington, and D. M. Livermore.** 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4472-82.
475. **Wright, G. D.** 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* **5**:175-86.
476. **Wright, K. J., and S. J. Hultgren.** 2006. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol* **1**:75-87.
477. **Wright, K. J., P. C. Seed, and S. J. Hultgren.** 2005. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect Immun* **73**:7657-68.
478. **Xicohtencatl-Cortes, J., V. Monteiro-Neto, Z. Saldana, M. A. Ledesma, J. L. Puente, and J. A. Giron.** 2009. The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J Bacteriol* **191**:411-21.

479. **Yamamoto, S.** 2007. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Chemother* **13**:68-73.
480. **Yamamoto, S., A. Terai, K. Yuri, H. Kurazono, Y. Takeda, and O. Yoshida.** 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**:85-90.
481. **Yang, C. M., M. F. Lin, P. C. Liao, H. W. Yeh, B. V. Chang, T. K. Tang, C. Cheng, C. H. Sung, and M. L. Liou.** 2009. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**:560-5.
482. **Zapun, A., C. Contreras-Martel, and T. Vernet.** 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* **32**:361-85.
483. **Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* **40**:1441-6.
484. **Zhao, L., X. Chen, X. Zhu, W. Yang, L. Dong, X. Xu, S. Gao, and X. Liu.** 2009. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology* **74**:702-7.
485. **Zienkiewicz, M., I. Kern-Zdanowicz, M. Golebiewski, J. Zylinska, P. Mieczkowski, M. Gniadkowski, J. Bardowski, and P. Ceglowski.** 2007. Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene blaSHV-5. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1164-71.

Annexe 1 : Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
1	1	1	<i>stx1a</i>	-	ND	B1	TE, SSS, TMP	-	-
2	1	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	TE	0	0
3	1	2	<i>stx1a</i>	-	ND	B2	S	-	-
4	1	2	<i>stx2e</i>	-	ND	A	TE	-	-
5	1	2	<i>eaeθ</i>	+	ND	B1	STR, TE	0	0
6	1	2	<i>eae θ</i>	+	ND	B1	STR, TE	0	0
7	1	2	<i>eaeθ</i>	-	ND	B1	S	0	0
8	1	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	TE	0	0
9	1	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
10	1	3	<i>eae</i>	-	ND	A	TE	0	0
11	1	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	STR, TE	0	0
12	1	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	STR, TE	0	0
13	1	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	0	0
14	1	3	<i>eaeβ1</i>	-	O26H11	A	TE	0	0
15	2	1	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
16	2	1	<i>eae</i>	-	ND	B2	AM	0	0
17	2	1	<i>stx1a-stx2b</i>	+	ND	B2	S	-	-

^aND : non déterminé

^b AM : ampicilline, STR : streptomycine, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline et S : sensible.

Annexe 1 : Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives (Suite)									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
18	2	1	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	S	0	0
19	2	2	<i>stx2</i>	-	ND	B2	S	-	-
20	2	2	<i>eae</i>	-	O103H2	B1	S	0	0
21	2	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
22	2	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
23	3	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	0	0
24	3	1	<i>eae</i>	-	ND	A	AMP CEF CXM STR CHL NAL SMX TMP TET	0	-
25	3	1	<i>eae</i>	-	ND	A	S	0	-
26	3	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	0	0
27	3	2	<i>eaeθ</i>	-	ND	B2	S	0	0
28	3	2	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
29	3	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	AM	0	0
30	3	3	<i>stx2d</i>	+	ND	B2	S	-	0
31	4	1	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
32	4	1	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
33	4	1	<i>eae</i>	+	O103	B1	S	0	0
34	4	1	<i>stx2d</i>	-	ND	A	STR, TE, SSS	-	0

^aND : non déterminé

^b AM : ampicilline, CXM : céfuroxime, STR : streptomycine, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, C : chloramphénicole, KAN : kanamycine, GEN : gentamycine, CIP : ciproflaxacine, CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, CTX : céfotaxime, CF : céphalotine et S : sensible.

