

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mme **CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- M. **DESMAIZIERES Louis-Marie**, *Clinique équine*
M. **REYNOLDS Brice**, *Pathologie chirurgicale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A notre jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie - Virologie

qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Alain MILON

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie

qui a permis par ses conseils l'élaboration de ce travail.

A Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Productions animales

qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

A Monsieur le Docteur Jean DE RYCKE

Directeur de recherches INRA

initiateur de ce travail, et présent tout au long de celui-ci.

Sincères remerciements.

Un grand merci à toute l'équipe de microbiologie et tout particulièrement à Christian Tasca et Frédéric Heyrault qui ont réussi à inculquer à un néophyte les bases techniques nécessaires à ce travail.

Merci encore aux GTV 71 pour leur précieuse collaboration et à tous ceux qui ont participé à ce travail (sans oublier les veaux ainsi que leurs mères).

A mes parents.

A ma sœur.

A mes grands-parents.

A ma famille.

A mes amis.

Rôle des *Escherichia coli* producteurs de
cytotoxines dans la diarrhée du veau.
Une enquête étiologique en région Bourgogne.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	6
1° PARTIE : Verotoxines, toxines CNF et CDT – Etude bibliographique	7
1. LES COLIBACILLES PRODUCTEURS DE VEROTOXINES OU VTEC	7
1.1. Les verotoxines ou Shiga-like-toxines	7
1.1.1. propriétés	
1.1.1.1. biologiques	
1.1.1.2. immunologiques	
1.1.2. structure et mécanisme d'action	
1.1.2. déterminisme génétique	
1.1.3. action des verotoxines sur l'organisme	
1.2. Facteurs de virulence et caractères associés	13
1.2.1. l'Entéro-hémolysine	
1.2.2. facteurs induisant la lésion d'attachement-effacement	
1.2.2.1. description de la lésion	
1.2.2.2. mécanisme d'action et déterminisme génétique	
1.2.2.3. association avec les VTEC	
1.2.2.4. importance en pathologie	
1.3. Intérêt en médecine vétérinaire	17
1.3.1. la maladie de l'œdème du porc	
1.3.2. verotoxines et diarrhée du veau	
1.3.2.1. arguments expérimentaux	
1.3.2.2. arguments épidémiologiques	
1.3.2.3. présomptions cliniques associées	
1.3.2.4. diagnostic de laboratoire	
1.3.3. autres animaux	
1.4. Rôle en pathologie humaine et conséquences sur la santé publique	20
1.4.1. pathologies associées aux EHEC	
1.4.2. les bovins sources de contamination	
2. LES COLIBACILLES PRODUCTEURS DE TOXINES CNF OU NTEC	22
2.1. Les toxines CNF ou cytotoxic necrotizing factor	22
2.1.1 propriétés	
2.1.1.1. biologiques	
2.1.1.2. moléculaires et immunologiques	
2.1.2. déterminisme génétique	
2.1.3. mécanisme d'action	
2.2. Facteurs de virulence associés	24
2.2.1. aux NTEC1	
2.2.2. aux NTEC2	
2.2.3. les toxines CDT ou cytolethal distending toxins	
2.3. Rôle dans la pathologie des NTEC : arguments épidémiologiques	27
2.3.1. NTEC1	
2.3.1.1. porcs	
2.3.1.2. bovins	
2.3.1.3. autres animaux	
2.3.1.4. pathologie humaine	
2.3.2. NTEC2	
2.4. Rôle dans la pathologie : arguments expérimentaux	28
2.4.1. NTEC1	
2.4.2. NTEC2	
2.5. Diagnostic	29
2.5.1. suspicions cliniques associées	
2.5.2. de laboratoire	

2° PARTIE : Etude expérimentale	31
1. MATERIEL ET METHODES	31
1.1. Les animaux	31
1.2. Les souches bactériennes	31
1.3. Les cultures cellulaires	32
1.4. Diagnostics d'orientation	32
1.4.1. mise en évidence des hémolysines	
1.4.2. tests de cytotoxicité des extraits congelés-décongelés	
1.4.2.1. préparation des extraits congelés –décongelés	
1.4.2.2. mise en œuvre du test de cytotoxicité	
1.5. Diagnostics spécifiques	36
1.5.1. diagnostic par PCR ou réaction de polymérisation en chaîne	
1.5.1.1. présentation	
1.5.1.2. extraction de l'ADN	
1.5.1.3. multiplex VT1/VT2/eae	
1.5.1.4. multiplex CNF/CDT	
1.5.1.5. détermination des types de CNF et CDT	
1.5.2. production de sonicats et séroneutralisation	
1.5.2.1. production de sonicat	
1.5.2.2. dosage de l'activité cytotoxique des sonicats	
1.5.2.3. confirmation des types de VT par séroneutralisation	
2. RESULTATS	42
3. DISCUSSION	52
CONCLUSION	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	56

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : effet cytotoxique des verotoxines	9
Figure 2 : structure schématique des verotoxines	10
Figure 3 : les verotoxines dans la cellule ; devenir et conséquences	11
Figure 4 : la lésion d'attachement-effacement	14
Figure 5 : genèse de la lésion d'attachement-effacement	15
Figure 7 : effet cytopathique de la toxine CNF	23
Figure 8 : action de CNF sur le cytosquelette	24
Figure 9 : effet cytopathique de la toxine CDT	25
Figure 10 : mise en œuvre des diagnostics d'orientation	33
Figures 11 et 12 : différences des phénotypes α -hémolysine et entéro-hémolysine	34
Figure 13 : mise en œuvre des diagnostics spécifiques	37
Figure 14 : PCR multiplex VT1/VT2/eae	39
Figure 15 : PCR multiplex CNF/CDT	40
Figure 16 : résultats veaux témoins	44
Figure 17 : résultats veaux malades	44
Figure 18 : résultats souches témoins	45
Figure 19 : résultats souches malades	45
Figures 20 et 21 : présence des souches VTEC chez les témoins et les malades	46
Figures 22 et 23 : présence des souches NTEC2 chez les témoins et les malades	48

TABLEAUX

Tableau 1 : pathovars d'E. coli présents lors de diarrhée chez l'homme et les animaux	7
Tableau 2 : caractéristiques des verotoxines	8
Tableau 3 : pathologies associées aux VTEC/EHEC chez l'homme et les animaux	17
Tableau 4 : caractéristiques des toxines CNF	22
Tableau 5 : pathologies associées aux NTEC chez l'homme et les animaux	27
Tableau 6 : pathologie du veau et colibacilles producteurs de cytotoxines	30
Tableau 7 : souches témoins utilisées dans notre étude	32
Tableau 8 : caractéristiques des primers utilisés pour le multiplex VT1/VT2/eae	38
Tableau 9 : caractéristiques des primers utilisés pour le multiplex CNF/CDT	40
Tableau 10 : résultats PCR et caractère hémolytique	43
Tableau 11 : répartition des souches VTEC	47
Tableau 12 : répartition des souches eae+	47
Tableau 13 : répartition des souches supposées EHEC	47
Tableau 14 : répartition des souches NTEC	48
Tableau 15 : répartition des souches hémolytiques	49
Tableau 16 : résultats comparés PCR / extraits congelés-décongelés pour la détection des verotoxines	49
Tableau 17 : comparaison des résultats PCR/extraits-congelés décongelés pour la détection des CNF	50
Tableau 18 : résultats séroneutralisation sérum anti-VT1	51
Tableau 19 : résultats PCR et cytotoxicité des sonicats provenant des souches CNF+	51

INTRODUCTION

Dans la pathologie du veau, la diarrhée est une entité majeure si ce n'est la plus importante tant au plan de la mortalité que de la morbidité. L'étiologie est multifactorielle. Facteurs alimentaires et environnementaux, parasites, virus et bactéries, seuls ou associés peuvent être impliqués entraînant des troubles plus ou moins graves. Parmi toutes ces causes, le rôle de la bactérie *Escherichia coli* est déterminant mais la diversité de ses mécanismes de pathogénicité en font un groupe très hétérogène.

Les *E. coli* entérotoxigènes ou ETEC sont bien connues chez le veau. Leurs facteurs de pathogénicité sont essentiellement une adhésine fimbriaire appelée K99 ou F5, qui permet la colonisation de l'intestin grêle, et une entérotoxine thermostable appelée ST1 ou STa entraînant une fuite hydrique des entérocytes. Les ETEC induisent une diarrhée aqueuse chez les veaux âgés de moins de 8 jours et sont maintenant maîtrisées grâce à la vaccination des mères induisant une protection colostrale .

Il existe cependant d'autres catégories ou « pathovars » d'*Escherichia coli* impliqués dans le syndrome diarrhéique du veau. Ce sont notamment les colibacilles producteurs de cytotoxines. On nomme cytotoxines des productions bactériennes qui induisent des modifications sur les cellules eucaryotes. On s'intéressera ici aux colibacilles producteurs de verotoxines, Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF) et de Cytoléthale Distending Toxin (CDT). Parmi les colibacilles verotoxinogènes, on peut distinguer les EHEC (colibacilles entérohémorragiques) à l'origine de toxi-infections alimentaires avec de graves conséquences pathologiques chez l'homme (syndrome hémolytique et urémique) et dont le réservoir principal est constitué par les bovins.

Dans la partie bibliographique, je présenterai les cytotoxines et les arguments permettant de les impliquer dans la pathologie, du veau en particulier. Le rôle joué par les animaux comme sources potentielles d'infection humaine sera aussi évoqué.

La partie expérimentale rapporte les résultats d'une enquête cas-témoin réalisée sur des veaux diarrhéiques et sains dans le but d'évaluer la liaison épidémiologique entre la présence de souches productrices de cytotoxines et la diarrhée.

1° PARTIE : Veroxines, toxines CNF et CDT – Etude bibliographique

Les colibacilles présentent des mécanismes variés pour exprimer leur action pathogène. On se sert de ces différences pour les classer dans des pathovars regroupant des caractéristiques communes. Les principaux pathovars inducteurs de diarrhées humaines et animales sont présentés dans le tableau 1.

Pathovars	Caractéristiques
ETEC (enterotoxigenic <i>E. coli</i>)	- adhésion aux entérocytes par des fimbriae spécifiques - production d'entérotoxines (thermostables ST et/ou thermolabiles LT)
EIEC (enteroinvasive <i>E. coli</i>)	- invasion et prolifération dans les cellules épithéliales - test de Sereny positif - pas de motilité - plasmide de virulence
EaggEC (enteroaggregative <i>E. coli</i>)	- adhérence typique « en tas de briques » aux cellules in vitro - production d'une cytotoxine (enteroaggregative stable toxin : EAST)
EPEC (enteropathogenic <i>E. coli</i>)	- adhésion aux entérocytes grâce à des adhésines spécifiques - attachement-effacement des microvillosités des entérocytes et présence du locus LEE - pas de caractère invasif - pas de production d'entérotoxines - pas de production de verotoxines
VTEC (verotoxigenic <i>E. coli</i>)	- production de verotoxines
EHEC (enterohemorrhagic <i>E. coli</i>)	- production de verotoxines - attachement-effacement des microvillosités des entérocytes et présence du locus LEE - production d'entérohémolysine - plasmides de virulence
NTEC (necrotoxigenic <i>E. coli</i>)	- production de toxine CNF

Tableau 1 : pathovars d'*E. coli* présents lors de diarrhée chez l'homme et les animaux

1. LES COLIBACILLES PRODUCTEURS DE VEROTOXINES OU VTEC

La production de verotoxines, aussi appelées shiga-toxines ou shiga-like toxines, est associée avec certaines souches d'*Escherichia coli* qui sont retrouvées dans les selles d'animaux domestiques,

particulièrement les bovins et les petits ruminants (3). On appellera les *E. coli* producteurs de verotoxines VTEC (tableau 1). Les VTEC appartiennent à de nombreux sérotypes et une sous-catégorie importante des VTEC, constitue les colibacilles entérohémorragiques ou EHEC. Ces EHEC sont à l'origine de toxi-infections alimentaires entraînant de graves pathologies humaines appelées SHU pour syndrome hémolytique et urémique. Outre la production de verotoxines, les EHEC ont le pouvoir de provoquer des lésions dites d'« attachement-effacement » et sécrètent une entérohémolysine codée par un « plasmide EHEC » (50).

1.1. Les verotoxines ou Shiga-like-toxines

1.1.1. propriétés (tableau 2)

	VT1	VT2	VT2e
Toxicité			
-cellules Vero	+	+	+
-cellules HeLa	+	+	-
-paralyse et létalité chez la souris	+	+	+
-accumulation de fluide dans les anses ligaturées	+	+	+
Séroneutralisation			
-sérum anti VT1	+	-	-
-sérum anti VT2	-	+	+
Déterminisme génétique			
-phage tempéré	+	+	-
Structure moléculaire			
-1 sous-unité A (« active »)	32 kDa		
-5 sous-unités B (« binding »)	7,7 kDa		
Récepteur cellulaire (glycosphingolipide)	Gb3	Gb3	Gb4

Tableau 2 : caractéristiques des verotoxines

1.1.1.1. biologiques



Figure 1 : Effet cytotoxique des verotoxines. On observe en haut un tapis cellulaire normal, avec des cellules confluentes. En bas, après mise en contact avec des verotoxines les cellules meurent, ne sont plus confluentes, leur cytoplasme disparaît. A terme, il n'y aura plus de cellules visibles sur le tapis.

Les verotoxines sont cytotoxiques : VT1 et VT2 sont capables de détruire *in vitro* les cellules Vero en culture ainsi que les cellules HeLa (figure 1). Elles sont aussi entérotoxiques : elles induisent une accumulation de fluide dans les anses intestinales ligaturées de lapin. Les verotoxines sont enfin neurotoxiques et létales : lors de l'inoculation chez la souris et le lapin par voie intraveineuse, elles provoquent une paralysie des membres postérieurs suivie de la mort, VT2 apparaît moins toxique que VT1 pour les cellules Vero mais l'est beaucoup plus lors d'inoculation chez la souris (29)(39)(47).

1.1.1.2. immunologiques

Les effets cytopathiques des verotoxines sont neutralisés par des antisérums spécifiques à chaque type et il n'existe pas de séroneutralisation croisée. Cependant l'antisérum spécifique neutralisant l'effet de la toxine de *Shigella dysenteriae* neutralise aussi VT1, mettant en évidence leur parenté. Elles ont les mêmes effets, une structure semblable et des gènes quasi identiques, c'est la raison pour laquelle on nomme aussi les verotoxines shiga-like toxins.

1.1.2. structure et mécanisme d'action sur la cellule

Ce sont des protéines thermolabiles composées de plusieurs sous-unités, on peut les qualifier de multimériques.

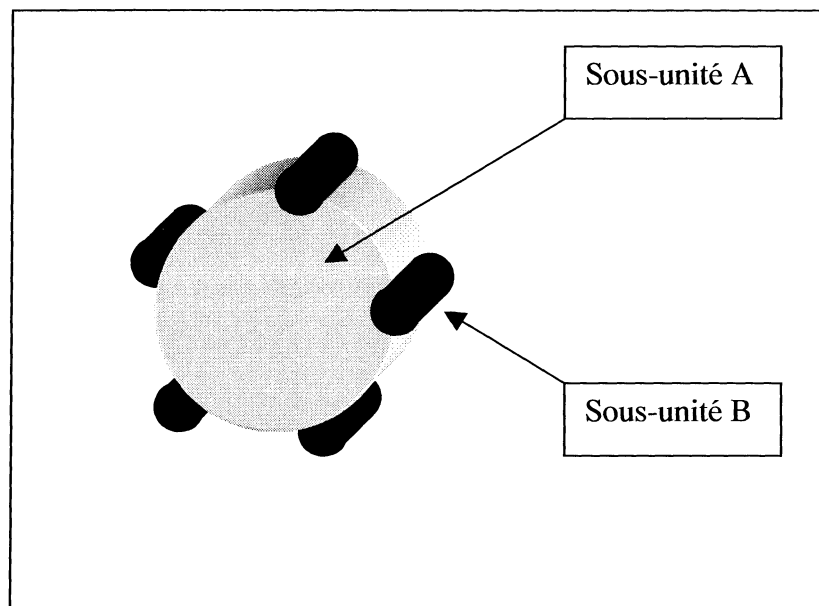


Figure 2 : structure schématique des verotoxines ; caractérisée par une structure pentamérique avec une sous-unité A (active) et 5 sous-unités B (binding).

Bien que différentes au plan immunologique et au niveau de leurs séquences d'acides aminés, elles sont analogues structurellement : VT1 comme VT2 et ses variants se composent d'une grosse sous-unité A (pour active) d'environ 33 kDa associée à 5 petites sous-unités B (pour binding : fixation) d'environ 7 kDa par des liaisons non covalentes (figure 2).

Cette sous-unité B est responsable de la fixation de la toxine à un récepteur présent sur les cellules

sensibles. Un glycolipide, le globotriosylcéramide ou Gb3 est le récepteur spécifique de VT1 et VT2, tandis que Gb4 est celui de VT2e. La présence ou l'absence de ce type de récepteur explique la réceptivité de lignées cellulaires ou d'organes. Par exemple, les cellules Vero possèdent les récepteurs Gb3 et Gb4 tandis que les cellules HeLa, elles, ne possèdent que les récepteurs Gb3. C'est ce qui explique que VT1 et VT2 sont toxiques à la fois pour les cellules Vero et HeLa tandis que VT2e ne l'est que pour les cellules Vero.

