



HAL
open science

Caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* O111 et diversité des souches isolées en France

Julien Tap

► **To cite this version:**

Julien Tap. Caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* O111 et diversité des souches isolées en France. Microbiologie et Parasitologie. 2004. hal-03825741

HAL Id: hal-03825741

<https://hal.inrae.fr/hal-03825741>

Submitted on 23 Oct 2022

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

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



UFR sciences et technologie
IUP SIAL
Biotechnologie et bio-industries
61 Avenue du Général De Gaulle
94000 Créteil
Tuteur de stage : Mr Truan

Unité Biodiversité Bactéries Pathogènes
Emergentes
Centre national de référence
des *Escherichia coli* et *Shigella*
25-28 rue du Dr Roux
75015 Paris
Maître de stage : Mme F Grimont

Caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* O111
et
diversité des souches isolées en France

Rapport de stage avril-juillet 2004

Julien Tap

Remerciements

Je tiens tous d'abord à remercier Patrick Grimont, responsable de L'unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes, de m'avoir accueilli et fait confiance pour ce projet d'étude.

Je présente également mes vifs remerciements à Francine Grimont, responsable du Centre National de Référence des *E. coli* et *Shigella*, pour m'avoir donné de précieux conseils rendant mon stage très enrichissant.

Je remercie particulièrement Isabelle Carle et Karine Le Roux, techniciennes du CNR *E. coli* et *Shigella*, de m'avoir guidé tout au long de mes manipulations.

Merci enfin à toutes les personnes du laboratoire pour leur accueil dans l'unité.

Résumé

Escherichia coli est un hôte normal de la flore intestinale. De ce fait, pour l'industrie agroalimentaire, c'est un bon indicateur de contaminations feco-orales. Cependant certains **sérotypes** (définis par la combinaison des **antigènes somatiques O** et **flagellaires H**) ou sérogroupes (définis par l'antigène somatique seul) de cette espèce peuvent être pathogènes, c'est le cas pour des O157 : H7, O26, ou O111. Ils peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires collectives et plus gravement du **Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU)** lorsque la bactérie incriminée d'après ses gènes de pathogénicité est un *Escherichia coli* entérohémorragique ou EHEC.

Le Centre National de Référence des *E. coli* et *Shigella* est chargé de caractériser les *E. coli* pathogènes, de détecter leurs gènes de pathogénicité, et de participer à l'investigation de phénomènes épidémiques. Cela s'effectue, tout d'abord, grâce à la sérotypie à l'aide de sérums, au **sérotypage moléculaire** permettant de déterminer le sérotype, puis par la recherche de **gènes de pathogénicité** qui permet de définir le **pathovar de *E. coli***. Les techniques de **ribotypie** et de **pulsotypie**, qui sont des marqueurs épidémiologiques, permettent une identification moléculaire plus précise, contribuant à des analyses épidémiques plus poussées.

La caractérisation moléculaire des *E. coli* du **sérogroupe O111** et la détection des facteurs de pathogénicité ont montré qu'il existait parmi les souches une grande diversité antigénique et pathogénique, une bonne corrélation entre sérotypes et pathovars. Cette étude démontre que le sérotypage ne suffit pas et qu'il faut rechercher aussi les gènes de pathogénicité. La pulsotypie par une forte discrimination montre aussi une très grande diversité au sein du sérogroupe O111..

Mots clés : *Escherichia coli*, sérotypes, sérogroupe O111, Antigènes somatiques O et flagellaires H, Syndrome Hémolytique et Urémique, sérotypage moléculaire, gènes de pathogénicité, pathovar de *E. coli*, ribotypie, pulsotypie.

Abstract

Escherichia coli is a normal host of intestinal flora. Thus, for food industry, it is a good indicator of feco-oral contaminations. However, some **serotypes** (defined by the combination of **somatic O and flagellar H antigens**), or serogroups, (just defined by the antigen O alone) of this species can be pathogenic: it is the case for O157:H7, O26, or O111. They can be potentially responsible for collective food toxi-infections and more seriously for the **Haemolytic and Uraemic Syndrome** (HUS) due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)

The Reference National Center for *E. coli* and *Shigella* is in charge of characterizing pathogenic *E. coli* and detecting their pathogenicity genes, and participating to epidemic investigation. This is done, first of all, by using serotyping with sera, **molecular serotyping** which can determine the serotype, then by the detection of **pathogenicity genes** which can define **pathovars of *E. coli***. **Ribotyping** and **PFGE typing** techniques, which are epidemiological markers, allow a more precise molecular identification, and contribute to epidemic analysis.

The molecular characterization of the **serogroup O111** of *E. coli* and the pathogenicity factor detection showed there were a great antigenic and pathogenic diversity among these strains, and a good correlation between serotypes and pathovars. This study demonstrated that serotyping is not sufficient and pathogenicity genes should be searched for. PFGE typing, being highly discriminative, showed a large diversity within serogroup O111.

Key words: *Escherichia coli*, serotypes, serogroup O111, somatic O and flagellar H antigens, Haemolytic and Uraemic Syndrome, molecular serotyping, pathogenicity genes, pathovar of *E. coli*, ribotyping, PFGE typing

Sommaire

REMERCIEMENTS

RÉSUMÉ

ABSTRACT

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : SÉROTYPES ET PATHOVARS DE *ESCHERICHIA COLI* RESPONSABLE DE DIARRHÉES

3

A. ANTIGÈNES ET SÉROTYPAGE	3
1. <i>Les antigènes somatiques O</i>	3
2. <i>Les antigènes flagellaires H</i>	4
B. LES DIFFÉRENTS PATHOVARS DE <i>E. COLI</i>	5
1. <i>Les E. coli entéropathogènes (EPEC)</i>	5
2. <i>Les E. coli entéroadhérents ou aggrégants : EAEC</i>	7
3. <i>Les E. coli entérohémorragiques (EHEC) ou STEC</i>	7
4. <i>Les E. coli entérotoxigènes (ETEC)</i>	10
5. <i>Les E. coli entéroinvasifs (EIEC)</i>	11

II. REVUE EXPERIMENTALE : LE SÉROGROUPE O111

13

A. OBJECTIFS.....	13
B. MATÉRIELS ET MÉTHODES	13
1. <i>Descriptions des souches étudiées</i>	14
2. <i>Détermination de l'antigène somatique O de E. coli par séro-agglutination</i>	15
3. <i>Extraction d'ADN</i>	15
4. <i>Sérotypage moléculaire</i>	16
5. <i>Détection des gènes de pathogénicité « stx », « eae », « bfpA », « affI »</i>	21
6. <i>Ribotypie : restriction par MluI</i>	26
7. <i>Électrophorèse en champs pulsés avec restriction par XbaI</i>	27
C. RÉSULTATS	29
1. <i>Séro-agglutinations, sérogroupage moléculaire des E. coli O111</i>	29
2. <i>Analyse moléculaire du gène fliC et détermination des profils F des E. coli O111</i> ..	30
3. <i>Recherche des gènes de pathogénicité : stx, eae, bfp, affI</i>	30
4. <i>Pulsotypie</i>	31
D. DISCUSSIONS.....	32
1. <i>Fiabilité des sérums et sérogroupage moléculaire</i>	32
2. <i>Corrélations entre le sérotype, le ribotype et la pathogénicité</i>	33
3. <i>Diversité des E. coli O111</i>	35

CONCLUSION

36

BIBLIOGRAPHIE

37

TABLE DES ILLUSTRATIONS

39

Introduction

De la famille des Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* est un hôte normal de la flore intestinale. Cette bactérie est un bacille à mobilité péritriche et négative à la coloration de Gram. Découvert en 1855 par Thomas Escherich, *E. coli* est un germe commensal de l'intestin et se retrouve dans les fèces.

E. coli est thermophile avec une température de croissance, comprise entre 15°C et 45°C avec un optimum à 37°C. Sa culture admet une grande tolérance de variation de pH et le pH optimum est de 7,5. *E. coli* fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz. Il reste relativement sensible aux antibiotiques. Il réduit les nitrates en nitrites et dégrade le tryptophane en indole.

En industrie agroalimentaire, *E. coli* est particulièrement contrôlé. En effet, il est un bon indicateur de la contamination fécale d'un aliment lors de son processus de fabrication. Par ailleurs, à partir de 10 000 *E. coli* par gramme, l'aliment est corrompu.

Mais cette espèce ordinairement commensale est entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence éventuellement acquis et /ou constitutifs. C'est ainsi que *E. coli* fut responsable en 1982 du syndrome hémolytique et urémique (SHU) provoquant le décès d'une quarantaine de personne aux Etats-Unis. Ceci témoigne de la grande faculté d'adaptation de *E. coli* à son environnement grâce aux échanges génétiques entraînant l'apparition de souches pathogènes.

En prévention, une surveillance nationale des SHU a lieu au Centre National de Référence des *E. coli*, situé dans l'unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes à l'Institut Pasteur, qui est chargé d'étudier les souches pathogènes.

Depuis une cinquantaine d'années, les bactériologistes ont essayé, grâce aux différences antigéniques de *E. coli*, de subdiviser l'espèce en sérotypes en immunisant des lapins avec des antigènes somatiques et flagellaires. La sérotypie reste la méthode la plus utilisée et la plus utile encore actuellement. Le sérotype est la combinaison des 2 antigènes, somatique O et flagellaire H, (ex : O157 : H7 et O111 : H8), et le séro groupe est déterminé que par l'antigène O (ex : O157, O111). Cependant le sérotype n'est pas suffisant pour caractériser les *E. coli* pathogènes. Il est nécessaire de bien étudier chaque sérotype, qui n'est pas nécessairement relié à la pathogénicité.

Cette étude se porte uniquement sur des souches de *E coli* du sérogroupe O111 qui avaient agglutiné dans le sérum O111 au moment de l'isolement, isolées en France et qui avaient été responsables de diarrhées, et de syndrome hémolytique et urémique. Après une introduction sur les sérotypes et pathovars de *E. coli*, l'objectif de cette étude est d'effectuer la caractérisation moléculaire des *E coli* O111, de comparer leurs gènes de pathogénicité et d'apprécier leur diversité.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : Sérotypes et pathovars de *Escherichia coli* responsable de diarrhées

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

Cent soixante dix antigènes O et 55 antigènes H sont actuellement reconnus, mais plus de 5 000 sérotypes pourraient exister. Afin de reconnaître ces antigènes par agglutinations, des sérums sont fabriqués en immunisant des lapins. Un sérum renferme des anticorps dirigés contre les facteurs des antigènes somatiques O des *E. coli* homologues et produit une réaction antigène-anticorps, se traduisant par des agglutinations visibles à l'œil nu, permettant de déterminer l'antigène O. Cette technique est pratique si la diversité des antigènes est faible mais irréalisable si elle est élevée. [1, 3, 4, 13, 18]

A. Antigènes et sérotypage

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

1. Les antigènes somatiques O

Les antigènes somatiques sont composés de lipopolysaccharides complexes. Actuellement certains laboratoires d'analyses médicales utilisent l'agglutination avec des sérums pour déterminer le sérogroupe, mais cette technique est limitée par le nombre de plus en plus élevé de sérums à fabriquer, par la présence d'agglutinations croisées entre les antigènes O de *E. coli*, *Shigella* et ceux de *Salmonella*, et par le passage de la consistance crémeuse de la colonie à une consistance rugueuse ayant pour conséquence l'absence de synthèse de l'antigène O. C'est pour cette raison qu'une technique de sérotypage moléculaire a été développée.