Annexe 1 : Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives (Suite)									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
35	4	1	<i>stx2d</i>	-	ND	B2	S	-	0
36	4	1	<i>eae</i>	+	ND	B1	S	0	0
37	4	1	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	0	0
38	4	2	<i>eaeθ</i>	-	ND	B2	S	0	-
39	4	3	<i>stx1a</i>	-	ND	B1	S	-	0
40	4	3	<i>eae</i>	-	ND	A	S	-	-
41	5	1	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	S	0	0
42	5	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	AM	0	0
43	5	1	<i>eae</i>	-	O103	B2	S	0	0
44	5	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	TE	0	0
45	5	1	<i>stx2e</i>	-	ND	A	AM, KAN, STR, TE, SSS	-	0
46	5	2	<i>stx2</i>	-	ND	A	S	-	0
47	5	2	<i>stx2</i>	-	ND	B1	S	-	0
48	5	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B2	S	0	0
49	5	2	<i>stx2</i>	-	ND	B2	AM, STR, TE, SSS, TMP	-	0
50	5	2	<i>stx2</i>	-	ND	B2	S	-	0
51	5	2	<i>stx2</i>	-	ND	A	S	-	-

^aND : non déterminé

^b AM : ampicilline, STR : streptomycine, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, KAN : kanamycine et S : sensible

Annexe 1: Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives (Suite)									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
52	5	2	<i>eaeθ</i>	-	ND	A	AM, CF, STR, TE, C, SSS, TMP	0	0
53	5	2	<i>eaeθ</i>	-	ND	A	STR, TE, SSS	0	0
54	5	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	TE, SSS, TMP	0	0
55	5	3	<i>eae</i>	-	ND	A	S	0	0
56	5	3	<i>eae</i>	-	ND	A	S	0	0
57	5	3	<i>eae</i>	-	ND	A	S	0	0
58	6	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	0	0
59	6	1	<i>eae</i>	-	ND	A	AM, TE	0	0
60	6	1	<i>stx2b</i>	+	ND	A	AM, STR, TE, C, SSS, TMP	-	-
61	6	2	<i>eaeε</i>	+	O103H2	B1	S	0	0
62	6	2	<i>eaeε</i>	+	O103H2	B1	AM, SSS, TMP	0	0
63	6	2	<i>eaey1</i>	+	O145H28	B2	S	0	0
64	6	2	<i>eaey1</i>	+	O145H28	A	AM, TE, SSS, TMP	0	0
65	6	2	<i>eae</i>	+	O103H2	B2	S	0	0
66	6	2	<i>eae</i>	+	ND	B1	S	0	0
67	6	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	TE, SSS	0	0
68	6	3	<i>stx2d</i>	-	ND	B1	TE, SSS	-	-
69	7	1	<i>eae</i>	-	ND	D	S	-	0
70	7	1	<i>eae</i>	-	ND	D	TE, SSS, TMP	-	0

^aND : non déterminé

^b AM : ampicilline, STR : streptomycine, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, KAN : kanamycine, CF : céphalotine, C : chloramphénicol et S : sensible

Annexe 1 : Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives (Suite)									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
71	7	1	<i>eaeε</i>	-	ND	B1	TE, SSS	-	0
72	7	2	<i>stx2e</i>	-	ND	A	STR, TE, SSS, TMP	-	-
73	7	2	<i>eaey1</i>	+	O145H28	A	S	-	0
74	7	2	<i>eaeθ</i>	-	ND	B1	S	-	0
75	7	2	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	0
76	7	3	<i>eaeθ</i>	-	ND	A	AM, STR, TE, SSS, TMP	-	0
77	7	3	<i>eae</i>	-	ND	A	S	-	0
78	8	1	<i>eaeθ</i>	-	ND	B1	STR, TE	-	0
79	8	1	<i>eae</i>	-	ND	D	AM, STR, TE, SSS, TMP	-	0
80	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	STR, TE	-	0
81	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B2	S	-	0
82	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	S	-	0
83	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	S	-	0
84	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	AM, KAN, STR, TE, SSS, TMP	-	0
85	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B2	S	-	0
86	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
87	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	A	TE	-	0

^a ND : non déterminé

^b AM : ampicilline, STR : streptomycine, SSS : sulfonamides, TMP : trimethoprime, TE : tétracycline, KAN : kanamycine et S : sensible.