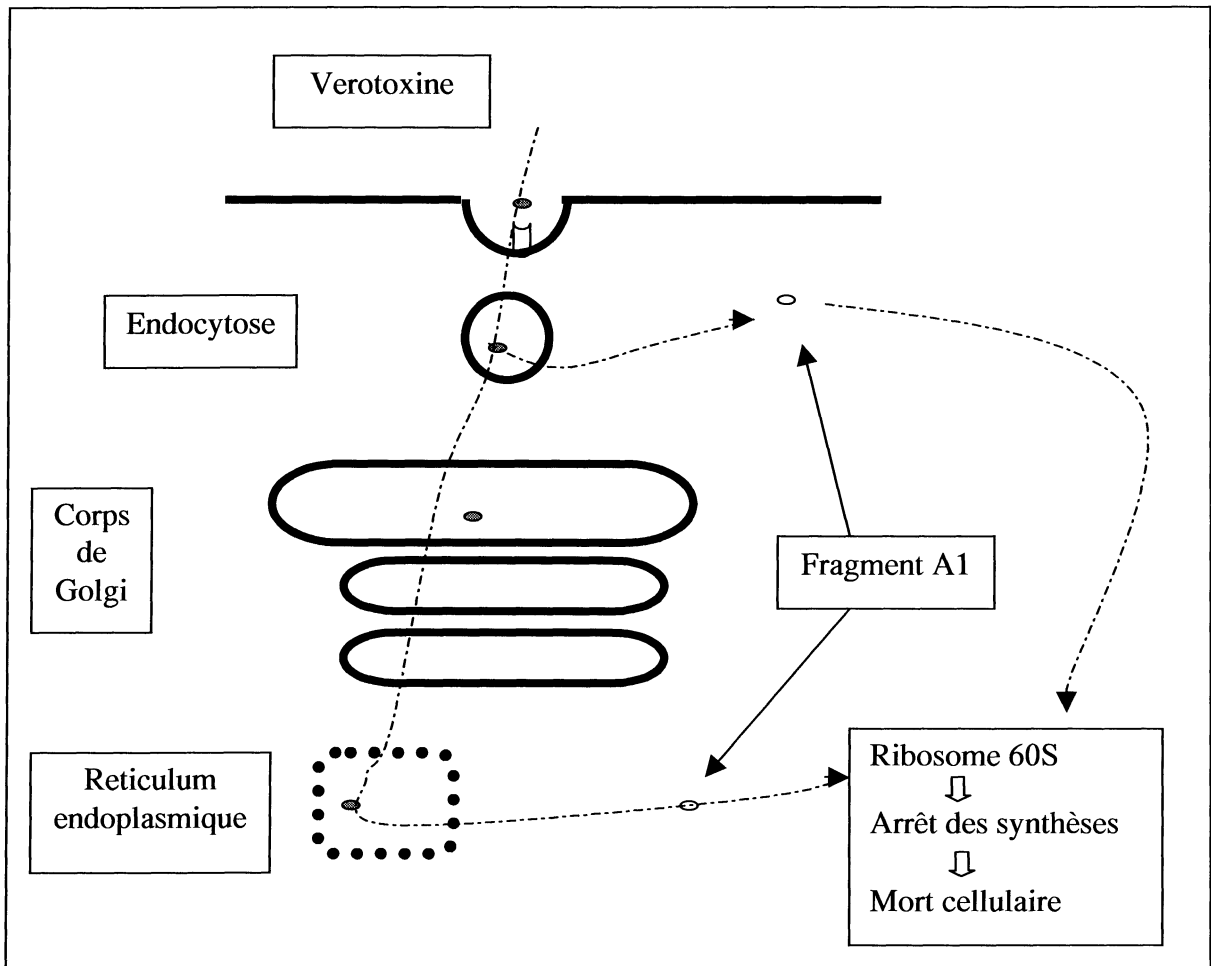


Figure 3 : les verotoxines dans la cellule ; devenir et conséquences

Une fois la fixation de la sous-unité B effectuée, la toxine est endocytée puis la sous-unité A est séparée des sous-unités B et clivée en un fragment A1 (figure 3). Ce clivage peut avoir lieu dans le phago-lysosome résultant de l'endocytose ou bien dans le réticulum endoplasmique.

Ce fragment A1, libéré dans le cytosol, agit comme une enzyme hydrolysant une liaison ribose-adénine de la molécule d'ARN ribosomal 28S. Cette modification induit un changement de

conformation du ribosome empêchant les synthèses protéiques et entraînant la mort de la cellule. Ce mode de toxicité cellulaire est proche de celui de poisons végétaux comme la ricine (51)(54).

1.1.2. déterminisme et expression génétique

Les gènes codant pour les vérotoxines sont regroupés en opérons avec deux séquences codant respectivement pour les sous unités A et B. Les *E. coli* verotoxinogènes peuvent posséder un ou deux opérons (47). Les opérons de VT1 et VT2 sont localisés sur des phages tempérés appartenant à de nombreux sérotypes (28)(39)(47). Les gènes codant pour VT1 sont similaires à ceux codant pour la toxine de *Shigella dysenteriae* tandis que l'opéron de VT2 ne partage que 57% de la séquence nucléotidique pour la sous-unité A et 60% pour la sous-unité B (28)(47).

La production de VT1 est inhibée par de fortes concentrations de fer ainsi que par une température basse (54).

1.1.3. action des verotoxines sur l'organisme

Les verotoxines sont excrétées dans la lumière du tube digestif et ensuite absorbées de la muqueuse vers la circulation sanguine probablement à travers les cellules épithéliales. Elles agissent directement sur les immunocytes de la sous-muqueuse qui déchargent des médiateurs de l'inflammation (IL1, TNF). Ceci entraînerait une augmentation de l'expression des récepteurs Gb3 et rendrait la barrière muqueuse plus perméable aux toxines (inflammation).

Quand la toxine est dans le flux sanguin, elle va se lier à ses récepteurs sur les cellules endothéliales et les immunocytes circulants. Il en résulte une destruction des cellules de l'endothélium vasculaire et une adhérence accrue des leucocytes à cet endothélium. Ceci conduit à l'initiation de la thrombose des petits et moyens vaisseaux sanguins. La toxicité est multipliée par la libération locale et systémique de médiateurs de l'inflammation (augmentation des phénomènes inflammatoires et de l'expression des récepteurs Gb3).

La thrombose et l'inflammation de la muqueuse induisent des saignements dans la lumière intestinale et donc la diarrhée hémorragique, ce qui amènerait des nutriments essentiels comme le fer à ces colibacilles pathogènes.

Enfin la toxine touche les organes où sont présents ses récepteurs tels le cerveau et les reins chez l'homme, le tube digestif et le cerveau chez le porc, en détruisant l'endothélium vasculaire et créant

des thromboses microangiopathiques comme au niveau intestinal (54).

1.2. Facteurs de virulence et caractères associés

1.2.1. entérohémolysine

L'entérohémolysine est une hémolysine active uniquement sur les hématies lavées. Chez l'homme comme chez les bovins, elle est codée par un plasmide appelé « EHEC virulence plasmid » chez l'homme (46)(81). Elle est considérée comme un facteur de virulence des colibacilles entérohémorragiques chez l'homme (50).

Chez les bovins, on observe une forte corrélation entre la production de verotoxines et la présence d'entérohémolysine (4)(5) et cette corrélation est encore plus forte avec VT1 : plus de 70% des souches VTEC1 testées présentent le phénotype entérohémolysine (80).

On peut donc se servir de cette propriété pour une détection rapide des VTEC et EHEC par ce marqueur et on peut distinguer le phénotype de l'entérohémolysine de celui de l' α -hémolysine dans des milieux de culture contenant des hématies de moutons lavées et du CaCl₂ : on observe une seule zone claire autour des colonies bactériennes produisant de l' α -hémolysine et deux zones distinctes avec l'entérohémolysine (une trouble autour des colonies, et une claire centrifuge).

1.2.2. facteurs induisant la lésion d'attachement-effacement

Les lésions d'attachement-effacement (A/E) sont provoquées par des colibacilles que l'on rencontre chez l'homme et les animaux. Les pathovars producteurs d'A/E sont les EPEC et les EHEC, ces derniers produisant des verotoxines (tableau 1)(50).

1.2.2.1. description de la lésion

La lésion A/E est caractérisée par la destruction de la bordure en brosse des entérocytes (effacement) ainsi que par une intime association de la bactérie avec la membrane cytoplasmique de l'entérocyte (attachement).

La destruction des microvillosités est due à une désorganisation du cytosquelette cellulaire. Cette modification du cytosquelette se caractérise par une polymérisation d'actine sous le site

d'attachement formant une sorte de piédestal sous la bactérie (69)(figure 4).

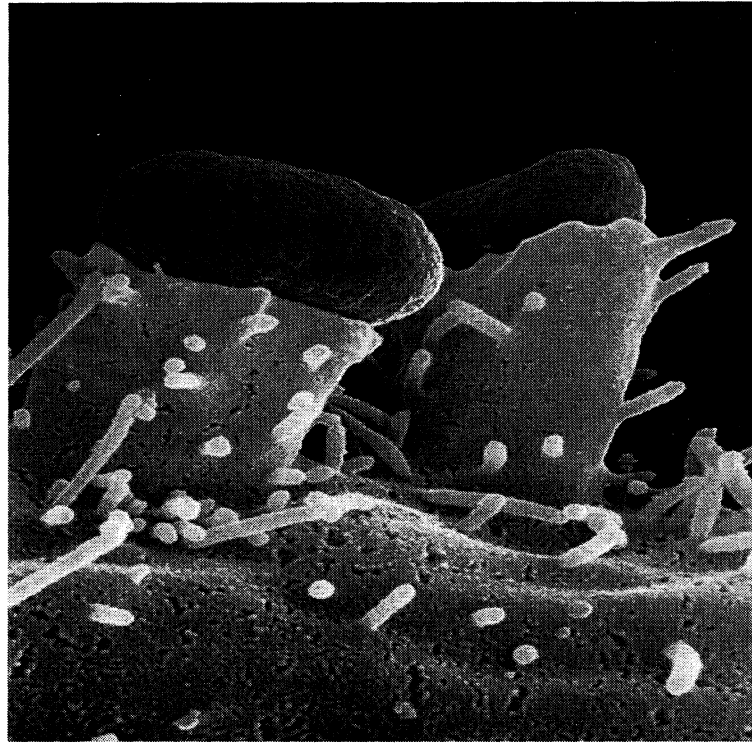


Figure 4 : La lésion d'attachement-effacement. On observe en microscopie électronique l'attachement intime des colibacilles avec les entérocytes et la formation du piédestal d'actine en-dessous de ceux-ci. (source J. Kaper)

1.2.2.2. mécanisme d'action et déterminisme génétique

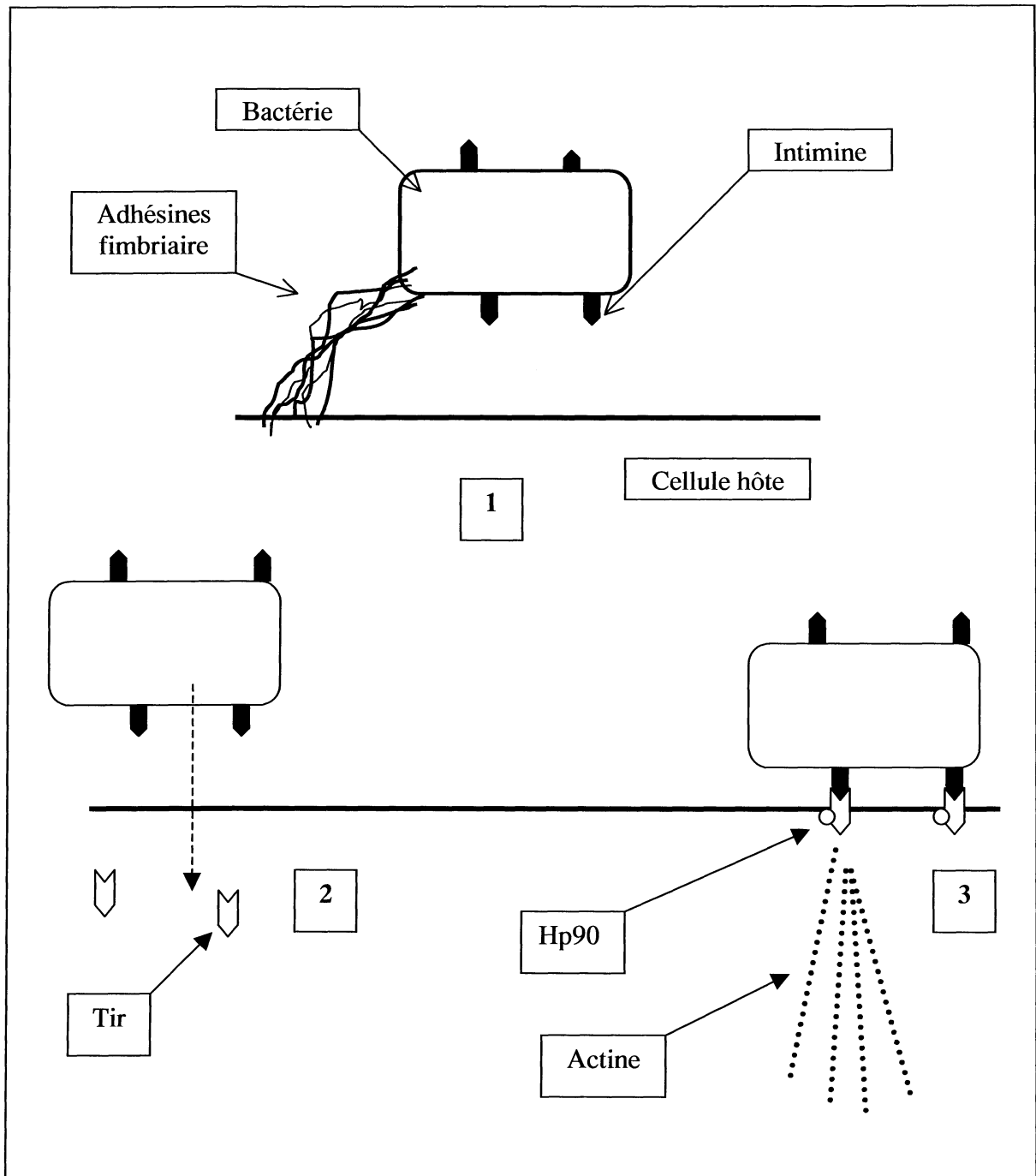


Figure 5 : genèse de la lésion d'attachement-effacement

Il y a tout d'abord une phase d'adhérence lâche à l'entérocyte (cf 1 figure 5) par des adhésines fimbriaires (50). Ensuite, intervient l'intimine, une protéine de membrane de 94 à 97 kDa. Plusieurs variants ou types différents d'intimines sont connus (59). Elle est responsable de l'étroite association entre la cellule et la bactérie, en interaction avec son récepteur Tir (Translocated intimin receptor). Tir est transporté par un système de sécrétion de type 3 de la bactérie vers la cellule hôte (cf 2 figure 5) où il est phosphorylé puis transporté vers la membrane cellulaire pour former la Hp

90 (Host protein 90 kDa). En quelque sorte, la bactérie fabrique et intègre à la cellule hôte son propre récepteur. Le complexe intimine/Hp 90 ainsi formé va induire des signaux cellulaires modifiant l'organisation du cytosquelette (cf 3 figure 5) et entraînant les lésions observées (50).

La diarrhée ne serait pas induite par la lésion d'attachement-effacement proprement dite, mais liée à des échanges hydriques consécutifs aux modifications des concentrations ioniques intracellulaires (notamment le calcium) entraînées par les signaux émis à partir du complexe Hp 90 / intimine (50). Si l'intimine est nécessaire à la création des lésions, elle n'est pas suffisante (43)(57).

L'intimine est codée par le gène *eae*, situé sur la région centrale d'un îlot de pathogénicité appelé locus LEE (Locus of Enterocyte Effacement). La moitié 5' du gène *eae* étant hautement conservée, on peut l'identifier sûrement par PCR (59)(43).

1.2.2.3. association de la lésion d'attachement-effacement avec les VTEC

La présence du gène *eae* chez les VTEC d'origine bovine apparaît très variable. Si, dans certaines études, le pourcentage des VTEC positifs pour *eae* dépasse les 50%, (56)(13)(36)(57) dans d'autres, il est beaucoup plus faible (87)(56). Il semble qu'il y ait une plus forte association entre VT1 et *eae* (36)(56).

1.2.2.4. importance de la lésion d'attachement-effacement en pathologie

Les VTEC qui présentent le gène *eae* et donc la possibilité de créer les lésions d'attachement-effacement (des EHEC potentiels) sont apparemment plus virulents que les *eae* négatifs chez le veau (71).

Dans des fermes de Belgique les *eae* positifs sont présents massivement dans des élevages ayant des problèmes récurrents de diarrhée. De plus, chez les colibacilles attachant-effaçant, la présence de vérotoxines associées apparaît comme un facteur aggravant de la diarrhée (23).

Tout ceci souligne l'importance que pourrait avoir l'association VT-lésion d'attachement-effacement dans la pathologie diarrhéique du veau.

1.3. Intérêt en médecine vétérinaire

Homme	-diarrhées simples -diarrhées hémorragiques -syndrome hémolytique urémique (SHU)	
Animaux	Porcins	-maladie de l'œdème
	Bovins	-portage asymptomatique -diarrhée

Tableau 3 : pathologies associées aux VTEC/EHEC chez l'homme et les animaux

1.3.1. la maladie de l'œdème du porc comme modèle pathogénique des verotoxines

C'est chez les porcins que la pathogénicité des verotoxines est le mieux établie, les VTEC porcines ne causent pas de lésions d'attachement-effacement et produisent une verotoxine de la famille VT2, VT2e qui leur est spécifique (28).

La maladie de l'œdème est un syndrome aigu touchant les porcelets âgés d'un à trois mois. Elle se caractérise par son aspect aigu, des troubles nerveux (incoordination), un œdème gastrique important (sous-muqueuse) ainsi qu'au niveau des méésentères et du côlon. Cette pathologie intervient chez des porcs sevrés à la suite de changements alimentaires brutaux. Une diarrhée sévère est parfois observée en fin d'évolution (20).

Après colonisation de l'intestin des porcelets grâce à F18, une adhésine fimbriaire codée par des gènes situés sur un plasmide où peuvent se trouver conjointement des gènes codants pour une α -hémolysine et/ou des entérotoxines, la toxine VT2e arrive dans le sang et est transportée vers sa cible Gb4, présente dans l'endothélium des artères des tissus atteints (cerveau et tube digestif).

Seulement 4 sérotypes sont impliqués dans la majorité des épidémies de maladie de l'œdème (O45 :K+, O138 :K81, O139 :K82 et O141 :K-) et ces VTEC porcines ne sont jamais impliqués en pathologie humaine. D'autre part les EHEC humaines ne sont pratiquement jamais retrouvés dans les fèces de porcs, ce qui amène à penser que les suidés ne sont pas une source de contamination pour les hommes (47). Cependant la maladie de l'œdème du porc, facilement reproductible par injection de verotoxine ou ingestion de VTEC, est un modèle d'étude pour le SHU humain.

1.3.2. verotoxines et diarrhée du veau

Le rôle joué par les verotoxines dans les diarrhées des jeunes bovins est aujourd'hui controversé, en effet selon une étude récente, les tissus cibles du veau nouveau-né ne contiendraient pas de récepteurs Gb3 (64), présents dans les organes humains et porcins (Gb4). Est-ce que les veaux, dans des conditions précises ou à des périodes données expriment ces récepteurs ou bien existe-t-il d'autres mécanismes de pathogénicité (54) ? D'autres toxines comme EAST1, produite par les *E. coli* entéroaggrégatifs et dont le rôle est mal connu, interviennent-elles (47) ? Toujours est-il qu'il existe des présomptions sur l'implication des verotoxines dans le syndrome diarrhée du veau autant au niveau expérimental qu'épidémiologique.