L'antigène O fait partie du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries à gram négatif. Il contient un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides de 3

à 6 sucres dont la combinaison détermine la diversité des antigènes O. Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le cluster de gènes *rfb*. [5, 7, 17]

Ce cluster *rfb* peut être amplifié spécifiquement grâce à un système d'amorces puis, après restriction par l'endonucléase *MboII*, un profil noté « R » peut être obtenu par électrophorèse, correspondant à un sérotype de *E. coli* (Coimbra et al., 2000). Un profil d'électrophorèse est fonction de l'emplacement des sites de restriction propre à *MboII*. Ainsi tous les clusters de gènes correspondant à un antigène somatique auront un profil de restriction qui lui est propre. Ce profil R sera ensuite analysé avec le logiciel Taxotron® puis comparé à une base de données, en perpétuel développement. Par exemple, le profil R aura un numéro R111, correspondant au sérotype O111 obtenu avec le sérum.

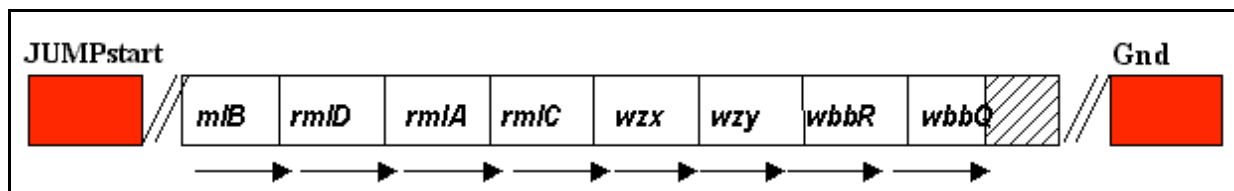


Figure 1: Le cluster des gènes de l'antigène O (*rfb*) AFSSA 2003

Gnd = 6-phosphogluconate déhydrogénase et JUMPstart = Just Upstream of Many Polysaccharide-associated gene Starts

2. Les antigènes flagellaires H

La diversité des antigènes H est due aux différents types de flagelline composant la structure du flagelle. C'est le flagelle qui permet la mobilité bactérienne. Le typage s'effectue également par séro-agglutination, mais n'est développé que dans de très rares laboratoires dans le monde. Cependant, certaines souches perdent leur mobilité et sont classées comme non mobile (NM ou H-). Une technique de sérotypage moléculaire a donc été également développée pour déterminer l'antigène H. [10, 19]

L'antigène H est codé par le gène *fliC*. Les parties N et C terminales de la flagelline sont très conservées et c'est la partie médiane, plus variable, qui donne la spécificité de l'antigène H. Les *E. coli* immobiles possèdent également le gène *fliC* mais sont incapables de synthétiser un flagelle fonctionnel. Après amplification et restriction du gène *fliC*, il est possible de typer l'antigène H en comparant le profil obtenu à une base de données de profil-type (Machado et

al, 1998). Par exemple, le profil *fliC* (noté F) aura un numéro F8, correspondant au type H8 obtenu avec le sérum. [10]

B. Les différents pathovars de E. coli

Les souches de *E. coli*, agents de diarrhées, forment un groupe très hétérogène au regard des mécanismes en cause dans leur pathogénicité. Un pathovar est un taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par son pouvoir pathogène. Certains sérotypes sont pathogènes et peuvent être associés à un ou plusieurs pathovars qui sont classées en fonction des signes cliniques engendrés.

Ces pathovars sont les suivants :

- Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)
- Les *Escherichia coli* entéroadhérents ou aggrégants (EAEC)
- Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)
- Les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC)
- Les *Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC)

Certains sérotypes, comme les O157 et les O111, sont plus fréquemment isolés que d'autres et sont souvent associées à un ou plusieurs pathovars [1, 3, 4, 13, 18].

1. Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC)

Les souches EPEC sont responsables de diarrhées aqueuses et de gastro-entérites infantiles (GEI). L'infection s'effectue initialement par l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales, et a posteriori par la capacité d'une protéine membranaire, l'intimine, à causer des lésions d'attachement et d'effacement. Il existe deux classes d'EPEC, les EPEC de classe I ayant une adhérence localisée et les EPEC de classe II ayant une adhérence diffuse sur toute la paroi cellulaire des entérocytes. [13]

a) Épidémiologie

Les EPEC ont été les premiers *E. coli* décrits comme responsables de diarrhées. Au début des années 1950, dans les pays développés, notamment en France, les EPEC ont été responsables de gastro-entérites infantiles ou GEI, causant la mort de nombreux nourrissons

dans les crèches. C'est pourquoi de nombreux sérums furent développés pour détecter par agglutination les sérogroupes dits EPEC.

Actuellement, la gastro-entérite due aux EPEC sévit fréquemment dans de nombreux pays d'Amérique centrale, d'Amérique latine, dans les régions tropicales et dans les pays en voie de développement. En Amérique du Sud, notamment au Brésil, les EPEC pourraient représenter la première ou la seconde cause de diarrhées infantiles. Les sérogroupes principalement responsables de ces épidémies sont O111 et O26. [3, 4, 6, 8, 13, 14, 18]

b) Le BFP : adhésion localisée à l'entérocyte

La première étape d'interaction entre la bactérie EPEC et les cellules hôte est une adhésion localisée (LA) sous forme de petits amas bactériens très serrés par l'intermédiaire de pili en faisceaux « BFP » (bundle-forming pilus) codés par l'opéron *bfp*, situé sur un gros plasmide EAF de 95 kpb. Le BFP fait partie des pili de type IV. L'opéron *bfp* est composé de 14 gènes et son expression est régulée par le promoteur *bfpA*. [4, 6, 8, 12, 18]

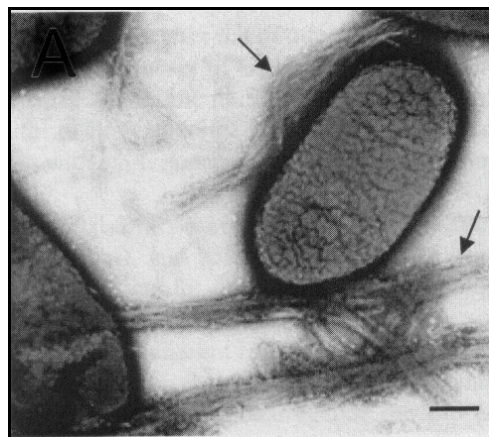


Figure 2: Visualisation des structures du BFP produit par une souche EPEC (O55 : H6) sur gélose agar [6]. *Journal of clinical microbiology* 2002

c) Attachement et effacement des microvillosités

La formation de lésions d'attachement et effacement (A/E) est une caractéristique majeur de l'infection des EPEC, due à une protéine de membrane externe de 94 KDa appelé l'intimine, codée par le gène *eae*, situé sur un îlot de pathogénicité du chromosome le locus d'effacement de l'entérocyte (LEE). Le LEE est composé de 41 gènes incluant le gène *ett2* codant un système de type III [12, 13, 15, 20].

La pathologie induite par les lésions A/E est caractérisée par une forte adhérence de la bactérie sur les entérocytes, par l'effacement des microvillosités (MV) et la destruction du cytosquelette de la cellule affectée (Figure 3).

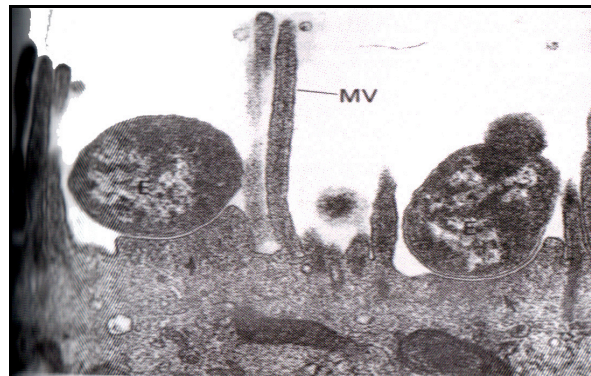


Figure 3 : observations microscopiques des liaisons A/E sur des entérocytes humains [1]
AFSSA 2003

Dans la zone en contact étroit avec la bactérie, une forte condensation de filaments d'actine est observée. Il s'en suit une activation de la protéine kinase C provoqué par l'augmentation d'ion calcium dans les entérocytes. Ces mécanismes provoqueraient une diarrhée due à une perte de capacité d'absorption des entérocytes et à une hypersécrétion d'eau et d'ions. [13]

2. Les *E. coli* entéroadhérents ou aggrégants : EAEC

Répanus dans les pays en voies de développement, les *E. coli* entéroadhérents ou aggrégants sont responsables de diarrhées persistantes et sont considérés comme des entéro-pathogènes émergents. Les EAEC possèdent des propriétés aggrégatives (sous forme de briques empilées) dues à des fimbriae I (AAF/1), codées par le gène *aff/I*, situé sur un plasmide de 60 MDa, provoquant une nécrose des pôles apicaux des microvillosités. Par l'intermédiaire de ce même plasmide, les EAEC peuvent synthétiser une toxine thermostable EAST1 (enteroaggrégative *E. coli* heat stable enterotoxin) codés par le gène *astA*. EAST1 possède une homologie fonctionnelle partielle de 50% avec la toxine thermostable (STa) des ETEC. Ceci tend à confirmer les similarités pathogéniques entre les ETEC et les EAEC. [3, 13]

3. Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) ou STEC

L'émergence de ce pathovar commence à poser un problème de Santé Publique en France. Les souches de *Escherichia coli* entérohémorragiques ou EHEC sont maintenant

connues pour être les principaux agents infectieux responsables des diarrhées hémorragiques appelées colites hémorragiques. En cas de complication, ils peuvent entraîner un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les réservoirs sont surtout les bovins, ovins, caprins... Ils sont qualifiés de pathogènes émergents.