Annexe 1 : Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives (Suite)									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
88	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
89	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
90	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
91	8	2	<i>stx2e</i>	-	ND	B1	TE	-	-
92	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
93	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
94	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
95	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
96	8	2	<i>eaeβ1</i>	-	ND	B1	TE	-	0
97	8	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	-
98	8	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	TE	-	0
99	8	3	<i>eaeθ-stx1a</i>	+	O111H8	B1	TE	-	0
100	9	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	TE	-	0
101	9	1	<i>eaeθ</i>	-	ND	B1	TE	-	0
102	9	2	<i>eaeβ1</i>	+	ND	B1	TE	-	0
103	9	2	<i>eaeε</i>	+	O26H11	B1	S	-	0
104	9	2	<i>eaeθ</i>	+	ND	B1	S	-	0

^aND : non déterminé

^bTE : tétracycline et S : sensible.

Annexe 1 : Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives (Suite)									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
105	9	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	AM, STR, TE, SSS, TMP, NA	-	0
106	9	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	0
107	9	3	<i>eaeβ1</i>	-	O103H2	B1	S	-	0
108	9	3	<i>eaeθ</i>	+	ND	B1	STR, , TE, C, SSS, TMP	-	0
109	9	3	<i>stx2d</i>	+	ND	A	S	-	-
110	10	1	<i>stx2c</i>	-	ND	B1	STR, TE	-	-
111	10	1	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	0
112	10	1	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	0
113	10	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	-	0
114	10	2	<i>stx2e</i>	-	ND	B1	STR, TE	-	-
115	10	3	<i>eaeβ1</i>	+	O26H11	D	S	-	0
116	10	3	<i>stx1c</i>	-	ND	B1	S	-	-
117	10	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	0
118	10	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	-
119	10	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	-	0
120	10	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	-	0
121	10	3	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	-	0
122	11	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	-	0

^aND : non déterminé

^b AM : ampicilline, STR : streptomycine, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline et S : sensible.

Annexe 1 : Caractérisation des souches <i>eae</i> et/ou <i>stx</i> positives (Suite)									
Rang	Campagnes	Points de prélèvement	Gènes associés aux EHEC	<i>hlyA</i>	Sérotypes ^a	Groupes phylogénétiques	Profil de résistance ^b	EAF	BFP
123	11	1	<i>eae</i>	-	ND	B1	S	-	0
124	11	1	<i>stx2d</i>	-	ND	A	AM, TE, C, SSS, TMP	-	-
125	11	3	<i>stx2d</i>	-	ND	B2	S	-	-
126	11	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	0
127	11	3	<i>stx1a</i>	-	ND	B2	S	-	-
128	11	3	<i>stx1a</i>	-	ND	B2	S	-	-
129	11	3	<i>stx1</i>	-	ND	A	S	-	-
130	11	1	<i>eae</i>	-	ND	A	S	-	-
131	12	1	<i>stx1a</i>	-	ND	A	S	-	-
132	12	1	<i>stx1a-stx2a</i>	-	ND	B2	AM, STR, TE, SSS, TMP	-	-
133	12	1	<i>stx1a-stx2a-c</i>	+	ND	B2	AM, STR, TE, SSS, TMP	-	-
134	12	2	<i>eaeβ1</i>	+	ND	A	S	-	0
135	12	2	<i>eaeε</i>	+	O103H2	A	S	-	0
136	12	2	<i>eae</i>	-	O157	B1	AM, CF	-	-
137	12	2	<i>eae</i>	-	O157	B1	TE, NA	-	0
138	12	2	<i>eaeθ</i>	-	ND	D	AM, KAN, STR, TE, SSS	-	0
139	12	3	<i>eae</i>	-	ND	A	S	-	0
140	12	3	<i>eae</i>	-	ND	B2	S	-	0
141	4 (IMS)	3	<i>eaey1, stx2-c</i>	+	O157 H7	D1	S	0	0
142	4 (IMS)	3	<i>eaey1, stx2-c</i>	+	O157 H7	D1	S	0	0
143	4 (IMS)	3	<i>eaey1, stx2-c</i>	+	O157 H7	D1	S	0	0
144	8 (IMS)	3	<i>eaey1, stx2-c</i>	+	O157 H7	D1	S	0	0