1.3.2.1. arguments expérimentaux

On arrive à reproduire des symptômes diarrhéiques par l'infection expérimentale de veaux nouveau-nés, gnotoxéniques ou conventionnels. Les essais publiés ne concernent que des souches VTEC possédant les gènes d'attachement-effacement, donc des EHEC potentiels. Ces veaux sont inoculés par voie orale et peuvent présenter dans un délai variant de 18 à 72 heures, des diarrhées muqueuses ou dysentériques pour les plus atteints. On retrouve des lésions d'attachement-effacement dans pratiquement tous les cas. Chez les veaux les plus atteints, on observe des lésions d'entérite et/ou de colite et des réactions inflammatoires importantes (29)(46)(40)(27)(75).

1.3.2.2. arguments épidémiologiques

On rencontre des souches VTEC dans les fèces de veaux diarrhéiques ou sains. Les diarrhéiques excrètent dans 10 à 20% des cas selon les études (13)(12)(56)(11) et la fréquence de ces souches VTEC varie de 5 à 20% (13)(58)(82)(56), alors que chez les veaux sains les VTEC sont présentes dans 20 à 40% des cas et elles représentent de 10 à 40% des souches analysées. Les cas témoins comparant des veaux diarrhéiques et témoins reprennent les mêmes observations : les VTEC sont plus souvent retrouvées chez les veaux sains que chez les sujets malades (13)(12)(82). Ceci suggérerait que les VTEC ne sont pas pathogènes ou bien qu'un fort portage asymptomatique existe.

Cependant dans certaines études, il ressort que les souches produisant VT1 et possédant le gène *eae* sont en proportion beaucoup plus importante ou majoritaires chez les veaux diarrhéiques (82)(36)(9). En comparaison, les bovins sains, eux, excréteraient essentiellement des souches VT2 ou VT1-VT2 (9)(10). Mais des enquêtes plus récentes montreraient la prédominance de

souches VT1 sur les VT2 et VT1-VT2 chez des bovins sains (57), et il est donc difficile de conclure.

1.3.2.3. présomptions cliniques associées aux VTEC

Les VTEC sont associés avec des diarrhées chez les veaux âgés de 1 à 8 semaines avec un pic entre 4 et 5 semaines, mais des cas de veaux nouveau-nés ou plus âgés ont été rapportés.

Les symptômes sont souvent mal documentés, le syndrome diarrhée englobant des pathologies d'expression différente. Cependant, dans les cas les plus évocateurs, on observe une diarrhée mucoïde, quelquefois hémorragique. Elle ne semble pas souvent mortelle mais récurrente, causant des retards de croissance importants.

Les lésions observées sont le plus souvent localisées au niveau du gros intestin.

Dans les cas sévères, d'autres agents étiologiques de diarrhée sont aussi observés : cryptosporidies, rotavirus, coronavirus, coccidies ainsi que les colibacilles entérotoxigènes.

Les complications systémiques décrites chez l'homme et le porc (symptômes rénaux et cérébraux) n'ont pas été décrites chez le veau (47)(73).

1.3.2.4. diagnostic de laboratoire

Les verotoxines peuvent être détectées dans les surnageants de culture ou directement dans des prélèvements tels les fèces. Lors de cultures bactériennes, des quantités plus importantes de toxines peuvent être obtenues en lysant les corps bactériens (congélation – décongélation et sonication dans notre cas).

La mise en évidence des verotoxines peut faire appel à des tests cellulaires sur cellules Vero ou HeLa associés à un typage par séroneutralisation. Des méthodes immunologiques comme les tests ELISA sont aussi utilisées.

Les gènes *vt* correspondants sont mis en évidence par des méthodes génétiques : techniques d'hybridation avec sondes nucléotidiques et PCR, qui apparaît très sensible et spécifique pour caractériser un isolat bactérien (47).

1.3.3. autres animaux

Les VTEC sont présentes dans les selles de divers animaux domestiques. Les ovins et les caprins sont ceux chez qui elles sont retrouvées dans les plus grandes proportions (supérieures à 50%), ce qui en fait un réservoir naturel (3). Les carnivores domestiques semblent excréter aussi mais de façon moindre (3). Les oiseaux abritent aussi des souches verotoxinogènes : les pigeons (52), les mouettes (48). Cependant nos connaissances sont limitées quant à leur rôle pathogène potentiel chez ces espèces.

1.4. Rôle en pathologie humaine et conséquences sur la santé publique

La pathologie humaine associée est marquée par la prépondérance de certains sérotypes épidémiologiquement dominants dans le pathovar entérohémorragique (ou EHEC). Aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne, le sérotype majeur impliqué est O157 : H7, qui présente la propriété originale de ne pas fermenter le sorbitol, ce que l'on peut utiliser comme méthode de détection rapide, et il est associé à des épidémies massives de toxi-infections alimentaires (38)(2). Dans les autres pays européens et la France en particulier, O157 : H7 est moins prédominant et des EHEC d'autre sérogroupes sont décrits tels O26, O111, O103 ou O118 lors d'infections sporadiques de moindre importance. Cela pourrait s'expliquer par les différences d'habitudes alimentaires entre les divers pays (maladies des hamburgers aux Etats-unis)(29)(38)(49)(17).

1.4.1. pathologies associées aux EHEC

Chez l'homme les EHEC induisent des manifestations cliniques variées : on peut observer un portage asymptomatique, mais ils peuvent aussi provoquer des diarrhées simples, des colites hémorragiques, ainsi que le grave syndrome hémolytique et urémique (SHU). Il peut y avoir des formes épidémiques ou sporadiques.

La colite hémorragique est accompagnée de sévères crampes abdominales, des selles sanglantes, des vomissements dans la moitié des cas, et n'est pas ou peu fébrile. Elle peut évoluer vers la guérison ou précéder le SHU (38).

Le SHU est associé à 9% des infections humaines à VTEC et leur létalité atteint de 3 à 5%.

Ce syndrome est caractérisé par une triade clinique comprenant une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë (41). Des signes

neurologiques peuvent aussi être présents. Le SHU touche principalement les enfants en bas âge et c'est chez eux la première cause d'insuffisance rénale aiguë, mais on retrouve cette pathologie chez les adultes en relation avec la grossesse, la période post-partum, la prise de contraceptifs oraux et les causes d'immunodépression (15).

1.4.2. les bovins sources de contamination

On peut observer des contaminations inter-humaines, mais dans l'immense majorité des cas la source d'infection est la nourriture et les produits d'origine bovine en particulier. La viande de bœuf hachée peu cuite est ainsi le produit « phare » de contamination aux Etats-Unis, mais de la viande grillée, des produits à base de lait frais, des sandwichs, du cidre non pasteurisé, des légumes et l'eau ont été aussi impliqués (38). On peut signaler l'existence de contaminations directes entre bovins et humains (65).

On retrouve chez les bovins des EHEC potentiels en des proportions très variables selon les régions du monde où on les recherche. Des souches O157 : H7 sont isolées chez 16% des bovins dans une enquête en Grande-Bretagne (29), 13% des bovins dans une autre enquête dans des abattoirs en Italie (14). Dans une autre étude près de 20% des VTEC isolés dans des fèces de bovins sains sont potentiellement des EHEC (26). A contrario lors d'une étude effectuée en Belgique, seules 1% des souches étudiées étaient O157 (63).

Parmi les sources d'EHEC analysées, ce sont les veaux qui semblent les excréteurs les plus fréquents (79)(9). Il y a une augmentation du taux d'excrétion au cours de la vie du veau (26) (58), qui atteint son maximum aux alentours du sevrage (25)(26).

2. LES COLIBACILLES PRODUCTEURS DE TOXINES CNF OU NTEC

L'existence de toxines CNF (Cytotoxic Necrotizing Factors) a été découverte dans les années 80 par Caprioli (18) dans des extraits soniqués de souches d'*E. coli* issues de nourrissons atteints de diarrhée. La toxine mise en évidence induisait la formation de cellules géantes multinucléées en culture cellulaire Vero et HeLa et, après injection intradermique chez le lapin, une lésion de nécrose. Aujourd'hui on distingue au moins deux types différents de toxines baptisés CNF1 et CNF2. Elles sont associées à diverses pathologies intestinales et extra-intestinales autant chez l'homme que chez certains animaux.

Les colibacilles producteurs de CNF seront appelés NTEC (pour Necro Toxigenic E. coli), ceux produisant CNF1 sont des NTEC1 et ceux produisant CNF2 sont des NTEC2.

2.1. Les toxines CNF ou cytotoxic necrotizing factor

	CNF1	CNF2
Toxicité - activité cytopathique sur cellules Hela - test cutané du lapin - test sous-cutané plantaire de la souris - test des anses ligaturées de lapin	- cellules géantes multinucléées (arrondies) - nécrose modérée - inflammation sans nécrose - pas d'activité	- cellules géantes multinucléées (allongées) - nécrose intense - inflammation avec nécrose - faible activité
Séroneutralisation	- légère séroneutralisation croisée	
Poids moléculaire	115 kDa	110 kDa
Déterminisme génétique	- chromosome	- plasmide Vir

Tableau 4 : caractéristiques des toxines CNF

2.1.1 propriétés (tableau 4)(28)(33)(39)

2.1.1.1. biologiques

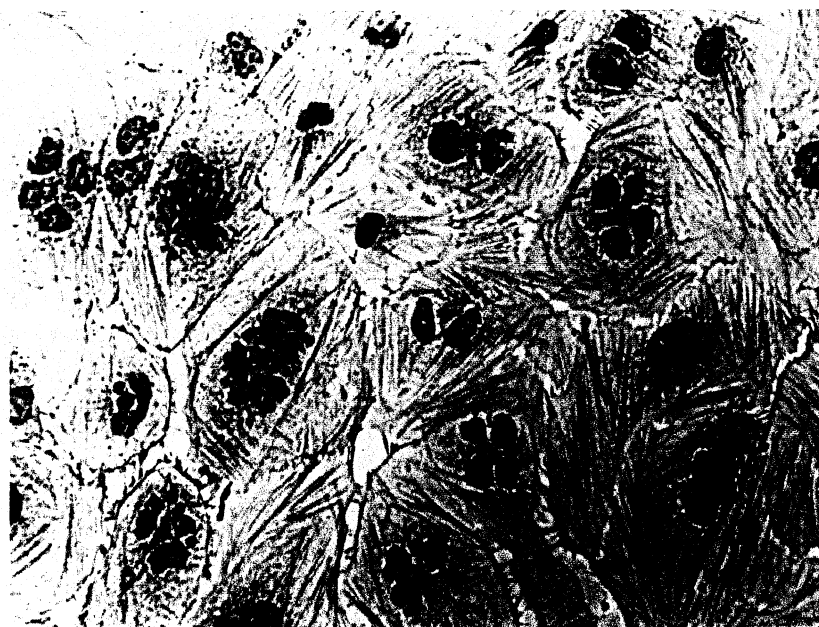


Figure 7 : Effet cytopathique des toxines CNF. On observe des cellules géantes avec plusieurs noyaux (2 ou 4 ici) et un remaniement intense de fibres d'actine.

CNF1 et CNF2 induisent toutes les deux une multinucléation des cellules HeLa en culture (figure 6), cependant CNF1 produit des cellules géantes arrondies tandis qu'avec CNF2 les cellules sont plus allongées. De même, si elles conduisent à la nécrose après injection intradermique chez le lapin, celle-ci est intense pour CNF2 et modérée pour CNF1. Les deux types sont létaux pour la souris. CNF2 induit une faible accumulation de fluide en anse intestinale ligaturée de lapin.

2.1.1.2. moléculaires et immunologiques

CNF1 et CNF2 sont des protéines monomériques d'un poids moléculaire de 115 kDa pour CNF1 et 110 kDa pour CNF2. CNF1 et CNF2 ont une parenté immunologique : une faible séroneutralisation croisée est observée.

2.1.2. déterminisme génétique

Le gène responsable de la synthèse de CNF1 est localisé sur le chromosome et proche de l'opéron hémolysine ce qui est à rapprocher du fait que la majorité des souches CNF1+ produisent de l' α -hémolysine (près de 90%). La recherche du caractère α -hémolytique peut donc permettre d'orienter les recherches des souches NTEC1. Le gène codant pour CNF2, lui, est situé sur le plasmide Vir (33).

2.1.3. mécanisme d'action (figure 8)

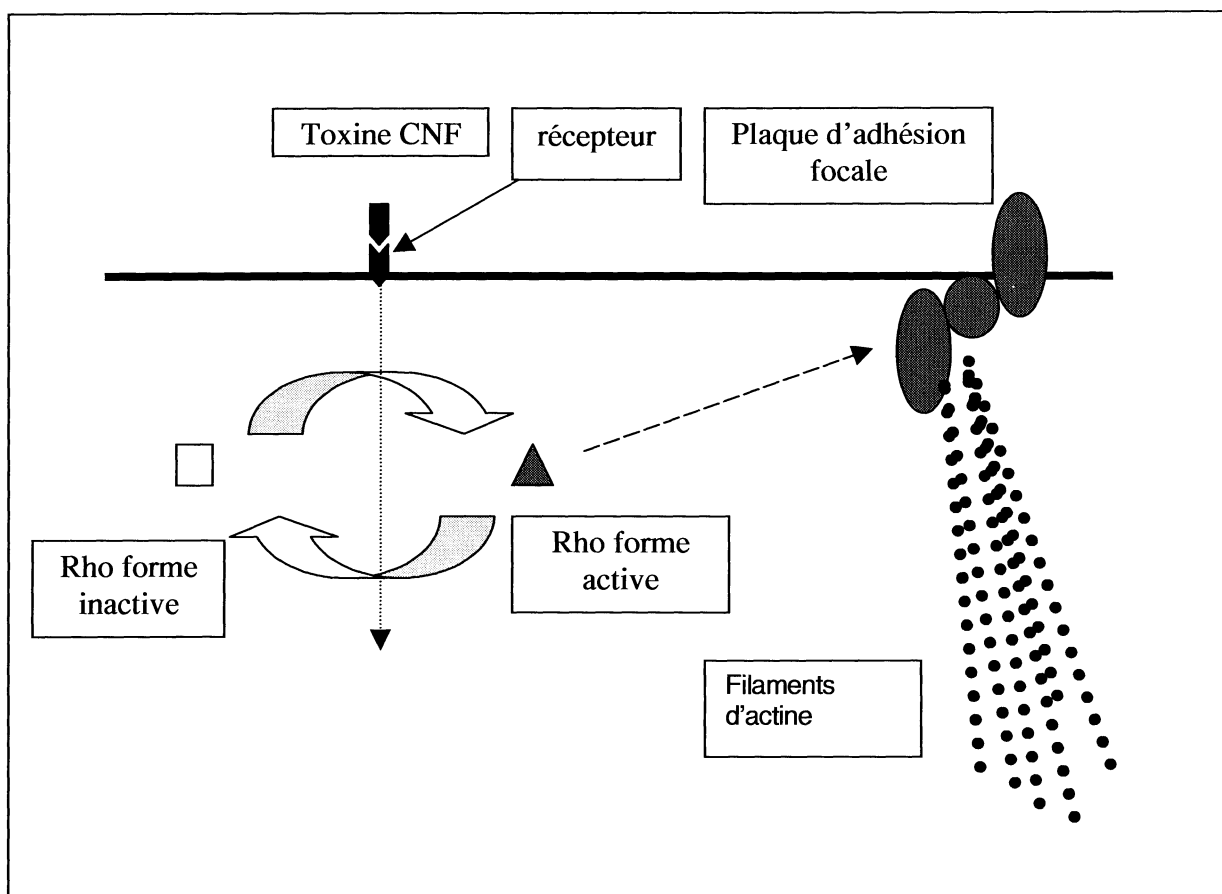


Figure 8 : action de CNF sur le cytosquelette

Les toxines CNF modifient irréversiblement une petite protéine G de 21 kDa appelée Rho qui joue un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette des cellules eucaryotes et donc leur division (figure 8). Cette altération provoque une hyperpolymérisation des filaments d'actine du cytosquelette entraînant le blocage de la motilité cellulaire et de la cytokinèse, on observe alors des cellules géantes multinucléées. De plus, il a été montré que ce phénomène pourrait permettre l'entrée de bactéries normalement non invasives dans les cellules épithéliales de l'hôte et expliquer l'aptitude septicémique des NTEC (33).

2.2. Facteurs de virulence associés

2.2.1. aux NTEC1

CNF1 est associé d'une manière quasi constante à une alpha-hémolysine et très souvent à une adhésine fimbriaire de type P (29). En effet, les gènes codants pour l'alpha-hémolysine et les

fimbriae de type P sont regroupés sur ce que l'on appelle un îlot de pathogénicité (regroupement de gènes sur une même portion de chromosome)(33).

2.2.2. aux NTEC2

CNF2 est codé par le plasmide Vir et deux facteurs de virulence lui sont aussi associés : une adhésine fimbriaire appelée F17b qui permet une adhésion spécifique aux entérocytes de veau dans environ 50% des cas (les fimbriae de la famille F17 ont été isolés d'animaux et d'humains atteints de diarrhée et/ou de septicémie). Un nouveau type d'adhésine non fimbriaire appelée Afa 8 est aussi lié aux NTEC2 (33)(29).

2.2.3. les toxines CDT(30)

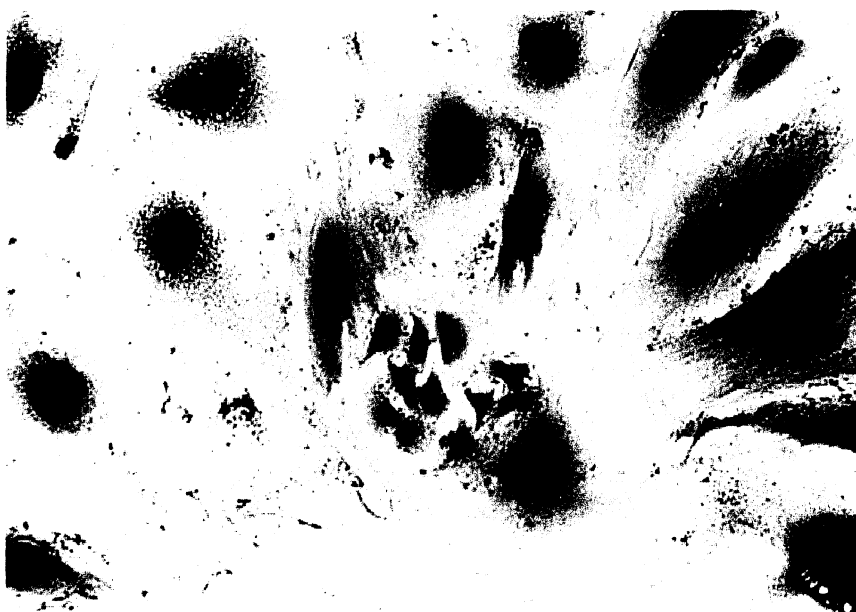


Figure 9 : Effet cytopathique des toxines CDT. On observe au centre des cellules de taille normale et en périphérie des cellules géantes mononucléées suite à l'interaction avec CDT.