Le sérotype principalement mis en cause est le *E. coli* O157:H7. Toutes les souches de sérotypes connus ou inconnus, porteuses de gènes codant une shiga-toxine (*stx*) ont la dénomination STEC (Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*). Le terme EHEC décrit des souches de STEC qui ont été pathogènes pour l'homme. [1, 2, 4, 9, 13, 15]

a) Épidémiologie

En 1982, isolés pour la première fois, les EHEC ont été à l'origine aux Etats-Unis de deux épidémies de colite hémorragique sévère, nécessitant une hospitalisation de 70 % des malades. Ce sont des hamburgers insuffisamment cuits, provenant d'une chaîne de restauration rapide, qui furent les aliments incriminés. [1]

Les bovins et autres ruminants représentent le réservoir principal des EHEC. De nombreuses épidémies ont été associées à de la viande de bœuf (USA, Canada, GB, Japon, Australie) et à des fromages à base de lait cru. Une grande variété de produit alimentaire a été également impliquée dans des épidémies d'infections à EHEC, comme les yaourts, les saucisses fermentées, le jus de pomme, les graines germées et la laitue. En 1996, deux épidémies de EHEC, l'une au Japon ayant affecté plus de 5700 personnes et l'autre en Ecosse responsable de 20 décès, ont montré l'extension possible et la gravité de cette infection. [1]

En France, quelques foyers épidémiques comprenant respectivement 10 et 4 cas ont été décrits en 1992 dans les départements de l'Oise et du Cher. Cent trente cas de SHU ont ainsi été décelés parmi la population pédiatrique entre mars 1995 et avril 1996, avec une incidence supérieure à 1,8/100.000 chez les enfants de moins de 5 ans. Plus récemment, deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été détectées et investiguées, l'une en décembre 2000 avec un *E. coli* O157 : H7, et l'autre, en juin 2000 liée à un STEC non O157, incriminant de la viande de mouton. [1]

Dans la moitié des cas les souches de *E. coli*, responsables de SHU et isolées des selles de patients appartiennent au sérotype O157:H7, mais d'autres sérogroupes sont incriminés, parmi eux: O111, O26, O103, O55, O128, mais également d'autres *E. coli* non agglutinants avec les sérums existants dans le commerce. [1, 3, 13]

b) Mode de contamination

Le mode de contamination est décrit principalement par contact indirect lors de l'ingestion d'un aliment corrompu. Également le contact direct avec des animaux de ferme ou d'une eau contaminée est mis en cause. La contamination directe de personne à personne est exceptionnelle, elle a lieu lors de contact direct féco-oral. [1, 13]

c) Manifestations cliniques

La période d'incubation est normalement de 3 à 4 jours, mais des périodes de 5 à 8 jours ou de 1 à 2 jours de ne sont pas exceptionnelles. Les nourrissons et les enfants de moins de trois ans ainsi que les personnes âgées présentent un risque élevé de développer un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ce syndrome est caractérisé par une anémie hémolytique due à une diminution de la durée de vie des érythrocytes un taux de plaquettes bas et une insuffisance rénale. Le taux de létalité est compris entre 2 et 7 % avec des séquelles à long terme comme des lésions rénales ou neurologiques, ou de l'hypertension dans 12 à 30 % des cas. [1, 13]

Le SHU peut évoluer plus rarement par un purpura thrombocytopénique thrombotique (TTP). Des séquelles rénales ou neurologiques peuvent subsister.

d) Pathogénicité

La virulence des EHEC est due à la production de toxine caractéristique appelé shiga-toxine en raison de leur similitude avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae* 1. Elles sont également appelées vérotoxine (VT) en raison de leur activité cytotoxique sur les cellules Véro ou HeLa. Ces toxines ont un effet léthal sur les cellules nerveuses, entérocytes et rénal pouvant causer la mortalité du patient.

Codés par les gènes *stxA* et *stxB*, il existe deux types de shiga-toxines: Stx1 et Stx2 avec plusieurs variants (Stx2 c, d, e et f). Les gènes *stx* sont d'origine phagique c'est-à-dire que la bactérie a été lysogénisée par un phage lui induisant la faculté de produire ces toxines.

Ces toxines sont des hétéro-polymères de 70 kDa constitués d'une sous-unité A d'activité N-glycosidasique, bloquant l'élongation peptidique et inactivent les sous-unités ribosomiques, et de 5 sous unités B de fixation permettant une interaction glycolipidique sur

les récepteurs cellulaires Gb3. Ces deux sous-unités sont codées respectivement par le gène *stxA* et *stxB*. [1, 13]

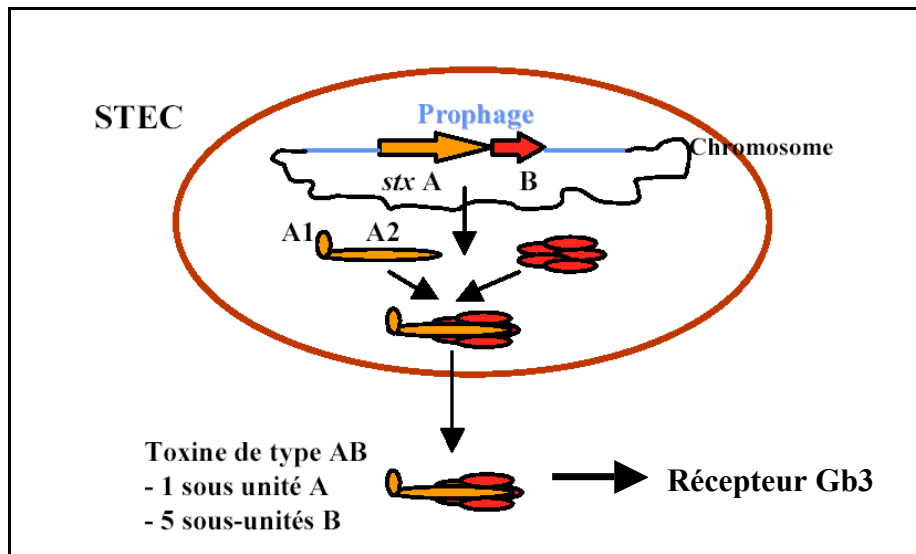


Figure 4: Facteurs de pathogénicité majeurs.[1] AFSSA 2003

Comme les EPEC, les EHEC ont aussi le gène *eae* leur permettant d'induire des liaisons d'attachement et d'effacement. Cependant, contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, il a été montré que l'adhésion des EHEC se limitait à l'épithélium folliculaire. D'autre part, il semblerait que le plasmide EAF (présent chez les EPEC) soit absent chez les EHEC ce qui conduit à penser que d'autres facteurs extérieurs semblent indispensables à l'établissement de liaisons A/E. [1, 13]

Un autre phénotype hémolytique a été mis en évidence, chez les EHEC, dû à une protéine E-hlyA: l'entérohémolysine. Codée par le gène d'origine plasmidique *E-hlyA*, la protéine E-hlyA possède une activité cytolytique liée à la capacité de former des pores conduisant la lyse des cellules cibles. [1]

4. Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)

Le mode d'infection des ETEC s'effectue tout d'abord par la colonisation de l'intestin grêle nécessitant des facteurs d'adhésion sous forme de fimbriae puis par la production d'entérotoxines thermostable (ST) et thermolabile LT. [3, 13]

Les fimbriae sont des appendices filamenteux, rigides, formés de sous unités protéiques, et de diamètre inférieur à celui des flagelles. Ces structures souvent appelées adhésines ne sont pas exclusives des ETEC. Il existe aussi des fimbriae d'adhésion spécifique

chez les EPEC. Les gènes codant pour ces adhésines sont plasmidiques et sont organisés en opérons.

Les entérotoxines sont la cause d'une diarrhée aqueuse accompagnée d'une profonde déshydratation. Les entérotoxines thermolabiles font parties de la famille des entérotoxines cytotoniques dont fait partie la toxine cholérique. Les ETEC peuvent produire une ou plusieurs toxines en combinaison.

Les toxines LT stimulent la production d'AMP cyclique dans les cellules cibles. Après pénétration dans la cellule, le clivage protéolytique et la réduction d'un pont disulfure entraînent une activation permanente de l'adénylate-cyclase et à la transformation de l'ATP en AMP cyclique. Ceci contribue par corollaire à augmenter la sécrétion d'ion Cl⁻ et conduit à une fuite passive d'eau entraînant une diarrhée aqueuse. Les entérotoxines thermostables ST sont moins connues mais elles engendrent de même un flux d'eau dans les entérocytes. Ces entérotoxines thermostables sont décrites chez *Vibrio cholerae* non O1 [3, 13].

5. Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC)

Le pathovar EIEC, rare ou moins connu, concerne des sérotypes particuliers comme O28: H-, O112: H-, O124: H3O. Les EIEC constituent ainsi le lien entre les shigelles et les *E. coli* du point de vue taxonomique. Les EIEC ont la capacité d'envahir les cellules épithéliales au niveau du colon avec une multiplication intracellulaire provoquant la mort de la cellule. La dysenterie engendrée est caractérisée par des crampes abdominales et par la présence d'un mucus sanglant dû à la destruction des cellules du colon. L'invasion requiert plusieurs gènes situés sur le plasmide de virulence de 220 Kpb et sur le chromosome travaillant ensemble pour une expression clinique et moléculaire de la maladie. [3, 13]

Tableau 1: Pathovars de Escherichia coli responsables d'infections intestinales [3, 13, 15]

Pathovars	Syndrome clinique	Actions sur les entérocytes	Gènes virulence
EPEC	Diarrhée aqueuse aiguë et persistante	Adhésion localisée	<i>bfp, eae</i>
EAEC	Diarrhée aqueuse aiguë et persistante	Adhésion agrégative	<i>astA, aff/I</i>
EHEC	Diarrhée aiguë, Colite hémorragique, SHU, TTP	Pas d'invasion Lésions A/E	<i>stx, eae</i>
ETEC	Diarrhée cholériforme diarrhée du voyageur	Adhésion	<i>lt, st</i>
EIEC	Dysenterie Diarrhée de l'adulte	Invasion	<i>inv, IpaH</i>

Le tableau 1 présente une synthèse sur les différents pathovars associés aux signes cliniques engendrés, à leur action sur les entérocytes et aux gènes caractéristiques responsables de la pathogénicité.

II. REVUE EXPERIMENTALE : Le sérotype O111

Beaucoup de publications ont été faites sur les EHEC les plus connus le sérotype O157 : H7, mais les autres sérogroupes sont classés par pathovars en fonction des enquêtes épidémiologiques. Ainsi les *E. coli* O111 ont été responsables de gastro-entérites infantiles et ont été décrits comme EPEC. C'est pourquoi il existe dans le commerce un sérum pour les agglutiner. Aujourd'hui, ils sont toujours considérés comme EPEC. Cependant il n'y a pas de relation établie entre le pathovar et le sérotype mais seulement des données expérimentales. Les O111 ont été décrits également comme des EHEC, responsables de SHU.