^aND : non déterminé

^b AM : ampicilline, STR : streptomycine, NA : acide nalidixique, SSS : sulfonamides, TMP : triméthoprime, TE : tétracycline, C : chloramphénicol, KAN : kanamycine et S : sensible.

Annexe 2 : Recherche des 5 sérogroupes majeurs par IMS							
Campagnes	Rangs	Agglutination	Prélèvements	Date	API 20E	PCR TRIPLEX	PCR GENE SYSTEM
1							
2	1	O26	P1	21/04/2009	5144552		
Avril	2	O111	P1		5044152		
	3	O111	P2		5144552		
	4	O111	P2		5004552		
	8	O111	P3	24/04/2009	5544552		
	5	O157	P1		5144152		
	6	O157	P1		5144152		
	7	O157	P1		5144152		
3	9	O103	P1	12/05/2009	5144572		
Mai	10	O103	P2		5144572		
	11	O103	P2		5144552		
	12	O103	P2		5044552		
	13	O103	P3	15/05/2009	5144572		
	14	O111	P3		5144572		
	15	O111	P3		5144572		
	16	O145	P3		5144572		
	17	O145	P3		5144572		
4	18	O103	P3		5144572	eae	O103 non confirmé, eae confirmé (Ct = 30)
Juin	19	O103	P3	12/06/2009	5144572		
	20	O103	P3		5144572		
	21	O111	P1	09/06/2009	5104552		
	22	O157	P3	12/06/2009	5144172	eae, stx2	O157 H7 eae stx2
	23	O157	P3		5144172	eae, stx2	O157 H7 eae stx2
	24	O157	P3		5144172	eae, stx2	O157 H7 eae stx2

5	25	O111	P2	07/07/2009	5144552		
6	26	O26	P1	22/09/2009	5044552		
Septembre	27	O26	P2		5144172		
	28	O26	P2		5144552		
	29	O26	P2		5144172		
	30	O103	P1		5144572		
	31	O103	P2		5144572		
	32	O111	P1		1044572		
	33	O111	P2		5144572		
	34	O111	P2		5144172		
7	35	O103	P2	13/10/2009	5144572		
Octobre	36	O103	P2		5144572		
	37	O103	P2		5144572		
	38	O103	P2		5144572		
	39	O111	P2		5144572		
	40	O111	P2		1044512		
	41	O157	P2		5144152		
8	42	O26	P1	17/11/2009	5044552		
Novembre	43	O103	P3	20/11/2009	5144552		
	44	O111	P1	17/11/2009	5144553		
	45	O111	P2		5144572		
	46	O111	P3	20/11/2009	5144572		
	47	O157	P3		5144152	eae, stx2	O157 H7 eae stx2
9	48	O26	P2	08/12/2009	5044542		
Décembre	49	O111	P2		5044552		
	50	O111	P2		5044552		
	51	O111	P2		5044552		
	52	O111	P2		5044542		
10	53	O111	P1	12/01/2010	1044552		
Janvier	54	O111	P3	15/01/2010	50044572		