Les toxines CDT (pour cytolethal distending toxin) ont été découvertes à la fin des années 80 dans des surnageants de culture d'*Escherichia coli* et de *Campylobacter* et caractérisées par leur effet sur les cultures cellulaires telles que CHO, Vero, HeLa et Hep 2 : elles induisent la formation de cellules géantes mononucléées (figure 8) puis celles-ci meurent après quelques jours d'incubation ce qui les distingue des « cytotoxines vraies » qui ont un effet létal plus précoce et rapide. Il a été démontré que les cellules exposées à la toxine étaient bloquées au stade pré-mitotique G2 du cycle cellulaire, ce blocage induisant une mort cellulaire progressive (30).

Les CDT ont été détectées chez de nombreuses bactéries gram négatives potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux : *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter*, *Actinobacillus*, *Haemophilus ducreyi*. Chez *E. coli*, trois différents types de CDT ont été décrits.

L'activité des toxines CDT est codée par un opéron de trois gènes appelés *cdt A*, *cdt B* et *cdt C* et leur expression est nécessaire pour l'apparition de l'activité toxique.

CDT B possède des motifs présentant une homologie lointaine avec des DNase (enzymes clivant les molécules d'ADN) bactériennes et mammaliennes ; ceci suggère que les toxines CDT altéreraient l'ADN, d'une façon inconnue pour le moment.

Le pouvoir pathogène des toxines CDT a surtout été étudié chez la souris : on a pu ainsi reproduire des diarrhées chez des souris après ingestion de CDT de *S. dysenteriae* et une autre étude montre que CDT pourrait contribuer au pouvoir invasif des souches bactériennes qui la produisent.

Le pouvoir pathogène des CDT pourrait s'expliquer par son effet antiprolifératif sur les cellules épithéliales s'il s'exprime *in vivo* : l'absence de renouvellement cellulaire pourrait prolonger la phase de colonisation bactérienne et créer des lésions épithéliales facilitant l'invasion bactérienne. De plus, les modifications cellulaires induites par la toxine pourraient modifier la distribution de récepteurs cellulaires et ainsi permettre l'adhésion et la pénétration bactérienne (30).

Comme nous l'avons noté plus haut, on distingue trois CDT différentes chez *E. coli*, et l'une d'entre elles, CDT3, nous intéresse plus particulièrement. En effet, CDT3 est associée systématiquement à CNF2. De plus, près de 75% des souches produisant CNF1 induisent le blocage en phase G2 des cellules HeLa avec lesquelles elles sont mises en interaction (ce qui suggère une nouvelle toxine CDT, différente des trois premières)(33). Certains auteurs explorent la possibilité d'effets synergiques entre les toxines CNF et CDT lors d'interaction avec la cellule (30). Une telle synergie pourrait expliquer l'association génétique des deux toxines chez les souches NTEC.

2.3. Rôle des NTEC dans la pathologie : arguments épidémiologiques

		NTEC1	NTEC2
Pathologie humaine		-pathologies extra-intestinales (infections urinaires) -diarrhées néonatales	
Pathologie animale	Porcins	-entérites nécrotiques + septicémies	
	Bovins	-entérites mucoïdes + septicémies -colites hémorragiques	-entérites mucoïdes + septicémies -entérites hémorragiques

Tableau 5 : pathologies associées aux NTEC chez l'homme et les animaux

2.3.1. NTEC1

Les NTEC1 sont rencontrées chez de nombreuses espèces d'animaux et chez l'homme.

2.3.1.1. porcs

On trouve des NTEC1 assez fréquemment dans les fèces de porcs et elles ont été associées à des pathologies diarrhéiques comme par exemple des entérites nécrotiques. Ces colibacilles semblent aussi avoir une prédilection pour les poumons où ils induisent des pneumonies interstitielles (33).

Il est intéressant de remarquer que les sérotypes impliqués sont souvent les mêmes que ceux impliqués dans les pathologies humaines (33). Des comparaisons effectuées entre les souches humaines et porcines montrent que certaines partagent les mêmes propriétés et ont des facteurs de virulence communs, suggérant une infection croisée possible (45).

2.3.1.2. bovins

Les NTEC1 sont rarement détectées chez les bovins, jeunes ou adultes, contrairement aux NTEC2 (8), et ont été associées à des diarrhées chez les veaux (76), notamment des entérites mucoïdes avec forte atteinte de l'état général (32).

Une épidémie d'affection septicémique avec purpura hémorragique chez de jeunes bovins a été aussi décrite (33)(62).

Une souche NTEC1 a été présumée responsable de trois cas groupés de colites hémorragiques mortelles chez des génisses de 14 mois (84).

Les colibacilles producteurs de toxine CNF1 paraissent donc être pathogènes chez les bovins.

2.3.1.3. autres animaux

Des souches NTEC1 ont été décrites lors d'épidémies d'entérites létales sur des poulains de 2 mois et chez des lapins (33). Elles ont aussi été impliquées chez les carnivores domestiques dans des affections digestives, septicémiques (62) et urinaires (86). De plus, les carnivores excréteraient des NTEC1 potentiellement virulents pour l'homme et ceci de manière massive chez la chat (86).

2.3.1.4. pathologie humaine

Chez l'homme les NTEC1 sont principalement responsables de pathologies extra-intestinales et plus particulièrement d'infections urinaires (33) : cystites, pyélonéphrites et prostatites. Le rôle de la toxine, dans l'inflammation observée et la capacité de la bactérie à résister aux neutrophiles, est établi (66)(67).

De plus, des observations cliniques de diarrhées néonatales laissent à penser que les NTEC1 ont un pouvoir pathogène sur le tube digestif des jeunes enfants au moins (33).

2.3.2. NTEC2

Les NTEC2 sont isolés uniquement chez les ruminants et ceci dans des proportions importantes chez les bovins et les ovins (33). En effet, on les retrouve dans les fèces de veaux et de bovins adultes sains, mais de façon beaucoup plus importante chez les jeunes que chez les adultes : selon certaines études plus de 50% des veaux excréteraient des NTEC2 et l'immense majorité des exploitations serait concernée (8). Les veaux diarrhéiques, eux présentent un taux d'excrétion moindre que les bovins sains (76)(55).

Ces éléments pourraient laisser à penser que les NTEC2 ne sont pas pathogènes pour les veaux, mais plutôt des commensaux bien adaptés au tube digestif des bovins. Ils pourraient cependant avoir un rôle dans de sévères entérites hémorragiques (33).

2.4. Rôle dans la pathologie : arguments expérimentaux

2.4.1. NTEC1

Lors d'inoculation par voie intraveineuse de toxine purifiée chez des agneaux, on observe des signes de diarrhée mucoïde avec des douleurs abdominales sévères accompagnées de faiblesse du train arrière, ainsi que de signes neurologiques (ataxie, convulsions, tourner en rond) (34).

Lorsque l'on infecte par voie orale des porcelets avec des souches produisant la toxine CNF1, ceux-ci présentent des signes de diarrhée sanglante avec entérite et une bactériémie conduisant à des localisations dans de nombreux organes (poumons, foie, cœur, cerveau ...) (85).

2.4.2. NTEC2

Chez les veaux nouveaux-nés colostroprives inoculés oralement par des souches produisant la toxine CNF2, on retrouve une diarrhée persistante avec une forte inflammation du tube digestif et une importante réaction des nœuds lymphatiques mésentériques. Une bactériémie est aussi observée avec une atteinte des poumons (dans 80% des cas) et du foie (dans 20% des cas) (77)(78).

Donc chez le veau, dans ce modèle expérimental, les souches CNF2 sont capables de provoquer une diarrhée, d'envahir la circulation et de coloniser de nombreux organes, notamment le poumon.

2.5. Diagnostic

2.5.1. suspicions clinique associées

Les infections causées par les NTEC chez le veau peuvent être regroupées en deux entités principales : une entérite mucoïde avec un abattement marqué, d'une part, et une colite hémorragique, d'autre part . Ceci peut s'accompagner d'affection de type septicémiques intéressant plusieurs organes dont le poumon qui semble être une cible privilégiée. L'âge des veaux concernés apparaît très variable, d'une semaine à quelques mois (73).

2.5.2. diagnostic de laboratoire

La détection des souches NTEC fait appel à des tests de cytotoxicité sur cultures cellulaires HeLa ou Vero avec typage de la toxine 1 ou 2 par séroneutralisation.

On peut aussi identifier les gènes responsables de la synthèse des toxines par hybridation moléculaire par des sondes spécifiques et en particulier par PCR (73).

	<i>VTEC / EHEC</i>	<i>NTEC</i>
Age des veaux concernés	- 1 à 8 semaines	- 1 semaine à quelques mois
Signes cliniques	-entérites mucoïdes à hémorragiques	- entérites mucoïdes + septicémies - colites et entérites hémorragiques

Tableau 6 : pathologie du veau et colibacilles producteurs de cytotoxines.

Les colibacilles producteurs de cytotoxines apparaissent donc comme des pathogènes (tableau 6). Les cytotoxines qu'ils produisent ont un haut pouvoir toxique pour les cellules en culture, et les inoculations expérimentales chez divers modèles animaux confirment leur pouvoir pathogène voire létal.

Les VTEC sont des pathogènes avérés chez l'homme (HUS) et le porc (maladie de l'œdème). Les NTEC, eux, sont impliqués dans les infections du tractus urinaire de l'homme, et peut-être dans certaines diarrhées du nourrisson. Mais qu'en est-il chez le veau ? Les inoculations expérimentales de veaux mettent en évidence un pouvoir diarrhéogène tant des VTEC/EHEC des NTEC, et des relations épidémiologiques semblent exister (tableau 6), mais sur le terrain des questions persistent, ces colibacilles peuvent-ils causer des diarrhées chez de jeunes bovins ?

2° PARTIE : Etude expérimentale

1. MATERIEL ET METHODES

Le but de l'enquête étiologique est de déterminer si des colibacilles producteurs de verotoxines sont présents chez les veaux dans la région Bourgogne et s'ils semblent avoir une incidence sur les diarrhées. On compare pour cela des veaux malades à des veaux sans pathologie afin de déterminer si une différence entre les deux groupes est observée. On pourra aussi ainsi évaluer le risque de contamination humaine par les *E. coli* entérohémorragiques. Enfin, en utilisant plusieurs méthodes de diagnostic, il sera possible de les confronter à la méthode de référence (PCR).

L'enquête a été commandée et coordonnée par les Groupements Techniques Vétérinaires de Bourgogne et les analyses ont été effectuées dans l'UMR 960 INRA-ENVIT de microbiologie moléculaire.

1.1. Les animaux

Ce sont de veaux sains et diarrhéiques originaires de différents élevages de Bourgogne sélectionnés par des vétérinaires praticiens. Les veaux choisis sont âgés de 0 à 30 jours. Ils sont issus d'élevages pour la plupart allaitants. Malades et témoins sont issus des mêmes élevages, sélectionnés dans les mêmes classes d'âge. Dans ces élevages le taux de veaux présentant une diarrhée est élevé mais la mortalité est faible. La sévérité des symptômes associés à la diarrhée est très variable : il peut ne pas y avoir de retentissement sur l'état général comme des répercussions graves. La diarrhée qu'ils présentent n'est pas uniforme : elle peut être aqueuse, séreuse, mucoïde, montrer des traces hémorragiques

Il est important de signaler que les veaux dont les fèces présentaient des ETEC F5, des rotavirus, des coronavirus, des cryptosporidies ont été exclus de l'enquête étiologique.

1.2. Les souches bactériennes

Sur chaque veau ont été sélectionnées 5 souches (3 veaux, 2 témoins et 1 malade ne présentent que 4 souches) et ceci sur 26 veaux malades et 17 veaux témoins soit un total de 43 animaux et donc 212 souches d'*Escherichia coli* : 129 issues de malades et 83 de veaux sains prélevés dans les mêmes élevages que les veaux diarrhéiques. Les isolats ont été cultivés sur pente de gélose à l'œuf et conditionnés ainsi pour le transport.

Pour valider les méthodes de diagnostic utilisées, on se sert de souches témoins connues et référencées pour leur capacité à produire les cytotoxines recherchées (tableau 7).

Souche témoin	Propriétés	Usage
DH5 α	Témoin négatif	PCR multiplex 1 et 2
933 EDL	Témoin VT1 / VT2 / eaeA	PCR multiplex 1
1404	Témoin CNF / CDT	PCR multiplex 2
H 30	Témoin VT1	Lysats congelés-décongelés Sonicats
C 600 333	Témoin VT2	Lysats congelés-décongelés Sonicats
C 600 PEB1	Témoin VT2 / entérohémolysine	Détection des hémolysines
BM 2-1	Témoin CNF1 / α -hémolysine	Lysats congelés-décongelés Sonicats Détection des hémolysines
B 26 a	Témoin CNF2	Lysats congelés-décongelés Sonicats
1404 N Term	Témoin CDT	Sonicats

Tableau 7 : souches témoins utilisées dans notre étude

1.3. Les cultures cellulaires

Les souches cellulaires choisies sont les cellules HeLa car elles sont sensibles à la fois aux effets des verotoxines (excepté VT2e) et aux toxines CNF. Les cellules HeLa (souche CCL2, Gibco, Courbevoie) sont cultivées à 37°C en milieu essentiel minimum de Eagle (MEME) contenant 2 mM de glutamine, 10% de sérum foetal de veau et 50 μ g/ml de gentamicine.

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence (48 à 72 heures), elles sont trypsinées. Les suspensions cellulaires réalisées sont ensuite dénombrées en cellule de Malassez afin de réaliser une suspension cellulaire contenant 3.10^4 cellules par ml.

1.4. Diagnostics d'orientation

Ce sont des méthodes rapides, supposées sensibles mais non spécifiques, qui permettent d'évaluer assez rapidement si les VTEC ou les NTEC sont présentes. La recherche des hémolysines intéresse les VTEC ainsi que les NTEC1 tandis que la technique des extraits congelés-décongelés doit révéler NTEC et VTEC (figure 10).

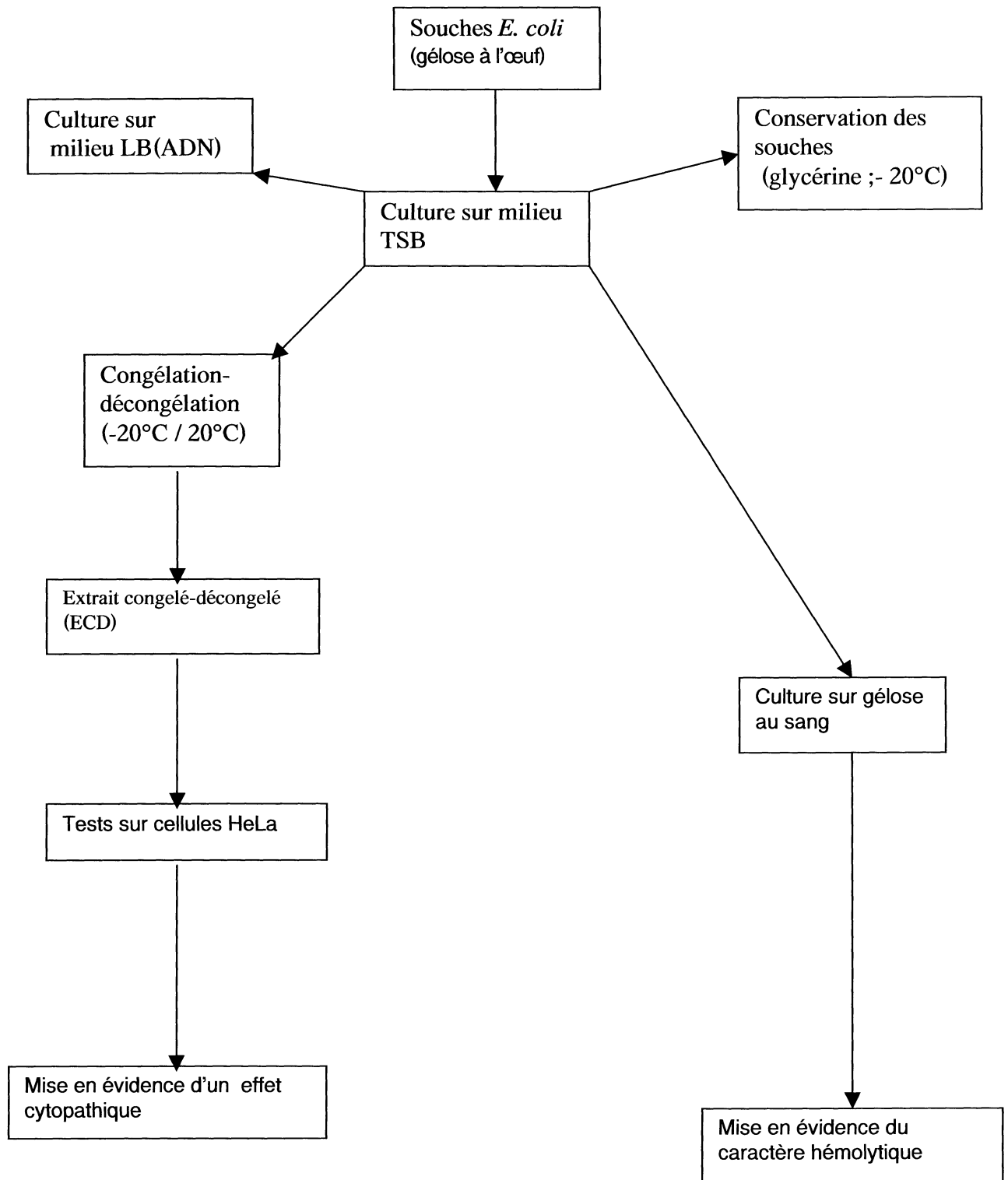


Figure 10 : mise en œuvre des diagnostics d'orientation

1.4.1. mise en évidence des hémolysines

Elle est intéressante comme diagnostic d'orientation car la production de toxine CNF1 est presque systématiquement associée à l' α -hémolysine et près de 90 % des colibacilles Verotoxinogènes produisent aussi de l'entéro-hémolysine.

