



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25323

To cite this version:

Bellec, Ezhvin . *Développement d'un modèle pour comprendre et maîtriser le portage des Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC) chez le bovin*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2017, 74 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

DEVELOPPEMENT D'UN MODELE POUR COMPRENDRE ET MAITRISER LE PORTAGE DIGESTIF DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES CHEZ LE BOVIN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BELLEC Ezhvin

Né, le 27 novembre 1990 à COUTANCES (50)

Directeur de thèse : Mme Delphine BIBBAL

JURY

PRESIDENT :
M. Éric OSWALD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Delphine BIBBAL
M. Hubert BRUGERE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 03/11/2017

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, PR M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, PR Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR M. GAIDE Nicolas, AERC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE. :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury de thèse

A Monsieur le Professeur Eric OSWALD

Professeur des Universités, Université Paul Sabatier, Toulouse III

Praticien Hospitalier,

Bactériologie, Virologie et Hygiène

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Delphine BIBBAL

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Hygiène et Industrie des Aliments

Pour m'avoir confié ce sujet de thèse et avoir cru en moi, pour son précieux encadrement au cours de ce travail,

Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Hubert BRUGERE

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Hygiène et Industrie des Aliments

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse, pour son encadrement serein et enthousiaste,

Sincères remerciements.

REMERCIEMENTS

Aux autres partenaires de cette étude

L'Institut de recherche en santé digestive (IRSD) : UMR INSERM 1220 / INRA 1416 / ENVT / Université Paul Sabatier Toulouse 3, équipe Pathogénie et commensalisme des entérobactéries

Thomas Sécher, Monique Kérourédan

L'UMR 454 MEDIS, INRA Auvergne-Rhône-Alpes

Audrey Segura, Yolande Bertin, Marine Bertoni, Pauline Auffret, Evelyne Forano

Le personnel de l'animalerie A3 de l'ENVT et de l'UMR Toxalim

- Hervé Cassard, vétérinaire de l'animalerie A3 de l'ENVT
- Sophie Massat, Stéphanie Fresse et Richard Bechameil, animaliers
- Marc Monplasi, responsable de la gestion des effluents de l'animalerie A3
- Cédric Lacassagne, animalier à l'UMR Toxalim

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
Tableaux.....	10
Figures	10
LISTE DES ABBREVIATIONS	11
INTRODUCTION.....	13
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DU PORTAGE DES <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROHEMORRAGIQUES (EHEC) PAR LES BOVINS ET MESURES DE MAITRISE....	15
CHAPITRE 1 : LES INFECTIONS A <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROHEMORRAGIQUE (EHEC) CHEZ L'HOMME.....	15
1.1 Définition des EHEC	15
1.2 Les facteurs de virulence	17
1.2.1 Les shigatoxines (Stx)	17
Support génétique.....	17
Mode d'action.....	17
1.2.2 Le locus d'attachement et d'effacement (LEE).....	17
1.2.3 Le plasmide de virulence des EHEC	18
1.3 Les infections humaines liées aux EHEC.....	18
1.3.1 Physiopathologie des infections liées aux EHEC.....	18
Le Syndrome hémolytique et urémique (SHU)	18
Le Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).....	19
1.3.2 Diagnostic, pronostic et traitement des infections à EHEC	19
1.3.3 Epidémiologie des infections à EHEC.....	20
1.4 Les réservoirs d'EHEC.....	21
1.5 Voies de transmission des EHEC à l'Homme.....	22
CHAPITRE 2 : CARACTERISTIQUES DU PORTAGE DES EHEC O157:H7 CHEZ LE BOVIN.....	23
2.1 Les caractéristiques du portage chez le bovin.....	23
2.1.1 Les zones de colonisation intestinale.....	23
2.1.2 La durée d'excrétion	23
2.1.3 Les animaux « super-excréteurs » ou « super-shedders »	23
2.2 La prévalence régionale des EHEC O157:H7	24
2.3 Les facteurs d'influence du portage observé des EHEC O157:H7	25
2.3.1 L'effet de l'âge des animaux	25
2.3.2 L'effet du mode d'élevage.....	25
2.3.3 L'effet de la saison sur l'excrétion.....	25
CHAPITRE 3 : MESURES DESTINEES A REDUIRE LE PORTAGE DES EHEC PAR LES BOVINS	27