	55	O157	P2		5044152		
	56	O157	P2		5044152		
11	57	O26	P3	24/02/2010	5144572		
Février	58	O103	P1	21/02/2010	5144572		
	59	O103	P1		5144552		
	60	O103	P1		1144572		
	61	O103	P2		5044552		
	62	O103	P2		5144572		
	63	O103	P2		5044552		
	64	O103	P2		5044572		
	65	O103	P3	24/02/2010	5144572		
	66	O103	P3		5044572		
	67	O111	P1	21/02/2010	5144572		
	68	O111	P1		5144572		
	69	O111	P1		5144572		
	70	O111	P2		1144552		
	71	O111	P2		5044452		
	72	O111	P2		5044172		
	73	O111	P3		5144572		
12	74	O26	P2		1044152		
Mars	75	O103	P1		5144572		
	76	O103	P1		1144552		
	77	O111	P2		1144152		
	78	O111	P2		5044152		
	79	O111	P2		1044552		

TITRE

***Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire.**

RESUME

Les souches de *Escherichia coli* se trouvent dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où ils jouent généralement le rôle de bactéries commensales. Cependant, par acquisition et combinaison de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer une variété de maladies, de la gastro-entérite (EHEC, EPEC, EAEC...) à des infections extra-intestinales de l'appareil urinaire, du sang ou du système nerveux central (ExPEC). La recherche des gènes de virulence associés aux EHEC et aux ExPEC et la production de BLSE a été réalisée sur une collection de souches isolées d'effluents d'origine humaine ou animale. La prévalence des gènes de virulence associés aux ExPEC était plus élevée au niveau des effluents urbains (26,9%) et dans les effluents traités (13,2%) que dans les effluents d'abattoir (2,6%). Par contre, les gènes associés aux EHEC étaient plus souvent retrouvés dans les effluents d'origine animale. Par ailleurs, les souches *E. coli* productrices de BLSE ont été principalement détectées dans les effluents humains (1,7%). Malgré le traitement en station d'épuration, des *E. coli* potentiellement pathogènes et résistantes aux antibiotiques étaient rejetées dans l'environnement qui constitue une source potentielle de contamination des humains et des animaux. La comparaison des résultats obtenus en France et au Sénégal montre que les prévalences de souches *E. coli* potentiellement pathogènes étaient plus élevées dans les effluents rejetés en France.

MOTS-CLES

Escherichia coli ; EHEC ; ExPEC ; *E. coli* productrices de BLSE ; Eaux usées ; Abattoir ; Station d'épuration urbaine.

TITLE

Pathogenic and antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from effluent of human and animal origin: prevalence and characterization before and after purification treatment.

SUMMARY

Strains of *Escherichia coli* are found in the gastrointestinal tract of many warm-blooded animals, including humans, where they commonly play the role of commensal bacteria. This normally harmless commensal needs only to acquire a combination of virulence factors to become a highly adapted pathogen capable of causing a range of diseases, from gastroenteritis (EHEC, EPEC, EAEC...) to extraintestinal infections of the urinary tract, bloodstream or central nervous system (ExPEC). Genes associated with EHEC and ExPEC and ESBL producing strains were sought in *E. coli* strains isolated from human or animal effluent. Prevalence of genes associated with ExPEC was higher in urban effluents (26.9%) and in the treated effluent (13.2%) than in the effluents from livestock (2.6%). In contrast, the genes associated with EHEC were higher in animal waste. Moreover, ESBL-producing *E. coli* were mainly detected in human waste. The treatment at the WWTP had not completely eliminated the pathogenic *E. coli* and / or ESBL-producing *E. coli*. These strains will eventually end up in the watercourse to become a source of human and animal contamination. The comparison of results obtained in France and Senegal shows that the prevalence of potentially pathogenic *E. coli* was higher in the effluents in France.

Keywords

Escherichia coli ; EHEC ; ExPEC ; ESBL-producing *E. coli* ; Wastewater ; Slaughterhouse ; Wastewater treatment plant.