On les détecte grâce à la mise en culture sur gélose au sang. Ces géloses (Trypticase Soja) contiennent 5% d'hématies de mouton lavées et 1 mM de CaCl_2 : le phénotype de l'entérohémolysine et celui de l' α -hémolysine sont distinguables (figures 10 et 11), on observe une seule zone claire autour des colonies bactériennes produisant de l' α -hémolysine et deux zones distinctes avec l'entérohémolysine (une trouble autour des colonies, et une claire centrifuge).

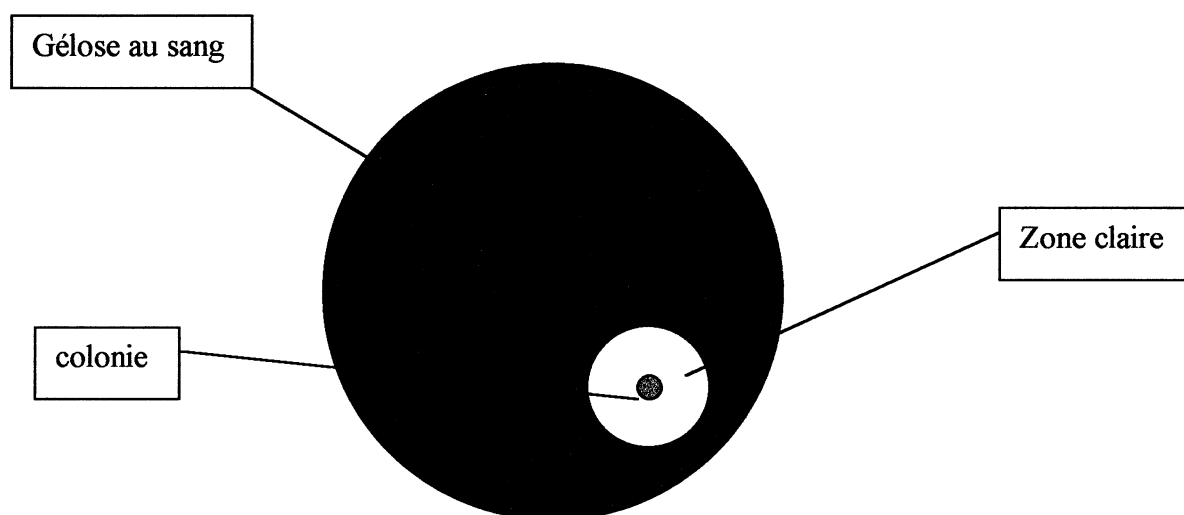


Figure 11 : aspect schématique de la mise en évidence du caractère α -hémolytique d'une colonie bactérienne cultivée sur gélose au sang.

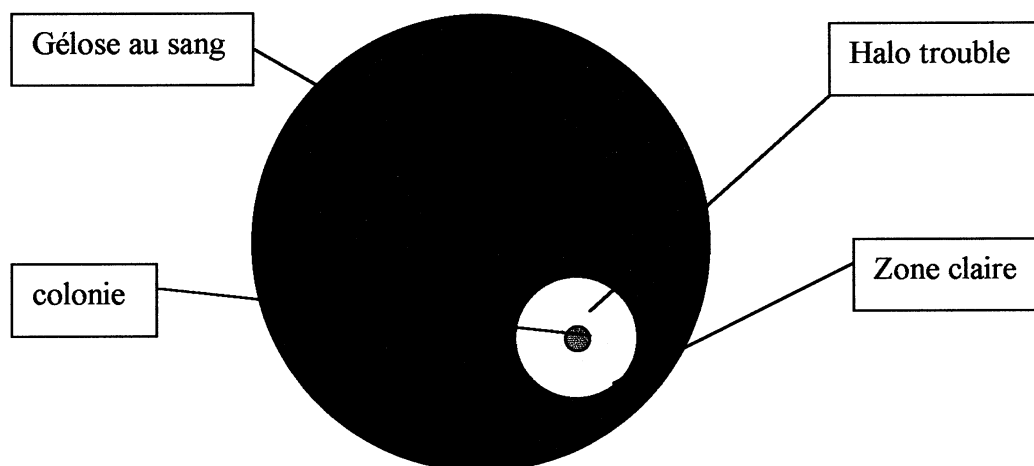


Figure 12 : aspect schématique de la mise en évidence du caractère entérohémolytique d'une colonie bactérienne cultivée sur gélose au sang.

On utilise comme témoins positifs les souches BM 2-1 (CNF1) produisant de l'alphahémolysine et C600 PEB1 (VT2) produisant de l'entérohémolysine (tableau 7). Les 212 souches sont isolées sur ces géloses avec une pipette pasteur boutonnée et elles sont mises à incuber à 37°C pendant 22 heures.

1.4.2. cytotoxicité des extraits congelés-décongelés

1.4.2.1. préparation des extraits congelés –décongelés

Les parois bactériennes détruites par des cycles de congélation-décongélation afin de libérer le contenu cellulaire et donc les toxines.

Les souches bactériennes témoins utilisées dans le test sont : H30 pour les colibacilles produisant VT1, C600 333 pour celles produisant VT2, BM 2-1 pour les CNF1 et B 26a pour les CNF2 (tableau 7).

Ces souches sont mises en culture en bouillon Trypticase-Soja (TSB, Invitrogen ; GBR) après prélèvement sur les cultures sur pente de gélose à l'œuf à l'aide d'une pipette pasteur préalablement stérilisée à la flamme. Ces ensemencements sont mis à l'étuve à 37°C pendant 24 heures sans agitation.

Les bouillons sont centrifugés (2500 g ; 30 minutes ; 4°C) puis les culots remis en suspension dans 1 ml de milieu MEME (Invitrogen ;GBR) stérile, additionné de gentamicine (200 µg / ml). La suspension est placée dans des tubes eppendorf de 2 ml et mise au congélateur à -20°C. Les corps bactériens subissent 3 cycles de congélation -décongélation (de 20°C à -20°C), la décongélation étant effectuée à température ambiante. La dernière opération terminée, les tubes eppendorf sont centrifugés (17000 g ; 10 minutes : 4°C), et le surnageant, qui constitue le lysat à tester, est transféré dans un nouveau tube eppendorf.

1.4.2.2. mise en œuvre du test de cytotoxicité

Un volume de 150 µl de suspension cellulaire à 3.10^4 cellules / ml est déposé dans chaque puits d'une plaque de microtitration pour culture cellulaire à 96 puits. Puis on ajoute 50 µl de chaque extrait congelé-décongelé à tester.

Les plaques sont mises à incuber 72 heures, puis observées au microscope inversé après fixation au méthanol et coloration au Giemsa. Les tests ont été effectués deux fois pour toutes les souches. On recherche les effets de destruction cellulaire (verotoxines) et les cellules géantes multinucléées (CNF) ainsi que des cellules géantes mononucléées (CDT).

1.5. Diagnostics spécifiques

Ce sont des méthodes de diagnostic plus « fiables » (sensibles et spécifiques). Toutes les souches prélevées sont analysées grâce à la PCR (technique de référence), puis les colibacilles s'avérant positifs sont repris en culture et on en extrait les toxines par le procédé de sonication pour tester sur cellules leur effets cytopathiques.

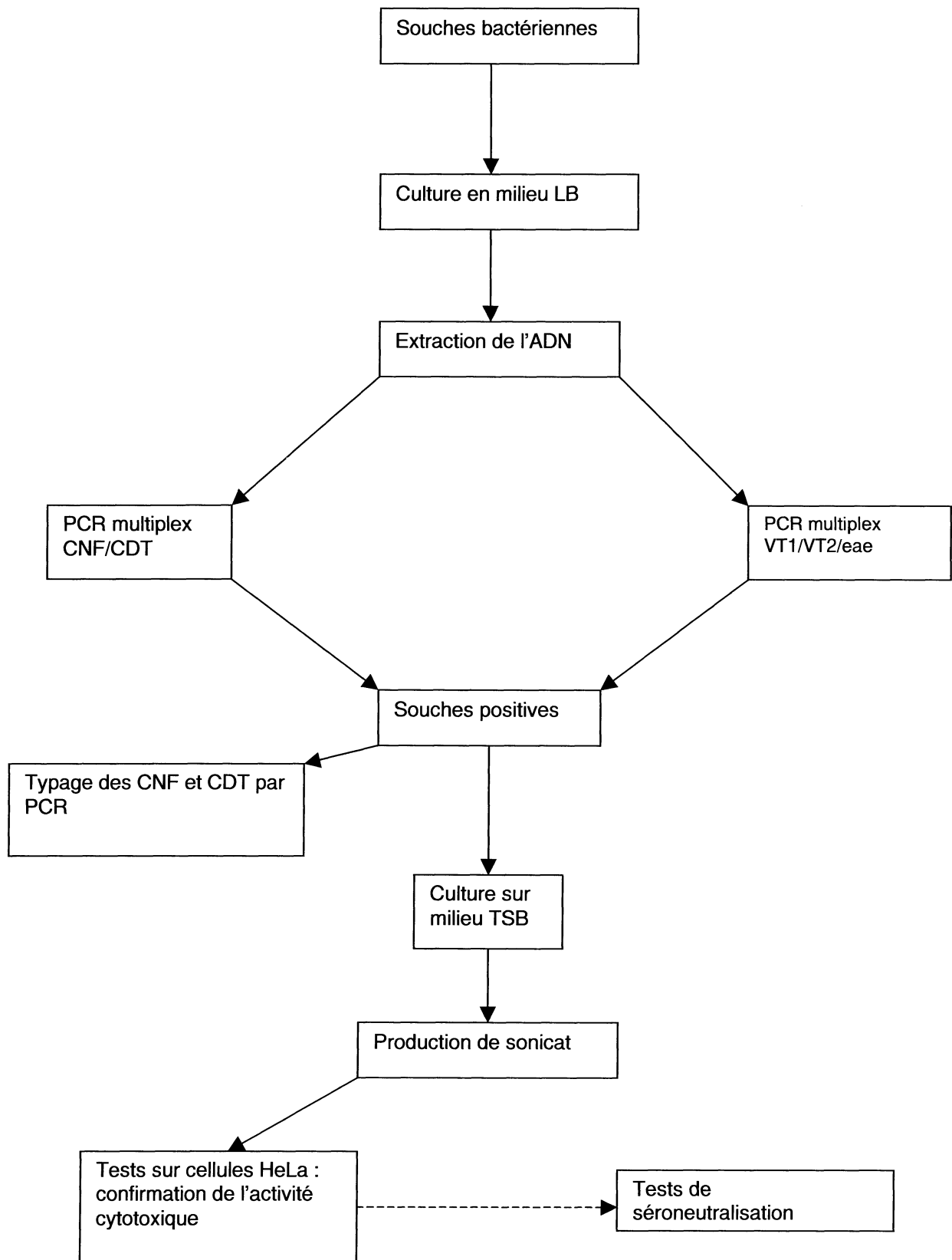


Figure 13 : mise en œuvre des diagnostics spécifiques.

1.5.1. diagnostic par PCR ou réaction de polymérisation en chaîne

1.5.1.1. présentation

La PCR permet d'identifier la présence d'un gène connu, mais il n'indique pas son niveau d'expression. Cette réaction biochimique *in vitro* permet d'amplifier l'ADN d'une région choisie d'un gène pour peu que l'on connaisse une partie de sa séquence nucléotidique. On fabrique 2 oligonucléotides de synthèse, chacun complémentaire de l'un des brins de la double hélice d'ADN et distants l'un de l'autre d'un nombre N de nucléotides, afin d'encadrer la région à amplifier. Ces oligonucléotides (ou primers) servent d'amorces à la synthèse d'ADN.

1.5.1.2. extraction de l'ADN

A partir de la culture des souches en TSB, on ensemence 5 ml de milieu LB (Luria-Bertani, Invitrogen ; GBR). Les tubes sont mis à incuber sans agitation pendant 18 à 20 heures à 37°C. 100 µl de la culture ainsi obtenue sont prélevés dans un tube Eppendorf de 1 ml.

Les tubes Eppendorff sont ensuite centrifugés à 12000 RPM, 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot produit est traité par 25 µl de NaOH 0,5 N, vortexé puis laissé à incuber 30 minutes. Le pH est ajusté par l'addition de 25 µl de Tris-Hcl 1 M (pH 7,4) et la solution est complétée à 500 µl par de l'eau bi-distillée.

On procède ensuite à l'aliquotage en 5 tubes de 100 µl qui sont congelés à -20°C et qui seront utilisés pour les réactions de PCR multiplex.

1.5.1.3. PCR multiplex VT1/VT2/eae

On utilise les amorces proposées par le Dr Bernard China (Laboratoire de bactériologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège, Belgique) (22).

<i>Gènes</i>	<i>Primers et séquence</i>	<i>Taille du fragment</i>	<i>Température optimum</i>
-eae	B52.AGGCTTCGTCACAGTTG B53.CCATCGTCACCAGAGGA	570	51.9 °C
VT1	B54.AGAGCGATGTTACGGTTTG B55.TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	52.9° C
VT2	B56.TGGGTTTTTCTTCGGTATC B57.GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	53.4° C

Tableau 8: caractéristiques des primers utilisés pour le multiplex VT1/VT2/eae

La réaction PCR est réalisée avec 5µl d'ADN préparé (cf 4.1.2.) dans un volume final de 50 µl d'un mélange constitué de : Tampon 10x , 1x ; Taq polymérase (Invitrogen, GBR) 2,5 U/100 µl ; Mgcl2 , 2 mM, dNTP ; 200 µM, primers (x6) (Isoprim, FR) ; 1 µM, eau bidistillée qsp 50 µl.

2 gouttes d'huile minérale sont ajoutées, afin d'éviter toute évaporation, puis le mélange réactionnel est mis à chauffer (Perkin Elmer) 10 minutes à 94°C pour une phase de dénaturation des 2 brins de la double hélice d'ADN. La réaction de polymérisation en chaîne comprend ensuite 25 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 53°C, 1 minute à 72°C. On finit enfin par une phase d'élongation de 10 minutes à 72°C.

Une fois la réaction finie, on récupère les produits de la PCR et on en fait migrer 10 µl par électrophorèse dans un gel d'agarose à 0.7% (et 0,5 µg/ml de BET, bromure d'ethidium) puis on révèle le tout par examen en lumière ultra-violette. Si le gène est présent une bande apparaît au même niveau que celle du témoin (figure 14).

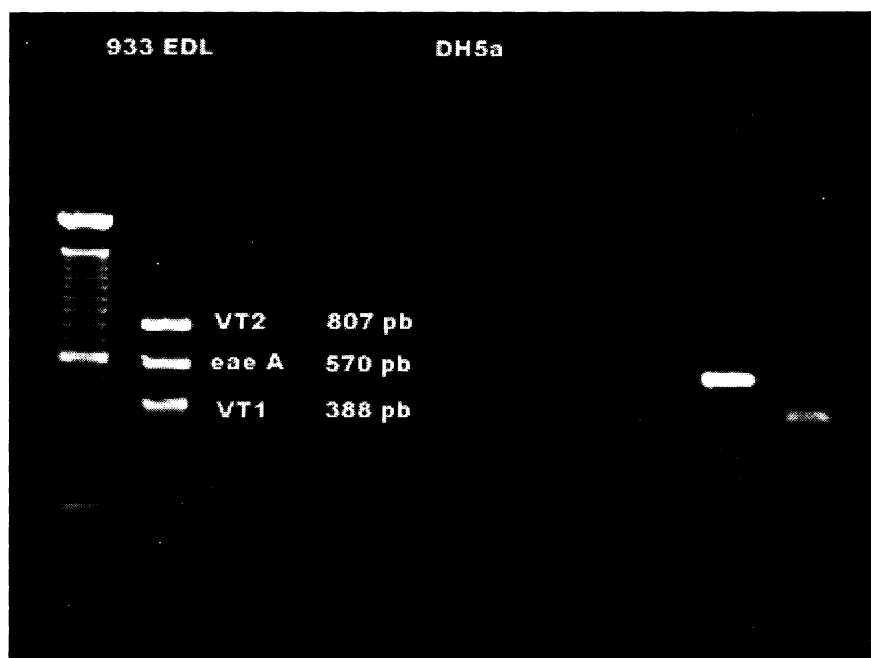


Figure 14 : PCR multiplex VT1/VT2/eae. A gauche on observe le marqueur de poids moléculaire, puis les 2 témoins : 933 EDL, témoin positif avec 3 bandes pour VT1,VT2 et eae ; DH5α témoin négatif. A droite 2 souches « sauvages », l'une positive pour eae, l'autre pour VT1.

1.5.1.4. multiplex CNF/CDT

On se sert des primers dessinés par le Dr Eric Oswald (UMR 960 INRA-ENV Toulouse, France)(article non encore publié). Le principe est de détecter des portions de gènes communes respectivement aux 2 CNF et aux 3 CDT.

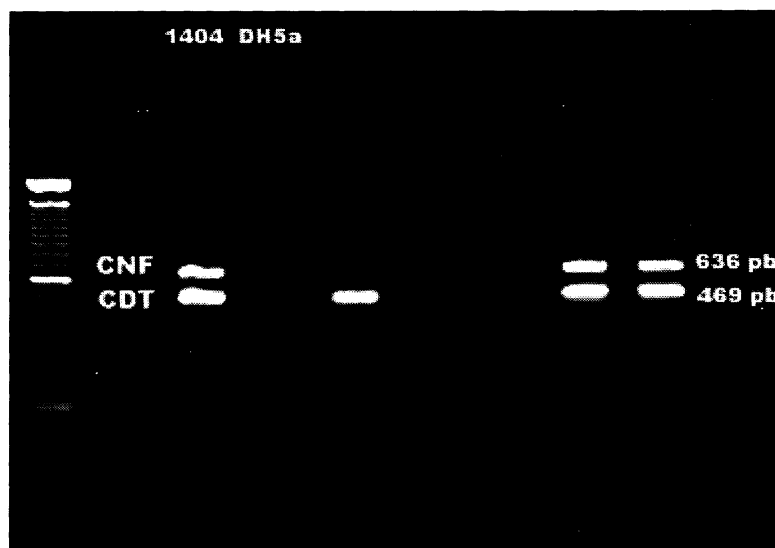


Figure 15 : PCR multiplex CNF/CDT. A gauche le marqueur de poids moléculaire, puis les 2 témoins : 1404, le témoin positif, pour lequel on observe 2 bandes pour CNF et CDT ; DH5a, le témoin négatif. A droite 2 souches « sauvages » positives à la fois pour CNF et CDT.