La pathogénicité étant dû à la présence de gènes de virulence, les O111 sont-ils toujours pathogènes ?

A. Objectifs

Dans la littérature, des SHU ont été décrits avec des souches *E. coli* de sérotype O111 :H2, O111 :H8, O111 : HNM (non mobile). Des STEC ont été aussi décrits avec des sérotypes O111 :H30, O111 :H34. Des EPEC ont été décrits O111ab : H-, O111ab :H2, O111ab :H12 et O111ab : H21.

Les objectifs de cette étude seront d'une part de déterminer les caractéristiques génétiques des *E. coli* O111 reçues en France et d'autre part d'étudier la diversité des O111. Ceci permettra dans un premier temps de juger de la fiabilité des sérums en les comparant à la technique du sérotypage moléculaire, puis dans un deuxième temps d'établir les corrélations entre le sérotype et le pathotype et enfin, dans un troisième temps, avec des techniques poussées d'électrophorèses sur champs pulsés et de ribotypie d'analyser la diversité des *E. coli* O111.

B. Matériels et méthodes

Dans la première partie de cette étude, il s'agira de vérifier par séro-agglutination et par sérotypage moléculaire que les souches étudiées sont du sérotype O111. Après le typage par une méthode moléculaire des antigènes O et H, la recherche des gènes de virulences caractéristiques des pathovars EHEC (*stx*, *eae*), EPEC (*bfpA*, *eae*) et EAEC (*aff/I*) sera effectuée par amplification PCR. Enfin, les méthodes d'électrophorèse en champs pulsés

(pulsotypie) et la ribotypie seront utilisées à des fins d'études épidémiologiques tout en élargissant la base de données sur les *E. coli* O111.

1. Descriptions des souches étudiées

Quarante-six souches de *E. coli*, d'origine clinique, isolées en France de 1950 à 2003 et agglutinant avec le sérum anti-O111 au CNR ont été étudiées (Tableau 2)

Tableau 2 : Références des souches *E. coli* étudiées

année	N°BBPE	ages	signes cliniques	origine géographique
1950	ec stoke		Diarrhée	
1950	ec 217		Diarrhée	
1950	Ec 210		Diarrhée	
1950	Ec 203		Diarrhée	
1951	Ec 250		Diarrhée	humain, feces Paris, France
1951	16604		Diarrhée	humain, feces lille, France
1952	(52)-168	enfant	Diarrhée	feces, UK
1986	(04)-02159		Diarrhée	idaho,USA
1993	(93)-35		SHU	Beauvais
1993	(93)-32		SHU	Beauvais
1997	(97)-12515	<1an	Diarrhée	91 Orsay
1998	(98)-441		Diarrhée	Anna Giammanco
1998	(99)-168		Diarrhée	
1999	(99)-9719	<1an	Diarrhée	75 paris
1999	(99)-9718	<1an	Diarrhée	75 paris
1999	(04)-02157	h?	Diarrhée	76 montville France
1999	(04)-02158	enfant	Diarrhée	France
1999	(99)-7809	1-5ans	Diarrhée	80 amiens
1999	(99)-8003	1-5ans	Diarrhée	35 pace
2000	(00)-6738	1-5ans	Diarrhée	95 Goussainville
2000	(00)-4914	<1an	Diarrhée	85 Montaigu
2000	(00)-8649	1-5ans	Diarrhée	75 Paris
2000	(00)-3196	>65ans	anémie hémocult	59 Dunkerque
2000	(00)-1395	<1an	Diarrhée	35 Pace
2000	(00)-2564	33ans	entérite néerosante DECES	75 Paris
2001	(01)-6923	1-5ans	Diarrhée	66 toulouges
2001	(01)-1358	1-5ans	Diarrhée	35 pace
2001	(01)-6097	1-5ans	Diarrhée	31 toulouse
2002	(04)-02160		Diarrhée	
2002	(02)-1831		Diarrhée	
2002	(02)-2296		Diarrhée	76 bolbec
2003	(03)-1085	1-5ans	Diarrhée	30 Nimes
2003	(03)-7090		Diarrhée	78 les Mureaux
2003	(03)-9694	<1an	Diarrhée	92 Anthony
2003	(03)-8910		Diarrhée	R-D amiens
2003	(03)-8909		Diarrhée	R-D amiens
2003	(03)-8908		Diarrhée	R-D Beauvais
2003	(03)-8911		Diarrhée	R-D Beauvais
2003	(03)-8912		Diarrhée	R-D Beauvais
2003	(03)-8913		Diarrhée	R-D Beauvais
2003	(03)-7726	<1an	Diarrhée	23 La souterraine
2003	(03)-384	<1an	Diarrhée	78 Andresy
2003	(03)-0345		Diarrhée	75 paris
2003	(03)-9555	<1an	Diarrhée	91 orsay
2003	(03)- 3611		Diarrhée	16 St Michel
2003	(03)-7871	<1an	Diarrhée	23 La souterraine

Les souches étudiées sont répertoriées dans le CNR des *E. coli* comme des *E. coli* O111. Elles ont toutes été pathogènes pour l'homme et ainsi isolées en conséquence. Dix-neuf ont été responsables de GEI chez des enfants de moins de cinq ans et ont été classées comme EPEC.

Les souches N° 52-168 et 04-02159 sont des souches de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) isolés respectivement au Royaume-Uni et aux Etats-Unis. Les souches 04-02157, 04-02158, sont également de la CIP. Cependant, il est important de noter que 02-1831 et 04-02160 correspondent à la même souche et il sera intéressant de comparer ces deux références qui ont eu un mode de conservation différente : la première dans une gélose de conservation et la deuxième à l'état lyophilisée.

2. Détermination de l'antigène somatique O d'*E. coli* par séro-agglutination

Un sérum renferme des anticorps dirigés contre les facteurs des antigènes somatiques O des *E. coli* homologue et produit une réaction antigène-anticorps, se traduisant par des agglutinations visibles à l'œil nu, permettant de déterminer l'antigène O.

Le test d'agglutination s'effectue sous l'oeuse et près du bec bunsen pour créer une zone de stérilité. L'agglutination doit être précédé d'un test préalable d'auto-agglutination avec de l'eau physiologique (NaCl 2 %). Une souche agglutinant avec de l'eau physiologique est une souche auto-agglutinable et donc non sérotypable. Dans le cadre de cette étude, le sérum monovalent anti-O111 est utilisé en selon les instructions du fabricant (BioRad).

3. Extraction d'ADN

Pour extraire l'ADN bactérien, deux kits seront utilisés en fonction de la méthode utilisée.

a) Le kit Promega®

Le kit Promega® est utilisé pour extraire l'ADN à partir d'une souche bactérienne mise en culture dans un bouillon trypto caséine soja pendant 18 heures à 37°C. L'extraction par le kit Promega® permet d'extraire de l'ADN purifié permettant par la suite une amplification de séquence supérieure à 10 kpb.

Ce kit est composé d'une solution "Nuclei lysis" qui permet de lyser la paroi bactérienne à l'aide de choc thermique. L'ADN est séparé des protéines grâce à la solution de "protein precipitation" et de l'ARN par une solution de RNase. L'ADN est ensuite précipité dans de l'isopropanol puis dissous dans une solution de réhydratation (Tris-EDTA = 2 ml Tris-HCl 1M pH8 + 10 ml EDTA 0,5 M pH 8 qsp 1000 mL d'eau distillée).

b) Le kit InstaGene Matrix (Biorad®)

Le kit InstaGene Matrix (Biorad®) permet en un minimum de temps d'extraire grossièrement l'ADN utile pour une recherche de gène de pathogénicité. Le kit est constitué d'une solution tampon dans laquelle la présence de microbille permet par centrifugation et choc thermique la lyse de la paroi bactérienne et l'extraction du matériel cellulaire.

L'équivalent d'une oëse de culture bactérienne obtenue sur gélose TSC est placé dans un tube contenant 200 µL de kit InstaGene Matrix. Après une incubation de 20 minutes au bain marie à 56°C, le tube est vortexé puis placé 8 minutes à 100°C. Ces étapes de chauffage permettent la lyse cellulaire. Ensuite, la centrifugation à 15 000 rpm permet l'adsorption des résidus de la lyse cellulaire. Cette extraction rapide d'ADN en petite quantité est suffisante pour une PCR avec des amplifications de 1 kb.

4. Sérotypage moléculaire

Le sérotypage moléculaire associe la détermination des antigènes somatique O et flagellaire H.

a) Typage moléculaire de l'antigène somatique O

Principe :

Après une PCR sur le cluster de gènes *rfb* avec des amorces complémentaires au « JUMPstart » et au gène « Gnd », la restriction par *MboII* du produit amplifié permet d'obtenir un profil sur gel d'électrophorèse. Ce profil sera ensuite comparé à une banque de données de profils types afin de typer l'antigène O.

Amplification de l'opéron *rfb* :

A partir d'ADN extrait par le kit Promega®, le cluster *rfb* d'environ 15 à 20 kb est amplifié par PCR avec les amorces complémentaires au « JUMPstart » et au « Gnd ». Les

réactifs utilisés pour la PCR sont fournis avec le kit « Expand Long Template PCR System » de Boehringer (Mannheim). Un volume réactionnel de 50 μL est préparé pour amplifier 1 μL d'ADN (voir tableau 3) :

Tableau 3: Mélange réactionnel pour amplifier 1 μL d'ADN (1 réaction PCR OpO)

-	Volume	Concentration finale
H2O maxima (QSP 49 μl)	30,25 μL	-
dNTP 10 mM	2,5 μL	500 μM
Amorce 3' : 412 (15 pM)	1,5 μL	0,6 pmol/ μL
Amorce 5' : 482 (15 pM)	1,5 μL	0,6 pmol/ μL
Tampon 10 X	5 μL	1X
Enzyme (Taq) 3,5UI/ μL	0,75 μL	0,05 UI/ μL

Programme PCR « OpO » :

- (1) Dénaturation 94°C 2min
 - (2) Dénaturation 94°C 10 sec
 - (3) Hybridation 63°C 30 sec
 - (4) Elongation 68°C 15 min
 - (5) Dénaturation 94°C 10 sec
 - (6) Hybridation 63°C 30 sec
 - (7) Elongation 68°C 15 min
 - (8) Elongation 72°C 7 min
- } 10 cycles
- } 20 cycles + 20 sec en plus d'élongation par cycle

Restriction des produits amplifiés de l'opéron *rfb* :

Après vérification de la réussite de l'amplification du cluster *rfb* sur gel d'électrophorèse, les produits amplifiés sont restreints par *MboII* (Amersham-Pharmacia-Biotech). Dans un volume final de 25 μL , le mélange réactionnel suivant est effectué :

- Produit PCR « OpO » : 21 μL
- Tampon 10 X : 2,5 μL
- Enzyme *MboII* 12 UI/ μL : 1,5 μL

La restriction s'effectue pendant 3 heures à 37°C et est arrêtée par choc thermique à 72°C suivi d'une conservation à 4°C.