3.1 Sources, transmission et modalités de contrôle des EHEC.....	27
3.2 Mesures destinées à limiter la contamination des bovins par les EHEC.....	29
3.2.1 Abreuvement et alimentation	30
Abreuvement.....	30
Alimentation	31
3.2.2 Nettoyage et désinfection des locaux	31
3.3.3 Conduite d'élevage.....	32
3.3 Mesures destinées à diminuer le portage par modification du milieu intestinal.....	32
3.3.1 Modifications de la ration alimentaire.....	32
3.3.2 Les probiotiques	33
3.3.3 Les bactériophages	34
3.3.4 La vaccination des troupeaux	35
CONCLUSION.....	36
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE POUR COMPRENDRE ET MAITRISER LE PORTAGE DIGESTIF DES EHEC CHEZ LES BOVINS	39
CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODE	39
1.1 Démarche expérimentale générale	39
1.2 Caractéristiques de la souche MC2 et procédure d'administration	41
1.3 Caractéristiques des bovins	42
1.3.1 Hébergement.....	42
1.3.2 Alimentation.....	42
1.4 Protocole expérimental	42
1.5 Les différents prélèvements réalisés	44
1.5.1 Les prélèvements réalisés lors du suivi de l'excrétion de MC2 RifR	44
Les fèces.....	44
Le sang et le serum.....	44
1.5.2 Les prélèvements réalisés après l'euthanasie	44
Prélèvements externes du cuir et des oreilles (A, B)	45
Prélèvements des contenus digestifs (A, B, T)	45
Prélèvements des tissus digestifs et lymphatiques	45
1.6 Dénombrement et détection de la souche MC2 RifR.....	45
CHAPITRE 2 : RESULTATS	47
2.1 Suivi clinique et sanguin des bovins.....	47
2.1.1 Suivi de l'âge et du poids des bovins	47
2.1.2 Suivi clinique quotidien des bovins	47
2.1.3 Suivi hématologique et biochimique	48
Suivi hématologique	48
Suivi biochimique	48
2.1.4 Examen anatomopathologique des bovins au moment de l'autopsie	48
2.2 Dénombrement des suspensions inoculées de MC2 RifR.....	49

2.3 Suivi de l'excrétion fécale de MC2 RifR	49
2.3.1 Suivi de l'excrétion fécale de MC2 RifR pour le groupe A	49
2.3.2 Suivi de l'excrétion fécale de MC2 RifR pour le groupe B	51
2.4 Dénombrement et détection des MC2 RifR dans les amygdales et nœuds lymphatiques digestifs.....	52
2.4.1 Détection de MC2 RifR dans les amygdales.....	52
2.4.2 Détection de MC2 RifR dans les nœuds lymphatiques digestifs	53
2.5 Dénombrement de MC2 RifR dans les prélèvements de contenus et parois digestifs ..	53
2.5.1 Groupe A.....	53
Contenus digestifs.....	53
Parois digestives	54
2.5.2 Groupe B.....	56
Contenus digestifs.....	56
Parois digestives	57
2.6 Détection de MC2 RifR sur le cuir et dans les oreilles	58
CHAPITRE 3 : DISCUSSION	59
3.1 Le suivi clinique des bovins.....	59
3.2 Le suivi de l'excrétion fécale	59
3.3 La présence de MC2 RifR dans les amygdales et les nœuds lymphatiques digestifs..	60
Amygdales	60
Nœuds lymphatiques digestifs.....	60
3.4 Le dénombrement de MC2 RiR dans les contenus et parois digestifs.....	60
3.5 Présence de MC2 RifR sur le cuir et dans les oreilles	61
CONCLUSION	62
BIBLIOGRAPHIE.....	64
ANNEXES.....	72