<i>Gène</i>	<i>Primers</i>	<i>Taille du fragment</i>	<i>Température optimum</i>
CNF commun	SCNF (U781) ASCNF (B93)	636 bp	49.1°C
CDT B	CDT sens 1 CDT sens 2 CDT sens 3 CDT antisens 1 CDT antisens 2	469 bp	48°C

Tableau 9 : caractéristiques des primers utilisés pour le multiplex CNF/CDT

Le mélange constitué est identique à celui du multiplex VT1/VT2/ae, seules les amorces diffèrent. Le milieu réactionnel est soumis au même nombre de cycles de chauffage, seule la température optimum change : 48°C au lieu de 53°C.

1.5.1.5. détermination des types de CNF et CDT

De nouvelles réactions PCR sont effectuées par Frédéric Héroult (UMR 960 INRA-ENVIT) afin de déterminer les types de CNF (1 ou 2) et de CDT (1, 2 ou 3) sur les souches détectées positives par la PCR multiplex.

1.5.2. production de sonicat et séroneutralisation

Les souches positives en PCR pour les verotoxines, les toxines CNF et CDT ainsi que les témoins positifs sont repris pour produire des sonicats afin de démontrer leur toxicité et la quantifier.

1.5.2.1. production de sonicat

Les souches sont cultivées dans 50 ml de TSB (Invitrogen ; GBR) dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml, avec agitation à 37°C et pendant 18 heures.

La culture est centrifugée (4000 RPM pendant 20 minutes à 4°C) et le culot est repris dans 5 ml de PBS puis recentrifugé. Le culot est cette fois repris dans 5 ml de PBS froid contenant des inhibiteurs de protéases (Apopeptin, Leupeptin, PMSF) afin d'éviter la dégradation des toxines et 200 µg / ml de gentamicine pour stériliser le milieu qui est maintenu au froid dans de la glace.

Le principe de la sonication est de briser par ultrasons la paroi bactérienne et de libérer ainsi les protéines microbiennes. On opère trois cycles de 3 minutes espacés de 15 minutes jusqu'à clarification du sonicat (certains peuvent nécessiter des cycles supplémentaires). Pour limiter l'échauffement, les tubes sont maintenus dans de la glace et la température est contrôlée à la fin de chaque cycle et ne doit pas excéder 40°C (toujours pour éviter l'inactivation des toxines par la chaleur).

Le produit obtenu est centrifugé (12000 RPM pendant 10 minutes à 4°C) et le surnageant est filtré sur filtre 0.20 µm. Il constitue le sonicat qui est aliquoté et congelé à -20°C.

La concentration protéique des sonicats est mesurée par le test BCA (Biorad).

1.5.2.2. dosage de l'activité cytotoxique des sonicats

Le but de cette étape est, d'une part, de confirmer la toxicité de la souche en observant l'effet cytopathique (destruction cellulaire pour VT, cellules géantes multinuclées pour CNF et cellules géantes mononuclées pour CDT) et, d'autre part, de déterminer une dose à peu près

équivalente de verotoxine ou de toxine CNF pour chaque souche pour effectuer les tests de séroneutralisation.

On travaille ainsi avec des dilutions finales, de 10 en 10, de toxine (sonicat) déposées sur des suspensions cellulaires HeLa (3.10^4 cellules /ml), dans des plaques stériles de 96 puits utilisées dans le sens vertical. Ces suspensions sont mises à incuber 72 heures à 37°C puis fixées, colorées et lues au microscope inversé.

On détermine ainsi une dilution cytotoxique 90 (DC 90) pour les verotoxines où 90% des cellules sont détruites et une DC 50 pour les toxines CNF où 50% des cellules sont multinuclées.

1.5.2.3. confirmation des types de VT par séroneutralisation

On utilise un sérum anti-VT1 de lapin neutralisant l'activité de la toxine VT1 et un sérum anti-CNF1 de lapin neutralisant l'activité de la toxine CNF1.

Les souches témoins sont H 30 (VT1) et C 600 333 (VT2) pour les VTEC ainsi que

BM 2-1 (CNF1) et B26a (CNF2) pour les NTEC (tableau 7).

Une suspension cellulaire à 3.10^4 cellules HeLa /ml est répartie sur une plaque 96 puits stérile, à raison de 180 µl / puit. Une dilution de sérum est réalisée, à laquelle on ajoute 50 DC 90 de verotoxine ou 50 DC 50 de toxine CNF. Cela constitue une plaque de séroneutralisation, mise à incuber 1 heure à 37°C. Le mélange sérum-toxine est ensuite déposé sur la suspension cellulaire et mis à incuber à 37°C pendant 72 heures. Sur chaque plaque, des tests cellules (sans cytotoxine ni sérum) et des test de cytotoxicité (avec toxine sans sérum) sont effectués.

Les cellules sont ensuite fixées au méthanol et colorées au giemsa puis les plaques lues au microscope inversé. Les contrôles cellulaires et de cytotoxicité doivent être positifs. (respectivement cellules normales et cellules totalement détruites ou multinuclées).

2. RESULTATS

26 veaux malades											17 veaux témoins non malades																																														
Veau/souche	VT1	VT2	eae	eHly	CNF1	CNF2	CDT	CDT3	AHly	Veau/souche	VT1	VT2	eae	eHly	CNF1	CNF2	CDT	CDT3	αHly																																						
248 M	3		+							248 T	2						+	+																																							
											5							+	+																																						
255 M	1									256 T	1			+																																											
	2	+		+			+				2			+																																											
	4	+		+							3			+																																											
		+		+							4			+																																											
	5	+		+							5			+																																											
256 M	4		+							278 T	1																																														
											2							+	+																																						
307 M	3									279 T	5		+																																												
	4		+				+				5		+		+																																										
343 M	1									343 T	1																																														
	2										2		+																																												
	3										4		+																																												
	4										5		+																																												
	5												+																																												
429(2) M	1									422 T	4									+																																					
	5										4					+																																									
6 veaux malades positifs pour l'intimé ou les cytotoxines, 20 négatifs.											8 veaux sains positifs pour les cytotoxines et l'intimé, 9 négatifs											1																																			
																						2									2		+																								
																						3									3		+																								
																						4									4		+																								
																						5									4		+																								

Tableau 10 : résultats PCR et caractère hémolytique (à gauche les veaux malades M, à droite les veaux témoins non-malades T). Seules les souches détectées positives sont décrites dans le tableau. Pour CDT, sont exposés les résultats du multiplex CNF/CDT, notés CDT et le résultat du typage, noté CDT3 (on remarque que les 5 souches de 343 M, CDT+, ne sont pas typables).
Légende : αHly = α hémolysine ; eHly = entérohémolysine.

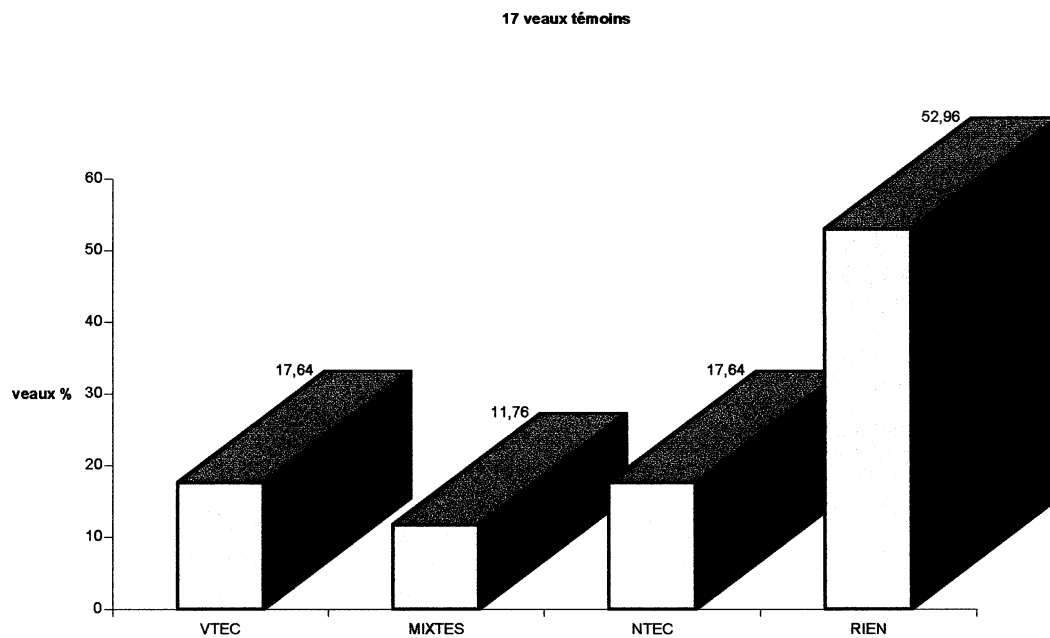


Figure 16 : résultats veaux témoins. La catégorie mixte englobe des veaux présentant des souches à la fois VTEC et NTEC ou des souches VTEC ayant une CDT.

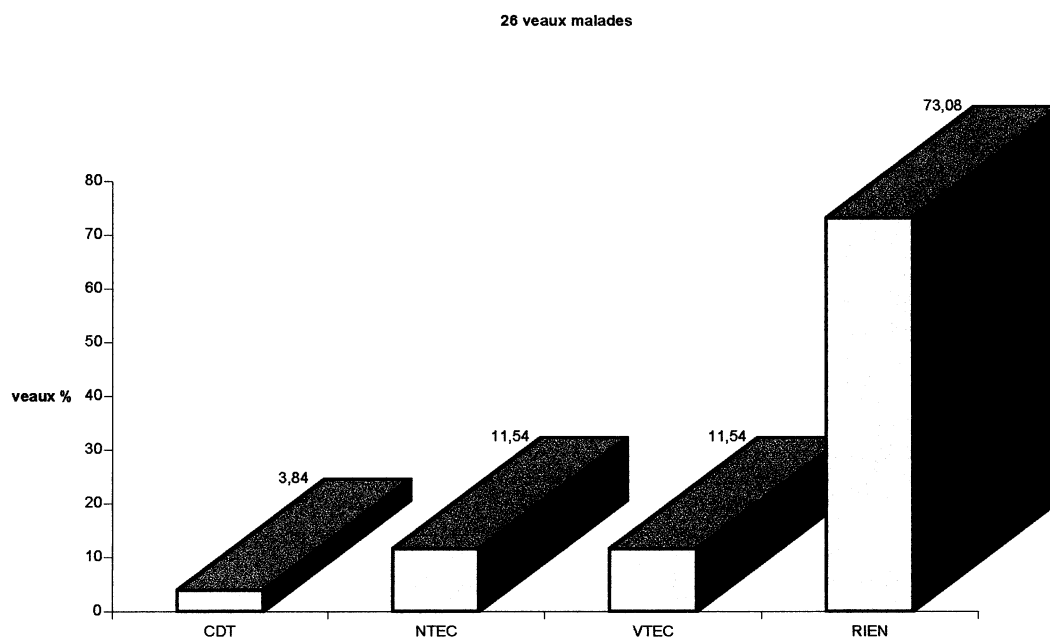


Figure 17 : résultats veaux malades. On ne retrouve pas ici la catégorie mixte.

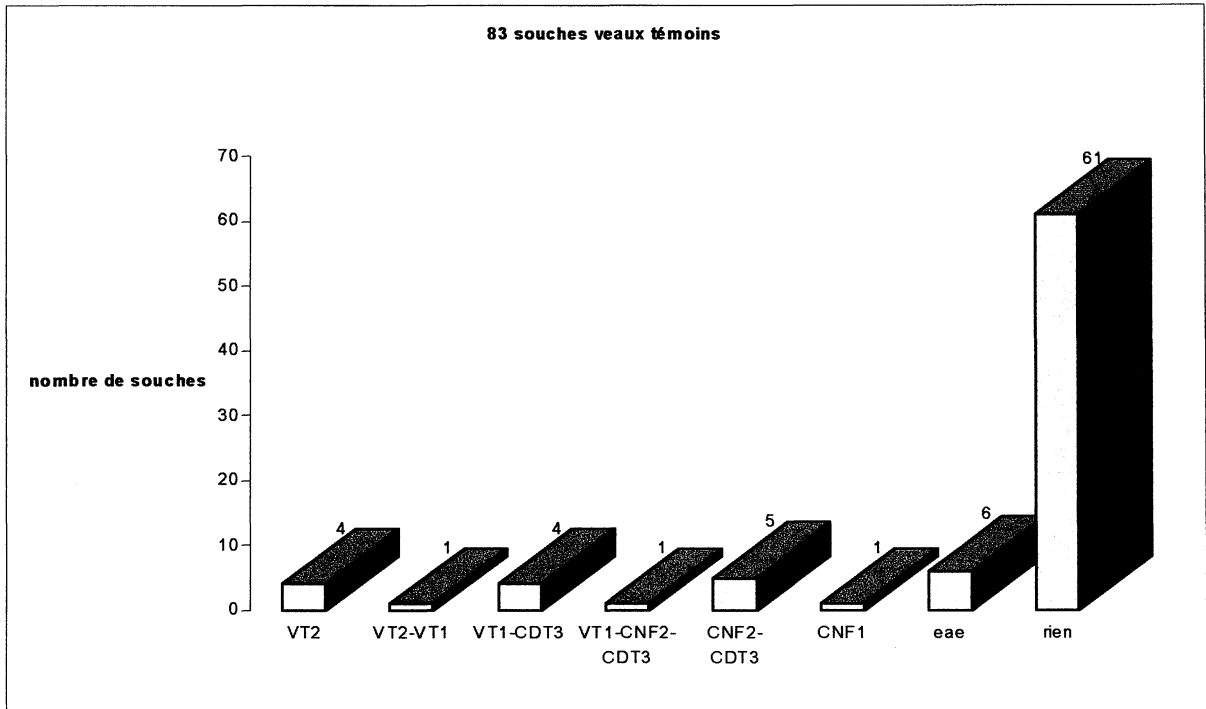


Figure 18 : résultats souches témoins.

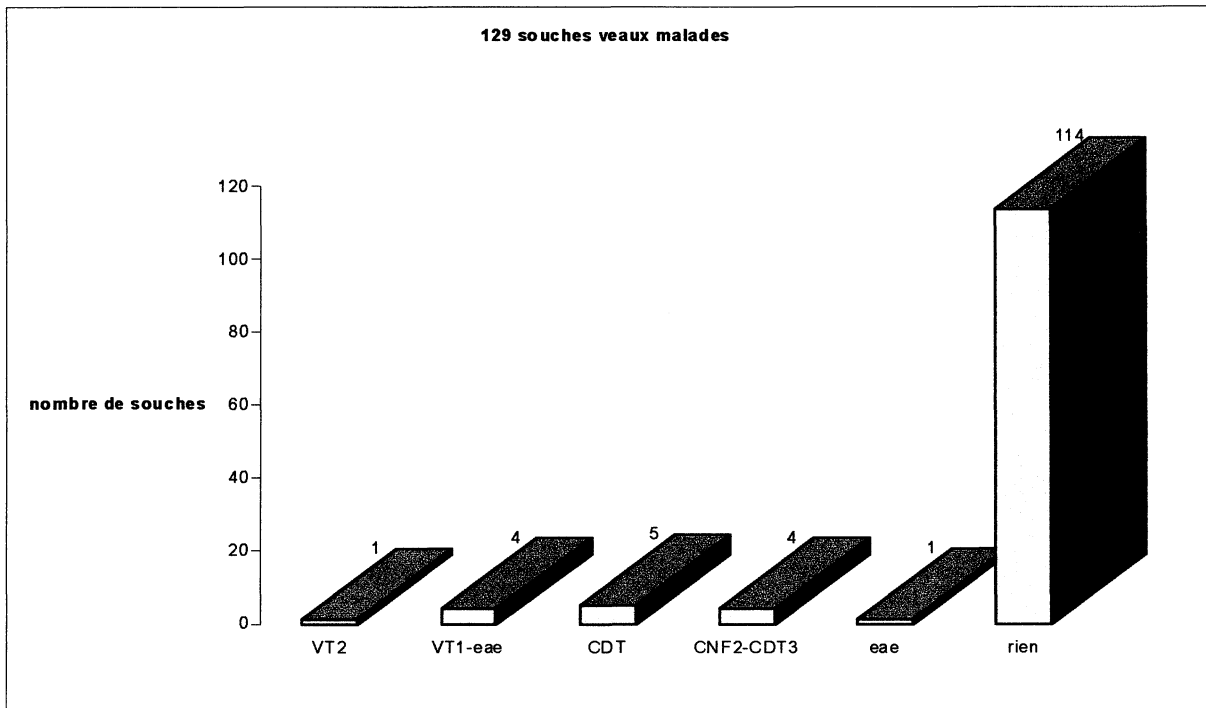
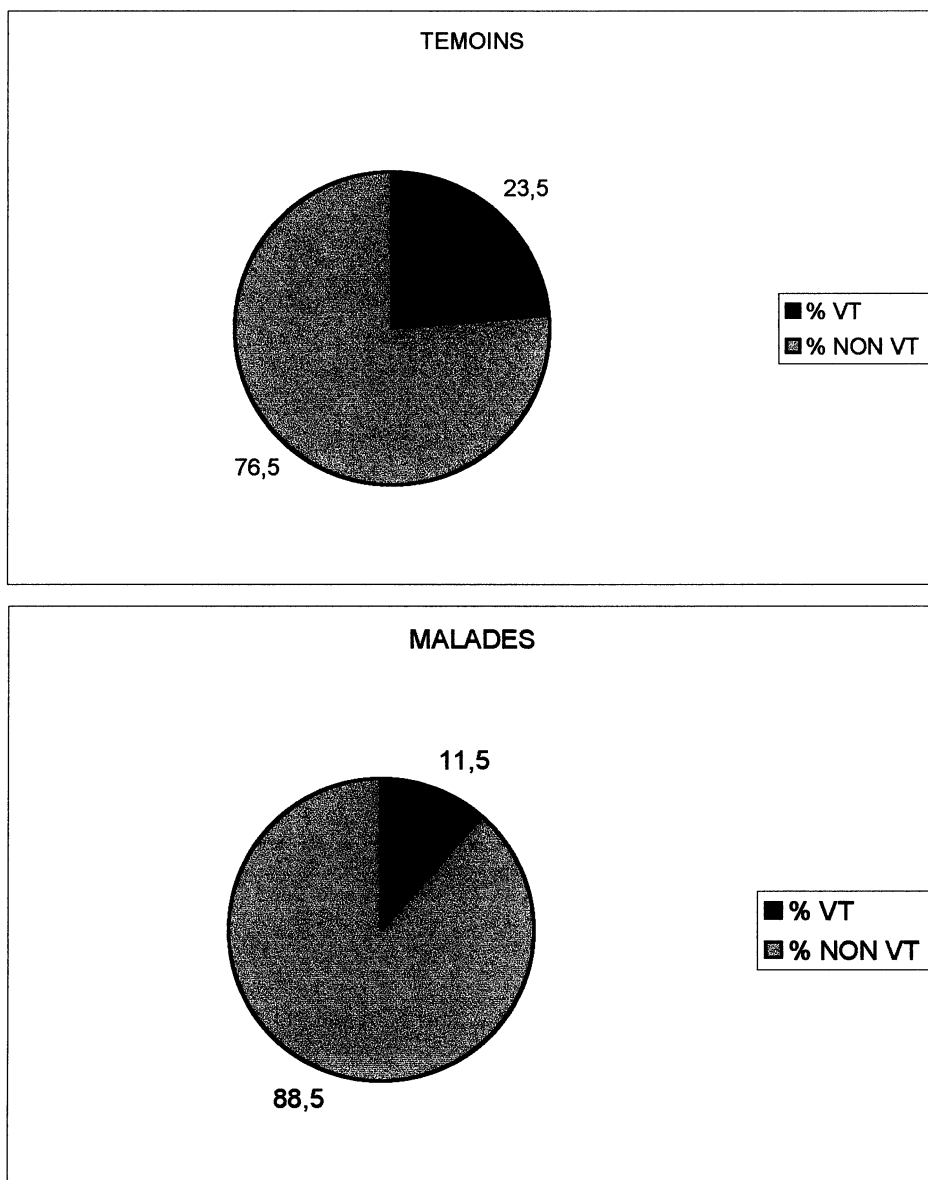


Figure 19 : résultats souches malades

Les résultats finaux s'entendent comme ceux issus des réactions PCR.