Les produits de digestion sont déposés avec 5 µL de bleu de dépôt (BBT + glycérol) dans les puits pour une migration (tampon de migration : TAE 0,5 X) sur gel d'agarose à 2 % (Standard 1% + Métaphor 1% dans TAE 0,5X) à 160 V pendant 4 heures. Le marqueur de poids moléculaire est constitué de 5 volumes d'Amplisize (Biorad) et d'un volume de lambda-Hind III (Promega). La coloration du gel s'effectue au bromure d'éthidium (BET). Le gel est révélé sous les U.V. puis numérisé par photographie.(figure 5)

Traitement des données par informatique (Taxotron®) :

La photographie numérique est scannée par le logiciel RestrictoScan®. Les coordonnées en pixel sont ainsi obtenues pour tous les profils de restriction. En prenant ensuite comme référence le marqueur de poids moléculaire (AmpliSize + Lambda Hind III), le logiciel RestrictoTyper® permet à partir des coordonnées en pixel d'obtenir les poids moléculaires de tous les fragments sur chaque profil de restriction.

Étant sous forme de poids moléculaire (pb), les données expérimentales de chaque profil peuvent être comparé avec une tolérance de 5 % à la base de données R. À chaque profil « type » R (ex : R111a) correspond l'antigène O (ex : O111).

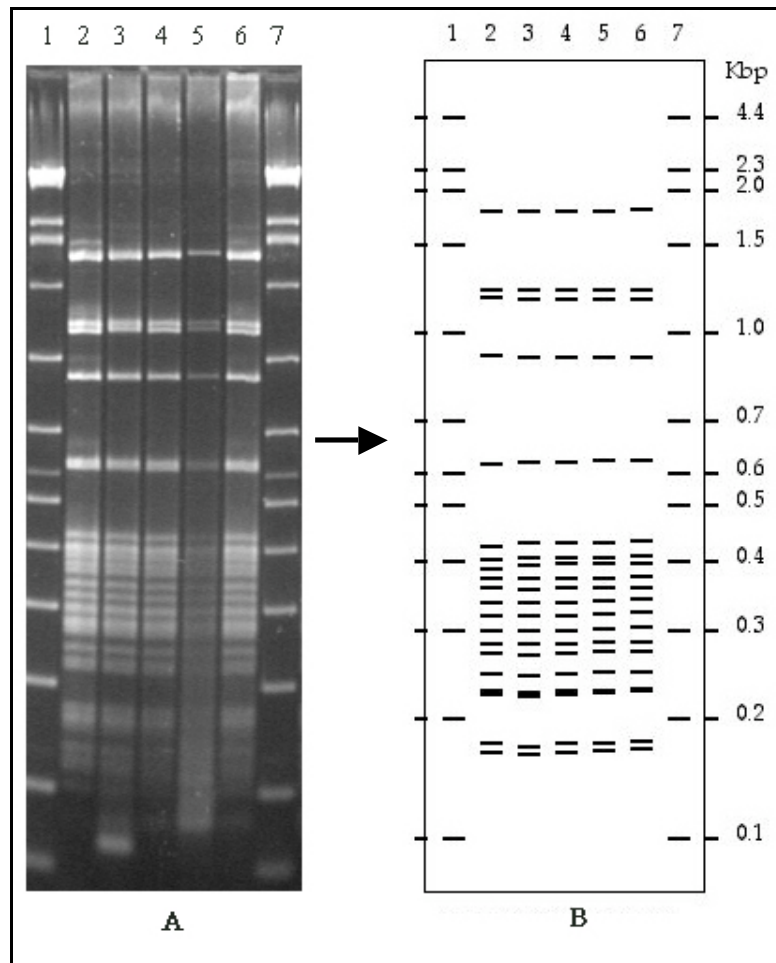


Figure 5 : Image des profils R111a sur gel d'électrophorèse (A), schéma des profils après numérisation par taxotron® (B). (marqueur de poids moléculaire= amplisize + lambda-*Hind* III sur piste 1 & 7 ; piste 2 à 6 = profils R111a)

b) Typage moléculaire de l'antigène flagellaire H

Principe :

Après une PCR sur le gène *fliC*, la restriction par *Xba*I du produit amplifié permet d'obtenir un profil sur gel d'électrophorèse. Ce profil est ensuite comparé à une banque de données de profils types afin de typer l'antigène H. [11]

Recherche du gène *fliC* codant pour la flagelline :

A partir d'ADN extrait par le kit Promega, le gène *fliC* d'environ 1 kb est amplifié par PCR. Les amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce 3' : FSA 1Sc : 5'- CAA GTC ATT AAT ACM AAC AGC C-3'

Amorce 5' : rFSA 1Sc : 5'- GAC ATR TTR GAV ACT TCS GT-3'

Avec M = A ou C, R = A ou G, V = A ou G et S = G ou C.

Un volume réactionnel de 50 µL est préparé pour amplifier 1 µL d'ADN (voir tableau 4) :

Tableau 4 : Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR FSA)

-	Volume	Concentration finale
H2O maxima (QSP 49 µl)	31,5 µL	-
dNTP 1,25 mM	8 µL	200 µM
Amorce 3' : FSA (15 pM)	0,5 µL	0,6 pmol/µL
Amorce 5' : rFSA (15 pM)	0,5 µL	0,6 pmol/µL
Tampon 10 X	5 µL	1X
MgCl2 25 mM	3 µL	1,5 mM
Taq Biosystem 5UI/µL	0,5 µL	2,5 UI/µL

Programme PCR « FSA » :

- (1) Dénaturation 94°C 5 min
 - (2) Dénaturation 94°C 1min
 - (3) Hybridation 55°C 1min
 - (4) Elongation 72°C 1 min
 - (5) Elongation 72°C 5 min
- } 35 cycles

Restriction des produits amplifiés de la flagelline :

Après vérification de la réussite de l'amplification du gène *fliC* sur gel d'électrophorèse, les produits amplifiés subissent une restriction par *HhaI* (Amersham Pharmacia Biotech). Dans un volume final de 25 µL, le mélange réactionnel suivant est effectué :

- Produit PCR « FSA » : 19,5 µL
- Tampon 10 X : 2,5 µL
- Enzyme *HhaI* 10 UI/µL : 3 µL

La restriction s'effectue pendant 3 heures à 37°C puis arrêtée par choc thermique à 72°C suivi d'une conservation à 4°C.

Les produits de digestion sont déposés avec 4 µL de bleu de dépôt (BBT + glycérol) dans les puits pour une migration (tampon de migration : TAE 0,5 X) sur gel d'agarose à 2 % (Standard 1% + Métaphor 1% dans TAE 0,5X) à 120 V pendant 5 heures. L'AmpliSize (Biorad) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. La coloration du gel s'effectue au BET. Le gel est révélé sous les U.V., puis numérisé par photographie.

Traitement des données par informatique (Taxotron®) :

Le traitement de la photographie s'effectue de la même manière que pour l'opéron *rfb* avec l'Amplisize comme référence en poids moléculaire. Les données expérimentales sont comparées à une base de données F avec une tolérance de 5 %. A chaque profil « type » F (ex : F2) correspond l'antigène H (ex : H2).

5. Détection des gènes de pathogénicité « *stx* », « *eae* », « *bfpA* », « *affI* ».

*a) Recherche des gènes de pathogénicité *stx* codant pour une shiga-toxine chez Escherichia coli avec le système PCR de Lin et Bastian*

Le système mis au point par Lin permet la détection du gène codant pour les shiga-toxine et variants. Après amplification du gène *stx* par PCR et vérification du produit amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose, le produit amplifié du gène sera clivé par une enzyme de restriction *Hinc II*. Après clivage du produit PCR, plusieurs profils de restriction sont obtenus, chacun correspondant au type de *stx*: *stx1*, *stx2* et ses variants. Les amorces utilisées sont les suivantes :

LIN 5' : 5'-GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3'

LIN 3' : 5'-TTT GAT TGT TAC AGT CAT-3'

Un volume réactionnel de 50 µL est préparé pour l'amplification PCR (voir tableau 5)

Tableau 5: Mélange réactionnel pour amplifier 1 μ L d'ADN (1 réaction PCR lin)

-	Volume	Concentration finale
H2O maxima (QSP 49 μ l)	29,5 μ L	-
dNTP 1,25 mM	8 μ L	200 μ M
LIN 3' (20 pM)	1,5 μ L	0,6 pmol/ μ L
LIN 5' (20 pM)	1,5 μ L	0,6 pmol/ μ L
Tampon 10 X	5 μ L	1X
MgCl2 25 mM	3 μ L	1,5 mM
Taq. polymérase 5UI/ μ L	0,5 μ L	0,05 UI/ μ L

Programme PCR « lin » :

(1) Dénaturation 94°C : 2 min

(2) Dénaturation 94°C : 1 min

(3) Hybridation 43°C 1 min 30s

(4) Élongation 72°C : 1 min 30s

(5) Élongation 72°C : 5 min

} 40 cycles des étapes 2+3+4

L'amplification a lieu à 900 pb et la migration s'effectue sur un gel d'agarose à 1,6 %. Les témoins utilisés sont : Témoin positif : EDL 933 (*E. coli* O157 :H7 possédant les gènes *stx1* et *stx2*; Témoin négatif: Hb 101 (sans gène *stx*). Après restriction par *Hinc* II dans un bain marie à 37°C pendant 3 heures, les profils obtenus permettent de déterminer le type de variant du gène *stx* (soit *stx1*, *stx2* ou *stx2 variants*).

b) Recherche des gènes de la beta-glucuronidase (β -glu), d'attachement et d'effacement (eaeA) et d'adhérence aggrégative (aaf/I) par un système PCR multiplex EAA-B.

Le système PCR multiplex EAA-B permet la détection en une PCR unique, de trois gènes de *Escherichia coli* :

Le gène β -glu codant la β -glucuronidase permettant de confirmer la présence d'un *Escherichia coli*. Le gène eae A codant une protéine de la membrane externe, l'intimine (capable de causer des lésions d'attachement et d'effacement au niveau des entérocytes de la muqueuse intestinale). Le gène aaf/I codant une adhésine (fimbriae), spécifique des *E. coli* entéroaggrégatifs. [2]

Les amorces suivantes sont utilisées :

- β -glu (*uidA*):

Amorce 3' : UAL : 5'- AAA ACG GCA AGA AAA AGC AG -3'

Amorce 5' : UAR : 5'- ACG CGT GGT TAC AGT CTT GCG -3'

-eae A:

Amorce 3' : FM I : 5'- CAT TAT GGA ACG GCA GAG GT -3'

Amorce 5' : Ryu4 : 5'- ATC TTC TGC GTA CTG CGT TCA -3'

-aaf I:

Amorce 3' : AAF I a : 5'- GCG TTA GAA AGA CCT CCA ATA -3'

Amorce 5' : AAF I b : 5'- GCC GGA TCC TTA AAA ATT AAT TCC GGC -3'

Un volume réactionnel de 50 μ L est préparé pour l'amplification PCR (voir tableau 6)

Tableau 6: Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR EAA-B)

-	Volume prélevé	Concentration finale
H ₂ O max	QSP 49 µL	-
dNTP 1,25 mM	8 µL	200 mM
UAL (20 pmol / µl)	2 µL	0,8 pmol / µL
UAR (20 pmol / ml)	2 µL	0,8 pmol / µL
FM1 (20 pmol / µl)	1,5 µL	0,6 pmol / µL
Ryu4 (20 pmol / µl)	1,5 µL	0,6 pmol / µL
AAF I a (20 pmol / µl)	1,5 µL	0,6 pmol / µL
AAF I b (20 pmol / µl)	1,5 µL	0,6 pmol / µL
Tampon 10X de la <i>Taq</i>	5µL	1X
MgCl ₂ 25 mM	3 µL	1,5 mM
<i>Taq</i> -polymérase 5U/µl	0,5 µL	2,5 UI

Programme PCR « EAA-B »:

- (1) Dénaturation 94°C : 3 min
 - (2) Dénaturation 94°C : 1 min 30 sec
 - (3) Hybridation 57°C : 1 min 30 sec
 - (4) Élongation 72°C : 2 min
 - (5) Élongation 72°C : 7 min
- } 25 cycles des étapes 2+3+4

Trois témoins sont utilisés pour valider le résultat :

Témoins positifs : 2348/69 (*E. coli* O26): *eaeA* +, *βglu* + et 17/2 (*E. coli*) : *aafI* +, *βglu* +

Témoin négatif : 02-755 (*Hafnia alvei* I) : *βglu* -, *eaeA* -, *aafI* -

L'amplification a lieu pour :

- *β*-glu à 147pb,
- *eae A* à 790pb
- *aafI* à 432pb

c) Recherche des gènes de pathogénicité bfpA codant le "bundle forming pili" chez Escherichia coli par le système PCR

Le système de détection par PCR du gène *bfpA* a été testé pour la première fois lors de cette étude. La détection du bfp est uniquement faite pour les souches ayant le gène eae. Sa présence permettra de mettre en évidence les vrais EPEC: ceux qui sont capables de synthétiser à la fois l'intimine et le "bundle forming pili". Les amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce 3' : EP1 : 5' - AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC -3'

Amorce 5' : EP2 : 5' - GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA -3'

Un volume de 50 µL est préparé pour l'amplification PCR (voir tableau 7)

Tableau 7: Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR BFP)

-	Volume	Concentration finale
H2O maxima (QSP 49 µl)	30,8 µL	-
dNTP 1,25 mM	8 µL	200 µM
EP1 3' (20 pM)	1,5 µL	0,6 pmol/µL
EP2 5' (20 pM)	1,5 µL	0,6 pmol/µL
Tampon 10 X	5 µL	1X
MgCl2 1mM	3 µL	0,06 mM
Taq. polymérase 5UI/µL	0,2 µL	0,025 UI/µL

Programme PCR « BFP »:

- | | | |
|--------------------------------------|---|-----------|
| (1) Dénaturation 94°C : 30 s. | } | 30 cycles |
| (2) Hybridation 56°C : 1 min | | |
| (3) Élongation 72°C : 2 min | | |
| (4) L'amplification a lieu à 326 pb. | | |

6. Ribotypie : restriction par *MluI*

Principe :

Le Riboprinter® est un automate permettant de ribotyper 8 souches à la fois en 7 heures environ. Il réalise, analyse et compare des profils de restriction des gènes codant les ARN ribosomiques de souches à identifier.

L'automatisation de la technique commence avec l'extraction de l'ADN, qui est réalisée grâce aux traitements des souches avec des agents de lyse. L'ADN est ensuite coupé par une enzyme de restriction (*MluI*). Les fragments obtenus sont alors séparés par électrophorèse en gel d'agarose miniaturisé. Les échantillons et les marqueurs de poids moléculaires sont placés dans les puits du gel. Les fragments, séparés selon leur taille, sont transférés simultanément sur une membrane de nylon se déplaçant perpendiculairement contre l'extrémité du gel, capturant et immobilisant ainsi les différents fragments d'ADN en fonction de leur taille. Cette membrane est imprégnée d'une solution dénaturante pour l'ADN.

Après séchage et lavage de la membrane, les fragments dénaturés sont ensuite hybridés à 66°C avec une sonde d'ADN complémentaire à une partie de l'opéron d'ARNr *rrnB* d'*Escherichia coli*, qui est constitué des séquences codant pour l'ARNr 16S, ARNr 23S. Après 2 heures d'hybridation, la membrane est lavée, séchée et traitée avec un réactif bloquant les sites non spécifiques.

Le conjugué, un anticorps monoclonal lié à la phosphatase alcaline est ensuite ajouté. Après lavage de la membrane pour ôter le conjugué non lié, le substrat chimioluminescent est rajouté. Une émission de lumière est détectée par une caméra CCD (figure 5). La caméra convertit alors l'intensité de la lumière issue des fragments luminescents d'ADN en information digitale. Les images brutes sont alors transmises à l'ordinateur PC Riboprinter®.

Ces images peuvent être transférées sur un ordinateur Macintosh et analysées par l'ensemble des logiciels Taxotron®.

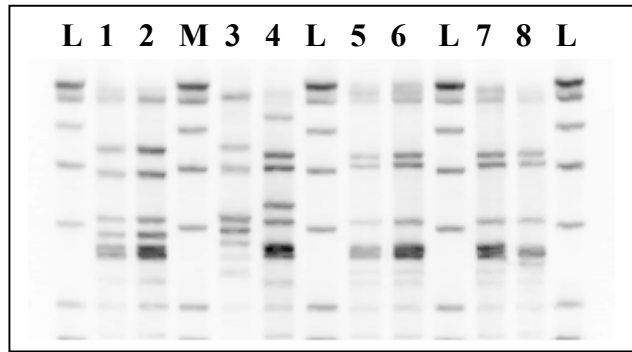


Figure 6 : Exemples de profils de restriction de l'ARNr de *E.coli* O111 obtenus après clivage par *Mlu*I. (L = Marqueur poids moléculaire; piste 1 & 2 = ribotype M1; piste 3 = ribotype M5; piste 4 = M6; piste 5, 6, 7 & 8 = ribotype M2)

Mode opératoire :

Préparation de l'inoculum bactérien : En zone de stérilité, à partir d'une colonie sur boîte de pétrie, l'inoculum est préparé par homogénéisation grâce au bio-vortex dans un des huit puits de la barrette destinés à l'automate.

Traitement thermique des bactéries : Avant leur mise en place dans l'automate, les échantillons subissent une étape de fragilisation de la membrane par traitement thermique (70°C) puis refroidissement durant 20 minutes. Après le traitement thermique, des agents de lyse sont ajoutés aux échantillons.

Mise en route du riboprinter® : L'appareil doit être paramétré avec la température (37°C) et la durée d'incubation (120 min).

7. Électrophorèse en champs pulsés avec restriction par *Xba*I

Le principe de l'électrophorèse en champs pulsés (ECP) est similaire à celui du ribotypage : l'ADN bactérien est soumis à l'action d'une endonucléase de restriction pour donner une série de fragments dont la taille et le nombre sont caractéristiques de l'isolat étudié. La différence entre les 2 méthodes réside au niveau du choix de l'endonucléase : l'ECP est basée sur l'utilisation d'endonucléases de restriction reconnaissant des sites de coupure "rares", ici *Xba*I, générant un nombre restreint de fragments d'ADN donc de très grande taille.

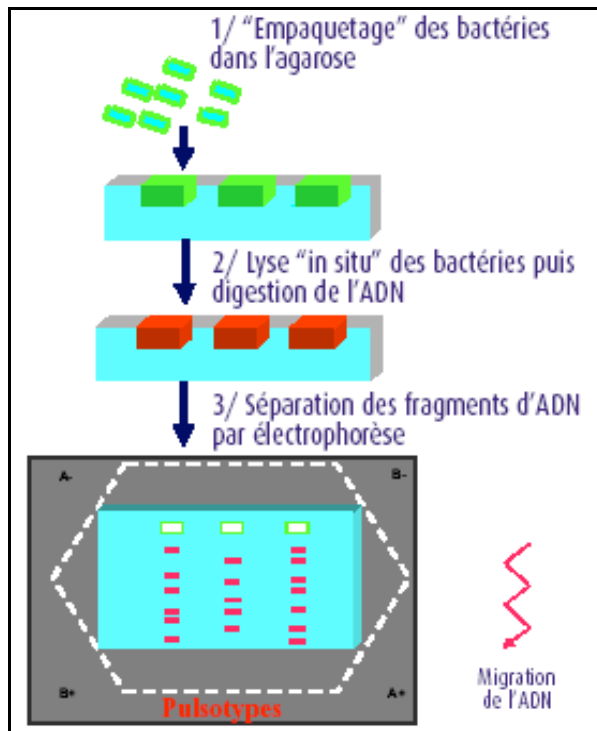


Figure 7 : principe de l'ECP

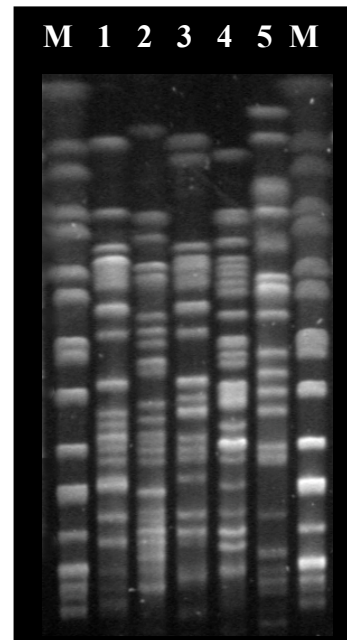


Figure 8 : Exemples de pulsotypes d'E.coli O111 clivé par XbaI. (M=Salmonella enteritica sérotype Braenderup)

La difficulté de cette technique, basée sur l'analyse du chromosome bactérien intact, réside précisément au niveau de la manipulation de ces molécules de grande taille qu'il faut éviter d'endommager lors de la préparation de l'échantillon, puis lors de la séparation des fragments d'ADN.