Les colibacilles producteurs de cytotoxines sont bien présents dans les élevages de la région Bourgogne et cela chez les veaux témoins et les diarrhéiques. VTEC ou NTEC sont détectés chez 23% des veaux malades (6 sur 26) et près de 50% des veaux témoins (8 sur 17)(figures 13 et 14). On retrouve cette disproportion au niveau des souches où 11,5% des souches sont positives chez les malades et 26,5% chez les témoins (cf figures 15 et 16). Cet écart observé apparaît statistiquement significatif ($\chi^2 = 4,69$; $p < 0,05$) : les veaux non malades excrètent plus de colibacilles producteurs de cytotoxines que les diarrhéiques.



Figures 20 et 21 : présence des souches VTEC chez les témoins et les malades

Des souches VTEC sont rencontrées chez 11,5% des veaux diarrhéiques et 23,5% des veaux témoins (3,9% et 12% des souches)(figures 17 et 18). La différence entre les 2 groupes apparaît statistiquement significative ($\chi^2 = 5,13$; $p < 0,05$) : le portage des VTEC est donc supérieur dans le groupe des veaux sans pathologie. VTEC1 et VTEC2 sont également répartis entre les deux groupes ($\chi^2 = 1,87$)(cf tableau 11).

	VT1	VT2	VT1-VT2	Total
malades	4	1	0	5
témoins	5	4	1	10
total	9	5	1	15

Tableau 11 : répartition des souches VTEC

De même, la capacité à créer des lésions d'attachement-effacement et donc la présence du gène *eae* est de niveau équivalent chez les veaux diarrhéiques et les veaux sains ($\chi^2 = 1,87$)(tableau 12).

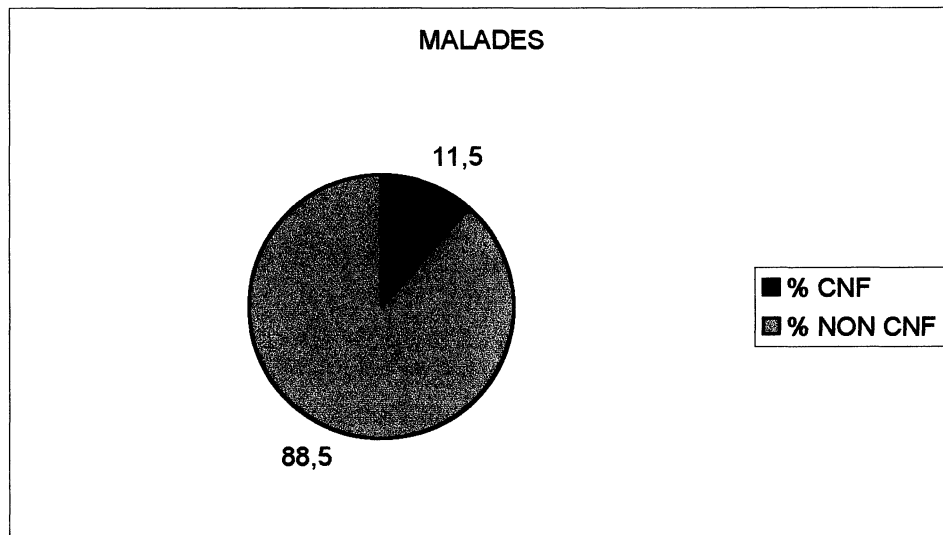
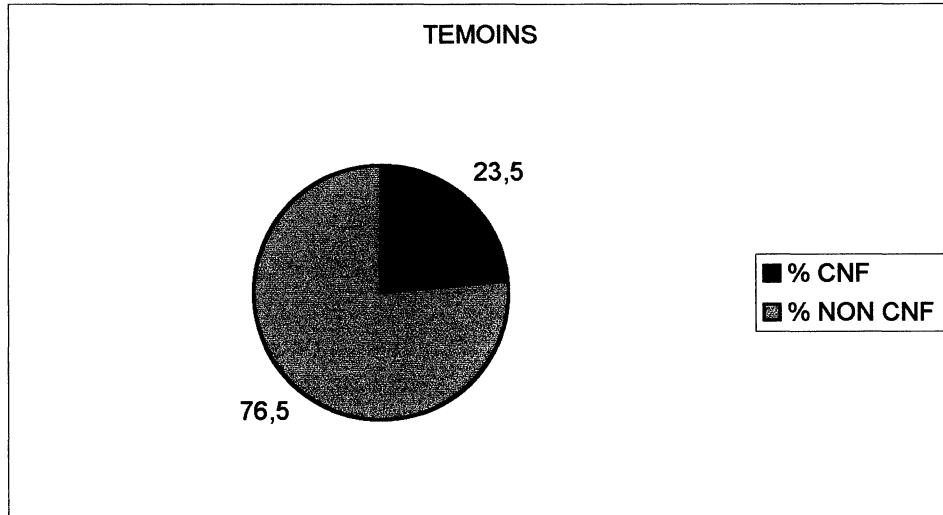
	malades	témoins	total
eae+	5	6	11
eae-	124	77	201

Tableau 12 : répartition des souches eae+

Enfin, on peut remarquer que les 4 souches VTEC1 présentes chez les veaux malades sont aussi positives pour l'intimine (*eae+*), ce qui signifie qu'elles peuvent être des EHEC. Mais il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes ($\chi^2 = 0,13$).

	malades	témoins	total
VT+eae+	4	0	4
-	125	83	208

Tableau 13 : répartition des souches supposées EHEC



Figures 22 et 23 : présence des souches NTEC2 chez les témoins et les malades

Les NTEC sont présentes chez 11,5% des veaux malades et 23,5% des veaux témoins (3,1% et 8,4% des souches)(figures 19 et 20). Seule une souche NTEC1 (sur 212) est isolée et ce chez un veau sain (tableau 14). 11,5% des veaux malades et 17,6% des veaux témoins excrètent des NTEC2 (3,1% et 7,2% des souches), il n'y a pas de différence notable entre les malades et les non malades ($\chi^2 = 2,83$). On peut souligner que toutes les souches NTEC2 sont aussi positives pour CDT3.

	Malades	témoins	total
CNF1	0	1	1
CNF2	4	6	10
total	4	7	11

Tableau 14 : répartition des souches NTEC

Il est intéressant de remarquer que l'on observe chez 2 veaux témoins 5 souches « hybrides » : 4 souches VT1 qui sont positives pour CDT3 et une souche VT1 positive pour CNF2 et CDT3.

On trouve un total de 20 souches hémolytiques : 9 présentent le phénotype entérohémolysine associé aux VTEC, 11 le phénotype α -hémolysine associé aux NTEC1 (figures 10 et 11). Les entérohémolytiques, se répartissent en 4 chez les veaux malades et 5 chez les veaux témoins. Seules 9 souches VTEC sur 15 (60%) possèdent le phénotype entérohémolysine, mais 9 souches VTEC1 (tableau 15) sur 10 l'expriment ce qui confirme que l'entérohémolysine est fortement associée aux VT1 (80). La recherche de ce caractère est donc intéressante pour détecter les VTEC1. Les α -hémolytiques, NTEC1 présumées, sont, elles, 7 chez les malades et 4 chez les témoins et l'unique souche CNF1 possède bien le phénotype α -hémolysine.

	VT1	VT2	CNF1	Total
EHly	9	0	0	9
αHly	0	0	1	11
	10	5	1	

Tableau 15: répartition des souches hémolytiques

Nous pouvons ensuite nous intéresser à la technique des extraits congelés-décongelés dont l'efficacité est comparée à celle de la PCR, technique de référence (tableau 16 et 17). Sont comparés les résultats pour la détection des verotoxines (tableau 16) d'une part et pour celles des toxines CNF d'autre part (tableau 17).

		PCR	
		+	-
ECD	+	5	28
	-	10	179

Tableau 16 : résultats comparés PCR / extrait congelés-décongelés pour la détection des verotoxines

La méthode des extraits congelés-décongelés n'apparaît pas dans notre cas comme une technique fiable pour la détection des verotoxines (la méthode diffère significativement de la PCR ; méthode de l'écart réduit) : ne sont détectées que 5 souches VTEC sur 15 (manque de sensibilité) et 28 autres présentent une destruction sans confirmation PCR (manque de spécificité).

		PCR	
		+	-
ECD	+	3	3
	-	8	198

Tableau 17 : comparaison des résultats PCR / extraits congelés-décongelés pour la détection des toxines CNF

En ce qui concerne les NTEC les 2 techniques ne diffèrent pas significativement (methode de l'écart réduit ; $\varepsilon = 1,51 < 2$) mais seules 3 souches sur 11 sont détectées (défaut de sensibilité), 3 autres présentent une multinucléation sans confirmation PCR, peut-être des NTEC atypiques (d'autant plus qu'une des trois possède une CDT3).

Ensuite, est-ce que les résultats PCR sont confirmés par les essais cellulaires d'extraits soniqués ? Toutes les souches VTEC détectées en PCR induisent une destruction cellulaire dans des dilutions allant de 1 (pur) à 10 millions. Une séroneutralisation est observée (cellules non détruites, on peut le constater même à l'œil nu) pour toutes les souches produisant VT1 et VT1-VT2 tandis que celles produisant VT2 uniquement ne sont pas neutralisées (tableau 18). Cela confirme bien les résultats PCR.

VEAU/SOUCHE	VT1	VT2	SERONEUTRALISATION
429/1 /1	+		+
429/1 /2	+		+
429/1 /3	+		+
429/1 /4	+		+
429/2 /4	+		++
248 / 3	+		++
255 / 2	+		++
255 / 4	+		++
255 / 5	+		++
279 / 5	+	+	++
343 / 1		+	-
343 / 2		+	-
343 / 4		+	-
343 / 5		+	-
307 / 4		+	-

Tableau 18 : résultats séroneutralisation sérum anti-VT1

De même, les souches NTEC détectées en PCR présentent toutes le phénotype sauf une (tableau 19), peut-être a-t-elle perdu le caractère au cours de cultures successives ou alors le caractère ne s'exprime pas ou pas assez. L'effet de la seule souche NTEC1 est bien neutralisé par le sérum anti-CNF1.

VEAU / SOUCHE	RESULTAT PCR	MULTINUCLEATION (effet CNF)	SERONEUTRALISATION
429 / 2 / 4	CNF2-CDT3	+	-
429 / 1 / 1	CNF2-CDT3	+	-
429 / 1 / 4	CNF2-CDT3	-	-
307 / 3	CNF2-CDT3	+	-
248 / 2	CNF2-CDT3	+	-
248 / 5	CNF2-CDT3	+	-
255 / 1	CNF2-CDT3	+	-
422 / 4	CNF1	+	+

Tableau 19 : résultats PCR et cytotoxicité des sonicats provenant des souches CNF+

De la même façon, les souches détectées positives par PCR pour CDT3 seule expriment leur effet cytopathique dans des extraits soniqués.

3. DISCUSSION

Les veaux issus d'élevages de Bourgogne excrètent bien des colibacilles producteurs de cytotoxines : 23% des malades et 47% des témoins. Ces proportions sont loin d'être négligeables d'autant plus qu'on ne s'intéresse dans notre cas qu'à la flore majoritaire (5 souches sont prélevées par veau). Il est probable qu'en réalisant des réactions PCR directement sur fèces (qui contiennent par essence la flore totale) le nombre de veaux porteurs s'en trouverait sensiblement augmenté.

Des souches VTEC sont rencontrées chez 11.5% des veaux diarrhéiques et 23.5% des veaux témoins : cette fréquence observée est similaire à celle des études vues plus haut, se situant toutefois dans les tranches inférieures (13)(12)(58)(82). Seule une souche NTEC1 (sur 212) est isolée chez un veau témoin ce qui est en accord avec le fait que l'on rencontre ces souches très rarement chez les bovins (8). Les souches NTEC2 sont, elles, en plus grand nombre (11,5% des veaux malades et 17,6% des témoins) mais pas au niveau de certaines études dans lesquelles près de 50% des veaux sont excréteurs (8). Sans doute existe-t-il des variations en fonction des zones géographiques et du type d'élevage concerné (élevages concentrés en un point donné, mouvements d'animaux, élevages extensifs ou intensifs, veau de boucherie ou veau à l'herbe ...).

Est-ce que les VTEC et NTEC sont des pathogènes pour le veau ? Il semblerait qu'ils n'en sont pas. En effet, les NTEC sont en nombre équivalent chez les diarrhéiques et les témoins et les VTEC prédominent chez les non malades. De plus, on n'observe pas les disproportions relatives entre VTEC1 et VTEC2 relatées çà et là : les VTEC1 ne sont pas majoritaires chez les malades (82)(36)(9) ou chez les non malades (57). Enfin, même si les EHEC (4 souches) ne sont présents que chez 2 veaux malades, ce n'est pas significativement probant. Cependant, la non pathogénicité des VTEC et NTEC n'est peut-être pas aussi évidente que cela. En effet, on peut s'interroger sur l'influence du choix des veaux inclus dans l'enquête : tous les veaux ayant présenté un colibacille K99 (F5) , rota ou coronavirus ou cryptosporidies ont été éliminés de l'étude, ce qui modifie sans doute la prévalence réelle des VTEC et nous prive de renseignements précieux sur les éventuelles associations des VTEC avec d'autres pathogènes sachant que dans de nombreux cas la diarrhée est la résultante d'une « association de malfaiteurs ». En outre, l'âge des veaux étudiés (0 à 1 mois) ne correspond pas tout à fait à l'âge des veaux concernés par les VTEC et NTEC (il peuvent être plus vieux ; tableau 6) car on se souciait pas uniquement des producteurs de cytotoxines comme agents diarrhéogènes, et le type de diarrhée n'est pas assez ciblé, VTEC et NTEC étant plus probablement associées à des entérites mucoïdes et/ou hémorragiques. Enfin, la taille de l'échantillon

influe sans doute sur la fiabilité des résultats, une enquête de plus vaste ampleur, plus ciblée, aurait sans doute été nécessaire.

NTEC et VTEC ne sont-elles pas seulement une partie de la flore normale des veaux ? Le fait qu'ils soient au moins aussi nombreux chez les animaux sains que les malades implique un portage asymptomatique qui n'exclue pas une pathogénicité s'exprimant sous certaines conditions. La colonisation du tube digestif est nécessaire pour induire une diarrhée, mais elle n'est pas suffisante. D'autres facteurs interviennent :

- il faut des conditions favorables à la multiplication des colibacilles, à la sécrétion de toxines (pH, nutriments ...)
- l'hôte doit être réceptif aux toxines : est-ce que les récepteurs peuvent être présents chez les veaux à un âge précis, chez certaines races, chez des individus débilités ?
- est-ce que cette réceptivité est augmentée par l'association avec d'autres pathogènes ?

La présence de VTEC et NTEC chez des individus sains, si elle ne démontre le contraire, ne signifie donc pas forcément leur absence de pouvoir pathogène. D'autres pathogènes comme les coccidies, par exemple, sont dans le même cas. Pour ce type d'agents les enquêtes cas-témoins comme la nôtre présentent un intérêt relatif.

L'intérêt de notre travail résidait aussi dans la détection des EHEC, responsables du grave syndrome hémolytique et urémique chez l'homme. 4 souches sur 212 en présentent les caractéristiques (production de verotoxines, capacité de créer des lésions d'attachement-effacement et production d'entérohémolysine), ce qui représente 2% des souches analysées et 27% des VTEC et ceci chez 4% des veaux (2 sur 47). Bien qu'on n'atteigne pas les niveaux d'excrétion observés en Grande-Bretagne (29) ou en Italie (14), cela met en évidence le rôle de réservoir que jouent les bovins dans cette pathologie humaine et devrait inciter à mieux connaître et maîtriser le risque pesant sur la santé publique.

On constate que toutes les souches produisant CNF2 sont aussi productrices de CDT3, ce qui est compatible avec les observations précédentes (30), il y aurait une coopération étroite entre les deux toxines pour induire les modifications cellulaires. On peut aussi observer que certaines souches (quatre) produisant VT1 sont associées à CDT3. Est-ce un hasard ou bien les deux toxines

peuvent-elles agir en synergie comme avec CNF ?

Enfin, 5 souches issues du même veau malade sont détectées positives pour CDT en PCR multiplex mais on ne peut pas les typer avec les amorces spécifiques de CDT 1, 2 et 3. Est-ce dû à une trop grande sensibilité de la réaction PCR ou bien est-ce une toxine CDT non encore identifiée ? Cette dernière hypothèse serait corroborée par le fait que les extraits soniqués de ces souches produisent le phénotype CDT sur cellules (cellules géantes mononuclées).