La préparation de l'ADN se fait par lyse "in situ" des cellules d'une colonie bactérienne dans une matrice semi-solide d'agarose ("plug"), pour éviter les forces de cisaillement susceptibles d'endommager l'ADN. Après digestion par une endonucléase de l'ADN empaqueté, les fragments résultants sont séparés selon une technique particulière d'électrophorèse basée sur l'application d'un champ électrique alterné multidirectionnel : un champ pulsé. (Figure 7 & 8)

Les fragments séparés sont alors révélés par simple coloration au « syber green » pour donner le pulsotype (empreinte génétique) caractéristique de chaque isolat analysé.

C. Résultats

1. Séro-agglutinations, sérogroupage moléculaire des *E. coli* O111

Sur 46 souches O111 étudiées au CNR, 31 seulement ont agglutiné avec le sérum anti O111. Reeves a décrit que les *E. coli* O111 pouvaient agglutiner avec le sérum anti O35 de *Salmonella*. Il semblait donc intéressant de continuer les agglutinations avec un sérum anti O35 de *Salmonella* sachant que les sérums pour agglutiner les salmonelles sont plus saturés en anticorps spécifique à l'antigène recherché que ceux de *E. coli*. Par conséquent, les sérums pour *Salmonella* sont plus spécifiques que ceux de *E. coli*. [7]

Tableau 8: Agglutination des 46 souches avec le sérum anti O111 de *E.coli* et anti O35 de *Salmonella*

Type de sérum	Souches agglutinantes
Anti O111 <i>E. coli</i> seul	31 (dont 15 seuls)
Anti O35 <i>Salmonella</i> seul	20 (dont 4 seuls)
Anti O111 + Anti O35*	16
Pas d'agglutination (ni O111 ni O35)	11

*comparaison des résultats entre les deux sérums seuls

Effectivement, 16 souches ont une réaction croisée avec le sérum anti O111 et anti O35 (Tableau 8). De plus quatre souches ont agglutiné seulement avec le sérum anti O35 de *Salmonella* dont la (02)-1831 (CIP 107201). En effet en comparant les deux souches CIP 107201 qui ont eu un mode de conservation différent, la souche ayant été conservée par lyophilisation agglutine avec les deux sérums.

En ce qui concerne le sérogroupage moléculaire, 27 souches ont un profil R111a et 1 souche avec R111b (Tableau 9). 11 souches ont un profil moléculaire qui ne figure pas dans la banque de données (nouveau type =NT). L'opéron O n'a pu être amplifié par PCR pour 7 souches (NA = non amplifiées). 8,5 % des souches qui ont eu une réaction croisée avec les sérums O111 et O35 ont un autre profil *rfb* que le profil R111 connu. L'établissement de corrélation entre les agglutinations et le sérogroupage moléculaire permet de montrer que tous les cas de figures sont présents. Près de 20% des souches qui n'ont pas agglutiné avec le sérum

O111 ont un profil R111 (a ou b). Plus de 15 % des souches étudiés n'ont pas agglutiné avec le sérum O111 et ne présente pas de profil R111 typique.

Tableau 9: Corrélation entre les agglutinations avec les sérums O111 et O35 et le profil *rfb*

Agglutinations		Profil R	Nombre de souches	Pourcentages
O111	O35	R111a	11	24%
O111	-	R111a	9	20%
O111	-	NT ou NA	7	15%
O111	O35	NT ou NA	4	8,5%
-	O35	R111a	4	8,5%
-	-	R111b	1	2%
-	-	NT ou NA	7	15%
-	-	R111a	3	7%

2. Analyse moléculaire du gène *fliC* et détermination des profils F des *E. coli* O111

Sur 46 souches étudiées, seules 4 profils F n'a pu être déterminé à cause de non amplification. Quatorze souches ont un profil F21 avec deux variants F21a et F 21c. Huit souches ont un profil F12/45 (les profils F12 et F45 présente le même profil de restriction).

Tableau 10: Caractéristiques des profil *fliC* des souches *E coli* O111

Profil F	F12/45	F21a	F21c	F25b	F2a	F2c	F8	F23, F28, F4b, F5, F6
Nbre de souches	8	7	7	3	6	1	4	5

3. Recherche des gènes de pathogénicité : *stx*, *eae*, *bfp*, *affI*

(et β -*glu* pour le control)

Seule une souche est β -*glu* – (03- 9555). Cependant elle possède des facultés biochimiques caractéristiques des *E. coli* et agglutine dans du sérum anti O111.

12 souches possèdent le gène codant pour une shiga-toxine dont 6 possèdent également le gène *eae*. 15 souches possèdent le gène *eae* dont 8 ont le gène *bfp*. Aucun gène de pathogénicité n'a été détecté parmi 25 souches. Le gène *aafI* n'a pas été mis en évidence parmi les souches étudiées. (Tableau 11)

Tableau 11: Gènes de pathogénicité des *E. coli* O111

Gènes de pathogénicité	stx+eae	stx uniquement	eae uniquement	eae+bfp	Aucun
Nbre de souche	6	6	3	6	25

a) Ribotypie

La Ribotypie des souches *E. coli* O111 a permis de mettre en évidence 4 profils de restriction noté M1, M2ab (avec deux variants a et b), M3 et M4. Les autres profils, de M5 à M10, étant des profils ribotypiques uniques.

Tableau 12: Caractérisation par ribotypie des *E coli* O111

Profil M	M1	M2a	M2b	M3	M4	M5ab, M6ab, M7ab, M8, M9, 10
Nbre de souches	10	9	8	6	3	9

Seul le profil M1 était déjà connu : il s'agit du profil ribotypique de *E coli* K12 (MG1665), K12 étant la souche dite « sauvage » des *E coli*. Cette souche K12 est dépourvue d'ADN phagiques et d'antigène somatique O.

4. Pulsotypie

L'étude des pulsotypes des souches *E coli* O111 permet d'observer que tous les profils de restriction sont uniques (figure 7).

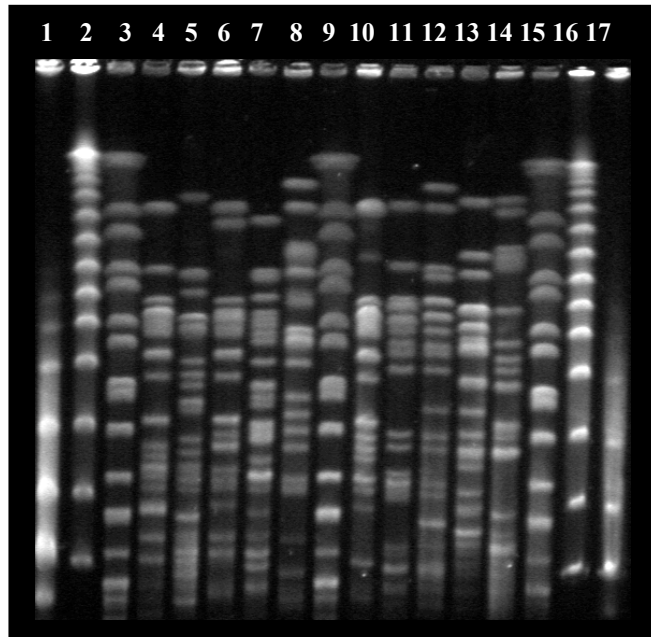


Figure 9: Pulsotypes de *E coli* O111. (Marqueur poids moléculaire: lawrange piste 1 & 17; Lambda hind III piste 2 & 16; reference: *Salmonella* sérotype Braenderup piste 3, 9 & 15)

D. Discussions

1. Fiabilité des sérums et sérogroupage moléculaire

Un assez grand nombre de souches de *E. coli* O111 n'ont plus agglutiné dans le sérum anti O111. De plus, l'étude a montré qu'il existe une famille antigénique commune avec O35 de *Salmonella*.

Selon le mode de conservation, le pouvoir agglutinogène peut aussi varier. En effet la souche CIP 107201 a perdu son agglutination avec le sérum anti O111 conservée dans une gélose de conservation à température ambiante, contrairement à la même souche conservée à l'état lyophilisé.

Certaines souches ont été trouvées R111 avec la méthode moléculaire, alors qu'elles n'agglutinaient plus avec le sérum O111. Ainsi pour déterminer le sérotype des *E coli*, il est nécessaire de s'appuyer sur les deux méthodes. En revanche, 15 % des souches répertoriées O111 n'ont pas agglutiné et n'avaient pas de profil type R111.

La difficulté du sérogroupage des *E coli* O111 amène à se pencher sur l'hypothèse de Riley qui énonce le fait que l'opéron O aurait une origine plasmidique. Porté au moins en partie sur un plasmide, l'antigène somatique spécifique des O111 serait moins stable. Ceci

conduirait soit à une incapacité à synthétiser l'antigène au complet, ou partiellement, pouvant justifier une grande diversité des profils de sérotype moléculaire. [16].

De plus, Mühldorfer reprendra plus tard cette hypothèse que les *E. coli* O111 serait un descendant de *E. coli* K12 ayant acquis un plasmide lui conférant la faculté de synthétiser des LPS participant à l'antigène somatique. [15]

2. Corrélations entre le sérotype, le ribotype et la pathogénicité.

Malgré les difficultés à caractériser l'antigène somatique, la détermination de l'antigène flagellaire (F) a permis de connaître le sérotype complet des *E. coli* O111. En étudiant la corrélation existant entre le sérotype (R et F) et le ribotype, on peut classer les souches par groupes (tableau 13).

Tableau 13 : Caractérisation moléculaire des *E. coli* O111 en fonction du profil F et du ribotype M.

Profil F fliC	ribotype	nombre de souches
F12/45	M1, M2a, M9, M5, M6	8
F21a	M2b	8
F21c	M1	7
F25b	M4	3
F2a	M3	6
F8	M2a	4

L'étude permet de remarquer que les profils F sont bien corrélés avec le ribotype, avec une plus grande diversité pour le profil F12/45. Les autres souches qui ne sont pas incluses dans le tableau 13 présentent une plus grande diversité de leur profil F ou un ribotype unique. Ceci est aussi un indice montrant la diversité des *E. coli* O111.

La détection des gènes de pathogénicité a permis d'observer également une grande diversité parmi les souches mais aussi de renforcer les groupes établis par la forte corrélation existant entre le ribotype et le type moléculaire (R et F). Ainsi les *E. coli* O111 peuvent être mis dans les mêmes groupes si l'on tient compte de leur sérotype, ribotype et de leurs gènes de pathogénicité.

Tableau 14: Corrélations entre le sérotype, le ribotype et les gènes de pathogénicité chez les *E. coli* O111

Profil F (fliC)	Ribotype M	Nbre de souches	Gène de pathogénicité	Classification actuelle (a)	Classification ancienne (b)
F21c	M1	7	<i>stx</i>	STEC	EPEC (H21)
F8	M2a	6	<i>stx, eae</i>	EHEC	EHEC (H8)
F2a	M3	6	<i>eae, bfp</i>	EPEC typique	EHEC et EPEC (H2)
F25b	M4	3	<i>eae</i>	EPEC atypique	Pas de H25 isolé (c)
F12/45	M1, M2, M5, M6, M9	8	-	-	EPEC (H12)
F21a	M2b	8	-	-	EPEC (H21)
F2c	M2a	1	-	-	EHEC et EPEC (H2)
autre	autre	7	-	-	-

(a) Classification actuelle tenant compte de la présence des gènes de pathogénicité

(b) Classification ancienne d'après la littérature ne tenant compte que du sérotype et des cas décrits.

(c) Le sérotype O111 : H25 n'a jamais été trouvé dans la littérature.

Malgré la mise en valeur de groupes caractéristiques, le tableau 14 montre les discordances existant entre nos résultats et ceux de la littérature faisant état des *E. coli* O111 isolées à travers le monde. Ceci indique que le sérotypage n'est pas suffisant pour déterminer les pathovars des *E. coli* O111, il est indispensable de rechercher les gènes de pathogénicité. La définition des pathovars d'après la littérature n'est basée que sur le sérotype et les signes cliniques engendrés. Les définitions actuelles tiennent, de plus, en compte des gènes de pathogénicité détectés, du sérotype ou, mieux, du sérotype moléculaire et de marqueurs épidémiologiques tels le ribotype et les profils d'électrophorèse en champs pulsés. En effet, les *E. coli* O111 ne sont pas toujours des EPEC mais aussi des EHEC de découverte récente.

De plus, beaucoup de gènes de pathogénicité ont été perdus pendant la conservation des souches dans des tubes de gélose conservation, c'est le cas de deux souches responsables de SHU, et qui avaient, au moment de l'isolement, les gènes *stx1* et *stx2* pour l'une et *stx1* pour l'autre et qui agglutinaient avec le sérum O111 mais qui n'avaient pas le profil R111 mais par contre qui avaient le type flagellaire R12/45. Les gènes d'origine phagique comme *stx* ou plasmidique, pouvant être acquis (ou perdus) par transfert du fait de leur instabilité, confèrent (ou non) le potentiel pathogène à la bactérie. Par exemple, une souche de *E. coli* O111 : H2 pourrait perdre le gène *stx* et ne serait donc plus considérée comme STEC. Au contraire, une souche de *E. coli* O111 : H25 peut acquérir le gène *stx* par lysogénéisation et devenir potentiellement responsable d'un SHU.

3. Diversité des *E. coli* O111

Dans un premier temps, cette étude a montré une diversité génétique au sein des souches de *E. coli* O111 du point de vue de leur pathogénicité. En effet, les *E. coli* peuvent être potentiellement des EPEC typiques ou atypiques mais aussi STEC ou EHEC en fonction de leurs gènes de pathogénicité. Du point de vue antigénique, l'étude a montré quelques différences au sein même de l'antigène somatique avec plusieurs nouveaux profils.

En regroupant les informations expérimentales et les données de la littérature, le séro groupe O111 est subdivisé en une dizaine de sérotypes. La ribotypie, malgré des corrélations avec le sérotype, a montré aussi une grande diversité au niveau des ARN ribosomiaux.

Lors de cette étude, la méthode la plus discriminante a été incontestablement l'électrophorèse en champs pulsés. En effet, chaque pulsotype est unique. Toutes les souches étudiées ont présenté des profils de pulsotypie différents.

Ceci est une preuve de la grande diversité des *E. coli* O111. Cette diversité peut provenir des différentes possibilités de transfert de gènes phagiques ou plasmidiques. Dans une enquête épidémiologique, l'ECP se révèle alors comme la méthode la plus fine pour des investigations. Cependant, alors que l'instabilité génétique est à considérer, l'ECP pourrait être trop discriminante et doit être accompagnée de la ribotypie.

Conclusion

La caractérisation moléculaire de souches de *Escherichia coli* O111 isolées en France nous a permis, dans un premier temps, de remarquer que l'agglutination avec le sérum O111 n'est pas une méthode suffisante ni même fiable pour avoir une approche dans la détection de souches pathogènes. En effet, les souches de *E. coli*, qui peuvent être potentiellement pathogènes par la présence de gènes de virulence comme le gène *stx* codant une shiga toxine, doivent être étudiées par amplification de quelques gènes (*stx*, et *eae*) et par sérotypage moléculaire. Néanmoins, l'étude a montré une bonne corrélation entre l'identité génétique défini par sérotypage et ribotypage, et l'identité pathogénique définie par la présence de gènes de virulence. Cependant, les corrélations établies sont discordantes avec celles de la littérature.

Dans un deuxième temps, l'étude a permis de montrer une forte diversité génétique au sein du séro groupe O111 par ses pulsotypes uniques et sa variabilité en termes de facteurs de pathogénicité. Les souches de *E coli* O111 ne sont pas seulement entéropathogènes mais peuvent être aussi potentiellement entérohémorragiques, certaines souches pouvant devenir non pathogènes par perte de leurs gènes de pathogénicité.

Bien que les souches étudiées sont d'origine clinique, il est indispensable d'attirer l'attention des industriels, en particulier des grandes chaînes de restauration, mais aussi des laboratoires d'analyses médicales ou d'agroalimentaires sur les risques que peuvent présenter aussi bien les *E. coli* O111 que les *E coli* producteurs de shiga toxine en général qui peuvent être aussi présents dans les aliments.

Bibliographie

- [1] AFSSA, Les *Escherichia coli* producteur de shiga toxine, Avril 2003.
- [2] Bastian S.N., Carle I., Grimont F., Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*, Res. Microbiol. (1998) 149 : 457-472
- [3] Bopp C. A., Brenner F. W. et al, *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. Manual of clinical microbiology 7th edition (1999) 459-467.
- [4] Clarke S.C., Haigh R. D. et al, Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, Clinical Microbiology Reviews, (2003) 16 : 365-378.
- [5] Coimbra R.S., Grimont F. et al, Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP), Res. Microbiol. (2000) 151 : 639-654.
- [6] Gismero-Ordóñez J., Dall'Agnol M. et al, Expression of the bundle-forming pilus by enteropathogenic *Escherichia coli* strains of heterologous serotypes, Journal of Clinical Microbiology (2002) 40: 2291-2296.
- [7] Gordon Stevenson, Annette Kessler, Peter R. Reeves, A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants, FEMS Microbiology Letters (1995) 125 : 23-30
- [8] Gunzburg S.T., Tornieporth N.G., Riley L.W., Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based : Detection of bundle-forming pilus gene, Journal of Clinical Microbiology (1995) 33 : 1375-1377.
- [9] Kaper J. B., Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Current Opinion in Microbiology, (1998), 1:103-108.
- [10] Machado J., Grimont F., Grimont P.A.D., Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns, Res. Microbiol. (1998) 149 : 119-135.
- [11] Machado J., Grimont F., Grimont P.A.D., Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene, Res. Microbiol., (2000) 151 : 535-546.

- [12] Makino S.I., Tobe T. et al, Distribution of the secondary type III Secretion System locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 isolates among shiga toxin-producing *E. coli* strains, *Journal of Clinical Microbiology* (2003) 6: 2341-2347.
- [13] Milon A., Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *Escherichia coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal, *Revue Méd. Vét.* (1993) 144 : 857-878.
- [14] Monteiro-Neto V., Campos L. C. et al, Virulence properties of *Escherichia coli* O111 :H12 strains, *FEMS Microbiology Letters* (1997) 146 : 123-128.
- [15] Mühldorfer I., Hacker J., Genetic aspect of *Escherichia coli* virulence, *Microbial Pathogenesis* (1994) 16: 171-181.
- [16] Lee W. Riley, Lucille N. Junio et al, Plasmid-encoded expression of lipopolysaccharide O-Antigenic polysaccharide in enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infection and Immunity*, (1987) 55 : 2052-2056
- [17] Sugiyama T., Kido N. et al, Evolutionary relationship among rfb gene clusters synthesizing mannose homopolymer as O-specific polysaccharides in *Escherichia coli* and *Klebsiella*, *Gene*, (1997) 198 : 111–113
- [18] Trabulsi L.R., Keller R., Gomest T.A.T., Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, *Emerging Infectious Diseases* (2002) 8 : 508-513.
- [19] Zhang W., Bielaszewska M. et al, Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the "eae" gene belong to the H11 clonal complex, *Journal of Clinical Microbiology* (2000) 8: 2989-2993.
- [20] Zhang W. , Köhler B. et al, Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia* strains, *Journal of Clinical Microbiology* (2002) 40 : 4486-4492.

Table Des Illustrations

Figure 1: Le cluster des gènes de l'antigène O (rfb)	4
Figure 2: Visualisation des structures du BFP produit par une souche EPEC (O55 : H6)	6
Figure 3 : observations microscopiques des liaisons A/E sur des entérocytes humains	7
Figure 4: Facteurs de pathogénicité majeurs.	10
Figure 5 : Image des profils R111a sur gel d'électrophorèse (A), schéma des profils après numérisation par taxotron® (B).....	19
Figure 6 : Exemples de profils de restriction de l'ARNr de <i>E.coli</i> O111	27
Figure 7 : principe de l'ECP.....	28
Figure 8 : Exemples de pulsotypes d' <i>E.coli</i> O111 clivé par <i>XbaI</i>	28
Figure 9: Pulsotypes de <i>E coli</i> O111.....	32
Tableau 1: Pathovars de <i>Escherichia coli</i> responsables d'infections intestinales	12
Tableau 2 : Références des souches <i>E. coli</i> étudiées.....	14
Tableau 3: Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR OpO)	17
Tableau 4 : Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR FSA).....	20
Tableau 5: Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR lin).....	22
Tableau 6: Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR EAA-B).....	24
Tableau 7: Mélange réactionnel pour amplifier 1 µL d'ADN (1 réaction PCR BFP).....	25
Tableau 8: Agglutination des 46 souches avec le sérum anti O111 de <i>E.coli</i> et anti O35 de <i>Salmonella</i>	29
Tableau 9: Corrélation entre les agglutinations avec les sérums O111 et O35 et le profil <i>rfb</i>	30
Tableau 10: Caractéristiques des profil <i>fliC</i> des souches <i>E coli</i> O111	30
Tableau 11: Gènes de pathogénicité des <i>E. coli</i> O111	31
Tableau 12: Caractérisaton par ribotypie des <i>E coli</i> O111.....	31
Tableau 13 : Caractérisation moléculaire des <i>E coli</i> O111 en fonction du profil F et du ribotype M.....	33
Tableau 14: Corrélations entre le sérotype, le ribotype et les gènes de pathogénicité chez les <i>E. coli</i> O111	34