En ce qui concerne les méthodes de diagnostic, la PCR, technique de référence, est confirmée par les résultats des tests cellulaires d'extraits soniqués : toutes les souches détectées en PCR pour les verotoxines, les toxines CNF et CDT (sauf une) expriment leur toxicité sur les cellules HeLa. Par contre, les extraits congelés-décongelés sont décevants. Pour CNF, même si la méthode ne diffère pas statistiquement de la PCR, il y a beaucoup trop de faux négatifs. Pour les verotoxines, la méthode n'est ni sensible, ni spécifique : de nombreux faux positifs existent, il se peut que la technique des extraits congelés-décongelés mette à jour des VTEC non typables par notre PCR, mais plus vraisemblablement la destruction cellulaire observée a d'autres origines (contaminations externes, autres toxines ou facteurs cytotoxiques).

CONCLUSION

En conclusion, au vu de nos résultats, on ne peut pas affirmer que les colibacilles producteurs de cytotoxines soient une cause de diarrhée chez le veau. Cependant les résultats concluants d'inoculations expérimentales (certes éloignées des conditions de terrain) autant avec les souches VTEC (ou EHEC) que NTEC, la forte toxicité démontrée des CNF et VT, mériteraient des études plus poussées dans les élevages. Il faudrait sans doute mieux définir les types de diarrhées (et autres pathologies) associés aux VTEC et NTEC, mieux cerner l'âge des veaux concernés et augmenter considérablement la taille des échantillons étudiés.

Il serait donc sans doute intéressant pour les vétérinaires de les prendre en compte dans les pathologies où *Escherichia coli* est impliquée, par exemple lors d'échecs vaccinaux. Ce germe ubiquiste est en effet, grâce à la plasticité de son génome, protéiforme. Lutter contre un ETEC K99(F5) ne requiert pas les mêmes armes que de lutter contre un VTEC ou NTEC. De plus on maîtrise assez bien aujourd'hui la pathologie ETEC par l'immunisation passive du veau, et cela peut peut-être laisser une « niche écologique » pour d'autres pathogènes du tube digestif et notamment les producteurs de cytotoxines.

Il est donc nécessaire de développer le diagnostic de ces pathogènes sur le terrain au travers de techniques abordables en routine (la PCR par exemple).

Ceci pourrait permettre de déterminer plus finement leur implication dans la pathologie du veau et aussi ainsi d'évaluer le rôle des bovins comme réservoir de pathogènes (EHEC) pour l'homme. Il serait alors envisageable, pourquoi pas, de maîtriser, par l'intermédiaire de vaccins par exemple, leur incidence sur la santé publique.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

M. LAPLAZE Jérôme, Roland, Antoine

a été admis(e) sur concours en : 1991

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 26 septembre 1996

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, A. MILON, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

M. LAPLAZE Jérôme, Roland, Antoine

intitulée :

« Rôle des *Escherichia coli* producteurs de cytotoxines dans la diarrhée du veau. Une enquête étiologique en région Bourgogne »

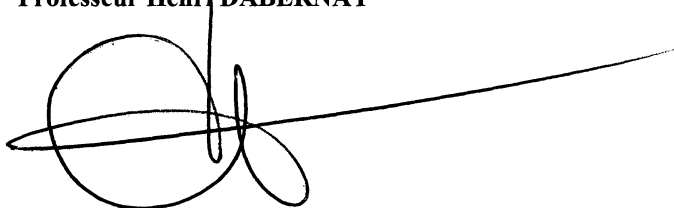
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



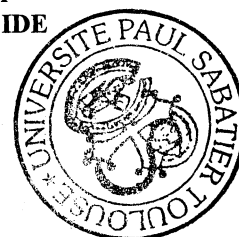
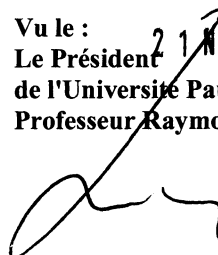
**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Pierre DESNOYERS**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Henri DABERNAT**



**Vu le : 21 NOV. 2002
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Raymond BASTIDE**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AGBODAZE D. : Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli* : a minireview of their classification, clinical presentations and management of an heterogeneous family of cytotoxins. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* ; (1999) **22** , 221-230.
2. ARMSTRONG G.L., HOLLINGSWORTH J., MORRIS J.G. : Emerging foodborne pathogens : *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews* ; (1996) **18-1** , 29-51.
3. BEUTIN L., GEIER D., STEINRÜCK H. : Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* ; (1993) **31-9** , 2483-2488.
4. BEUTIN L., MONTENEGRO M.A., ORSKOV I. : Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* ; (1989) **27-11** , 2559-2564.
5. BEUTIN L., ZIMMERMANN S., GEIER K. : Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates. *Journal of Clinical Microbiology* ; (1996) **34-11** , 2812-2814.
6. BEUTIN L., BÜLTE M., WEBER A. : Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiol. Infect.* ; (2000) **125** , 47-54.
7. BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A. : Prevalence and characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ in healthy cattle. *Res. Microbiol.* ; (1998) **149** , 47-53.
8. BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A. : Distribution and characterization of faecal necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ isolated from healthy cow and calves. *Veterinary Microbiology* ; (1998) **59** , 183-192.
9. BLANCO M., BLANCO J.E., BLANCO J. : Distribution and characterization of faecal verotoxin- producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology* ; (1997) **54** , 309-319.
10. BLANCO M., BLANCO J.E., BLANCO J. : Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol. Infect.* ; (1996) **117** , 251-257.
11. BLANCO J., GONZALEZ E.A., GARCIA S. : Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). *Veterinary Microbiology* ; (1988) **18-3.4** , 297-311.

- 12.**BLANCO M., BLANCO J., BLANCO J.E. : Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. American Journal of Veterinary Research ; (1993) **54-9** , 1446-1451.
- 13.**BLANCO M., BLANCO J.E., BLANCO J. : Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). European Journal of Epidemiology ; (1996) **12** , 13-19.
- 14.**BONARDI S., MAGGI E., BOTTARELLI A. : Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 :H7 from cattle at slaughter in Italy. Veterinary Microbiology ; (1999) **67** , 203-211.
- 15.**BRENNER B.M. ,RECTOR F.C. ; 1986. Hemolytic uremic syndrom. In: KIDNEY (the) ; Armore medical books – WB saunder company. 1986 – vol 2 ; p 1185 – 1186.
- 16.**BUSATO A., HOFER D., LENTZE T. : Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. Veterinary Microbiology ; (1999) **69** , 251-263.
- 17.**CAPEK I., ILEF D. : Une singulière épidémie dans l’Oise. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire ; (1993) **48** , 221-222.
- 18.**CAPRIOLI A., FALBO V., RODA L.G. : Partial purification and characterization of an *E. coli* toxic factor that induce morphological cell alterations. Infect. Immun. ; (1983) **39** , 1300-1306.
- 19.**CAPRIOLI A., LUZZI I., ROSMINI F. : Communitywide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 :H7 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. The Journal of Infectious Diseases ; (1994) **169** , 208-211.
- 20.**CARTER G.R. , CHENGAPPA M.M. ; 1993. Edema disease. In : MICROBIAL DISEASES. Iowa university press / Ames. 1993. p 100 –101.
- 21.**CASENAVE C., DESENCLOS J.C., MAILLOT E. : Ecllosion de syndrome hémolytique et urémique (S.H.U.) dans une commune rurale du Cher. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire ; (1993) **48** , 222-224.
- 22.**CHANTER N., MORGAN J.H., BRIDGER J.C. : Dysentery in gnotobiotic calves caused by atypical *Escherichia coli*. The veterinary Record ; (1984) **114** p 71.
- 23.**CHINA B., PIRSON V., MAINIL J. : Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf population in Belgium. Veterinary Microbiology ; (1998) **63** , 249-259.
- 24.**CHINA B., PIRSON V., MAINIL J. : Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. Applied and Environmental Microbiology ; (1996) **62-9** , 3462-3465.

- 25.** COBBOLD R., DESMARCHELIER P. : A longitudinal study of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three australian dairy herds. *Veterinary Microbiology* ; (2000) **71** , 125-137.
- 26.** COBBOLD R., DESMARCHELIER P. : Characterisation and clonal relationships of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from australian dairy cattle. *Veterinary Microbiology* ; (2001) **79** , 323-335.
- 27.** DEAN-NYSTROM E.A., BOSWORTH B.T., CRAY W.C. : Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infection and Immunity* ; (1997) **65-5** , 1842-1848.
- 28.** DE RYCKE J. : Les colibacilles producteurs de cytotoxines : importance en médecine vétérinaire et en santé publique. *Ann. Rech. Vet.* ; (1991) **22** , 105-126.
- 29.** DE RYCKE J. : Les pathovars émergents de colibacilles et leur possible implication dans la pathologie du veau. In : SFB – Paris ; 20,21,22 Oct. 1999 ; 169-175.
- 30.** DE RYCKE J., OSWALD E. : Cytolethal distending toxin (CDT) : a bacterial weapon to control host proliferation ? *FEMS Microbiology letters* ; (2001) **203** , 141-148.
- 31.** DE RYCKE J., OSWALD E. : Les bovins sont-ils une source significative de *Escherichia coli* O157 :H7 ? *Le Point Vétérinaire* ; (1994) **26** , 917-923.
- 32.** DE RYCKE J., GUILLOT J.F., BOIVIN R. : Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Veterinary Microbiology* ; (1987) **15** , 137-150.
- 33.** DE RYCKE J., MILON A., OSWALD E. : Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC) : two emerging categories of human and animals pathogens. *Veterinary Research* ; (1999) **30** , 221-233.
- 34.** DE RYCKE J., PLASSIART G. : Toxic effect for lambs of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*. *Research in Veterinary Science* ; (1990) **49** , 349-354.
- 35.** DE RYCKE J., GONZALEZ E., A. BLANCO J. : Evidence of two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* ; (1990) **28-4** , 694-699.
- 36.** DORN C.R., FRANCIS D.H., ANGRİK E.J. : Characteristics of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* associated with intestinal colonization and diarrhea in calves. *Veterinary Microbiology* ; (1993) **36** , 149-159.
- 37.** GANNON V.P., RASHED M., KING R.K. : Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* ; (1993) **31-5** , 1268-1274.

- 38.** GRIFFIN P.M., TAUXE R.V. : The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews* ; (1991) **13** , 60-97.
- 39.** GYLES C.L. : *Escherichia coli* verotoxins and others cytotoxins. *Can. J. Microbiol.* ; (1995) **38-7** , 734-746.
- 40.** HALL G.A., REYNOLDS D.J., CHANTER N. : Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves : natural and experimental disease. *Vet. Pathol.* ; (1985) **22** , 156-163.
- 41.** HUBERT B., DESENCLOS J.C. : Les infections à *Escherichia coli* entéro-hémorragiques. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* ; (1993) **48** , p 224.
- 42.** KONOWALCHUK J., SPEIRS J.I., STAVRIC S: Vero response to a cytotoxin of *E. coli* . *Infect. Immun* ; (1977) **18** , 775-779.
- 43.** LOUIE M., DE AZAVEDO J., CLARKE R. : Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol. Infect.* ; (1994) **112** , 449-461.
- 44.** MAINIL J.G., JACQUEMIN E.R., KAECKENBEECK A.E. : Association between the effacing (*eae*) gene and the shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *American Journal of Veterinary Research* ; (1993) **54-7** , 1064-1068.
- 45.** MAINIL J.G., JACQUEMIN E., POHL P. : Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Veterinary Microbiology* ; (1999) **70** , 123-135.
- 46.** MAINIL J.G., DUCHESNES C.J., WHIPP S.C. : Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *American Journal of Veterinary Research* ; (1987) **48-5** , 743-747.
- 47.** MAINIL J. : Shiga/Verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Veterinary Research* ; (1999) **30** , 235-257.
- 48.** MAKINO S., KOBORI H., ASAKURA H. : Detection and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiol. Infect.* ; (2000) **125** , 55-61.
- 49.** MARIANI-KURKDJIAN P., DENAMUR E., MILON A. : Identification of a clone of *Escherichia coli* O132 :H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *Journal of Clinical Microbiology* ; (1993) **31-2** , 296-301.
- 50.** MILON A., OSWALD E., DE RYCKE J. : Rabbit EPEC : a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli* . *Veterinary Research* ; (1999) **30** , 203-219.

- 51.** MILON A. : Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *Escherichia coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal. *Revue Med. Vet.* ; (1993) **144-11** , 857-878.
- 52.** MORABITO S., DELL'OMO G., AGRIMI U. : Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Veterinary Microbiology* ; (2001) **82** , 275-283.
- 53.** MÜHLDORFER I., HACKER J. : Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis* ; (1994) **16** , 171-181.
- 54.** O'LOUGHLIN E.V., ROBINS-BROWNE R. M. : Effect of shiga toxin and shiga-like toxins on eukariotic cells. *Microbes and Infection* ; (2001) **3** , 493-507.
- 55.** ORDEN J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA J.A., CID D. : Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic calves. *Veterinary Microbiology* ; (1999) **66** , 265-273.
- 56.** ORDEN J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA J.A., CID D. : Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology* ; (1998) **63** , 239-248.
- 57.** OSEK J., WINIARCZYK S. : Prevalence of *eae* and shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from healthy calves. *Vet. Med. B* ; (2001) **48** , 67-72.
- 58.** OSEK J., GALLIEN P., PROTZ D. : Characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* ; (2000) **23** , 267-276.
- 59.** OSWALD E., SCHMIDT H., MORABITO S. : Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* : characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity* ; (2000) **68-1** , 64-71.
- 60.** POHL P., OSWALD E., VAN ROBAYES G. : Tests simples pour le diagnostic présumé des *Escherichia coli* isolées principalement chez les bovins et productrices des cytotoxines nécrosantes (CNF). *Ann. Méd. Vét.* ; (1993) **137** , 503-505.
- 61.** POHL P., DAUBE G., MAINIL J. : Facteurs de virulence et phénotypes de soixante et une souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF1). *Ann. Rech. Vét.* ; (1992) **23** , 83-91.
- 62.** POHL P., OSWALD E., VAN MUYLEN K. : *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Veterinary Research* ; (1993) **24** , 311-315.
- 63.** POHL P., LIMBOURG B., STOCKMANS A. : Prévalence et caractères des *Escherichia coli* 0157 isolées des bovins en Belgique. *Ann. Méd. Vét.* ; (1994) **138** , 195-197.

- 64.**PRUIMBOOM-BREES I.M., MORGAN T.W., ACKERMANN M.R. : Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; (2000) **97-19** , 10325-10329.
- 65.**RENWICK S.A., WILSON J.B., CLARKE R.C. : Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. The Journal of Infectious Diseases ; (1993) **168** , 791-793.
- 66.**RIPPERE-LAMPE K.E., O'BRIEN A.D., CONRAN R. : Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli* . Infection and Immunity ; (2001) **69-6** , 3954-3964.
- 67.**RIPPERE-LAMPE K.E., LANG M., CERI H. : Cytotoxic necrotizing factor type 1-positive *Escherichia coli* causes increased inflammation and tissue damage to the prostate in a rat prostatitis model. Infection and Immunity ; (2001) **96-10** , 6515-6519.
- 68.**RONDEAU E., PERALDI M.N. : *Escherichia coli* and the hemolytic-uremic syndrome. The New England Journal of Medicine ; (1996) **335-9** , 660-662.
- 69.**TESH V.L., O'BRIEN A.D. : Adherence and colonization mechanisms of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Microbial Pathogenesis ; (1992) **12** , 245-254.
- 70.**THOMAS W., ASCOTT Z.K., HARMEY D. : Cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli* induces RhoA-dependent expression of the cyclooxygenase-2 gene. Infection and Immunity ; (2001) **69-11** , 6839-6845.
- 71.**SANDHU K.S., CLARKE R.C., GYLES C.L. : Virulence markers in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle. Can. J. Vet. Res. ; (1999) **63** , 177-184.
- 72.**SARIKADIS H.O., EL GARED S.A., VIDOTTO M.C. : Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. Veterinary Microbiology ; (1997) **54** , 145-153.
- 73.**SCHELCHER F., DE RYCKE J., MARTEL J.L. : Diarrhées colibacillaires néonatales du veau. Le Point Vétérinaire ; (1993) **25** , 611-623.
- 74.**SHINAGAWA K., KANESHIRA M., OMOE K. : Frequency of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle at a breeding farm and at a slaughterhouse in Japan. Veterinary Microbiology ; (2000) **76** , 305-309.
- 75.**STORDEUR P., CHINA B., CHARLIER G. : Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. Microbes and Infection ; (2000) **2** , 17-24.

- 76.** VAN BOST S., BÂBE M.H., JACQUEMIN E. : Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Veterinary Microbiology* ; (2001) **82** , 311-320.
- 77.** VAN BOST S., MAINIL J. : Reproduction of lesions and clinical signs with a CNF2-producing *Escherichia coli* in neonatal calves. *Adv. Exp. Med. Biol.* ; (1999) **125** , 125-128.
- 78.** VAN BOST S., ROELS S., MAINIL J. : Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. *Veterinary Microbiology* ; (2001) **81** , 315-329.
- 79.** WELLS J.G., SHIPMAN L.D., GREENE K.D. : Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology* ; (1991) **29-5** , 985-989.
- 80.** WIELER L.H., BAUERFEIND R., WEISS R. : Association of enterohemolysin and non-fermentation of rhamnose and sucrose with shiga-like toxin genes in *Escherichia coli* from calves. *Zbl. Bakt.* ; (1995) **282** , 265-274.
- 81.** WIELER L.H., TIGGES M., EBEL F. : The enterohemolysin phenotype of bovine shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene. *Veterinary Microbiology* ; (1996) **52** , 153-164.
- 82.** WIELER L.H., BAUERFEIND R., BALJER G. : Characterization of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zbl. Bakt.* ; (1992) **276** , 243-253.
- 83.** WILSON J.B., McEWEN S.A., CLARKE R.C. : Distribution and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol. Infect.*; (1992) **108** , 423-439.
- 84.** WRAY C., PIERCY D.W., CARROLL P.J. : Bovine haemorrhagic colitis associated with CNF+ and F6+ (987P) *E. coli*. *Veterinary Record* ; (1992) **131** , p 220.
- 85.** WRAY C., PIERCY D.W., CARROLL P.J. : Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Research in Veterinary Science* ; (1993) **54** , 290-298.
- 86.** YURI K., NAKATA K., KATAE H. : Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.* ; (1998) **60-3** , 287-290.
- 87.** ZSCHÖCK M., HAMANN H.P., KLOPPERT B. : Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats : prevalence and virulence properties. *Letters in Applied Microbiology* ; (2000) **31** , 203-208.