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableaux

Tableau 1 : Planning de la phase expérimentale et type de prélèvements réalisés.....	43
Tableau 2 : Age moyen à l'arrivée et à l'autopsie et poids des bovins	47
Tableau 3 : Détection de MC2 RifR dans les amygdales des bovins des groupes A et B	52

Figures

Figure 1 : Diagramme de Venn de la classification des <i>E. coli</i> pathogènes typiques et atypiques.....	16
Figure 2 : Distribution mensuelle du nombre de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans en France de 2010 à 2015 (Bilan SHU InVS 2015)	20
Figure 3 : Résultats des recherches des STEC chez les 111 cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans identifiés par PCR, isolement de souche ou sérologie en France pour l'année 2015 (Bilan SHU InVS 2015).....	21
Figure 4 : Illustration du concept du système One Health par un diagramme de Venn	22
Figure 5 : Sources et voies de transmission des <i>E. coli</i> O157:H7 dans les élevages de bovins. Source : (Soon et al., 2011).....	28
Figure 6 : Mesures de contrôle des <i>E. coli</i> O157:H7 dans les élevages de bovins. Source : (Soon et al., 2011).....	29
Figure 7 : Bonnes pratiques d'élevage destinées à limiter la contamination des bovins par les EHEC. Source : Plaquette FNGDS et Institut de l'Élevage « Dès l'élevage, prévenir les risques de contamination des aliments par des bactéries fécales ».....	30
Figure 8 : Recommandation illustrée de la gestion du steak haché par le consommateur final	37
Figure 9 : Démarche expérimentale générale de l'étude.....	40
Figure 10 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins du groupe A de J0 à J23	49
Figure 11 : Dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins 26, 36, 44, 45 et 51 (groupe A) de J0 à J23.....	50
Figure 12 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins du groupe A après la 1 ^{ière} (J0 à J4) et la 2 ^{ième} inoculation (J23 à J27) et du groupe B de J0 à J4,	51
Figure 13 : Dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins 54, 55, 57, 58 et 66 (groupe B) de J0 à J4.....	52
Figure 14 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins du groupe A	53
Figure 15 : Dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins 26, 36, 44, 45 et 51 (groupe A)	54
Figure 16 : Dénombrements de MC2 RifR au niveau des parois digestives des bovins 26, 36, 44, 45 et 51 (Groupe A).....	55
Figure 17 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins du groupe B	56
Figure 18 : Dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins 54, 55, 57, 58 et 66 (groupe B)	57
Figure 19 : Dénombrements de MC2 RifR au niveau des parois digestives des bovins 54, 55, 57, 58 et 66 (Groupe B).....	58

LISTE DES ABREVIATIONS

A/E : Attachement/Effacement

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ASAT : Aspartate amino-transférase

BIFSCO : *Beef industry food safety council*

BVD : Maladie des muqueuses ou Diarrhée virale bovine (« *Bovine Viral Diarrhea* »)

CCae : Contenu du Caecum

CCD : Contenu du Côlon Descendant

CCS : Contenu du Côlon Spirale

CD : Côlon Descendant

CI : Contenu de l'Illéon

CK : Créatine Kinase

CR : Contenu Ruminant

DG : Drèche de distillerie (« *distiller's grain* »)

E. coli : *Escherichia coli*

eae : gène codant pour l'intimine

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

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

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

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Feedlot : parc d'engraissement (USA)

γ GT : Gamma-glutamyl-transpeptidase

IBR : Rhinotrachéite infectieuse bovine (« *Infectious bovine rhinotracheitis* »)

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

InVS : Institut national de veille sanitaire

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

LPS : Lipopolysaccharide

NPP : Nombre le Plus Probable

PCR : « *Polymerase Chain Reaction* »

RAJ : Jonction recto-anale

RifR : Résistante à la Rifampicine

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

SMAC : Mac Conkey Sorbitol

STEC : *E. coli* productrices de shigatoxines (« *Shigatoxin producing E. coli* »)

Stx : Shigatoxine ou Vérotoxine

stx : gènes codant pour les Stx

T3SS : système de sécrétion de type III

UFC : Unité Formant Colonie

Véro : cellules épithéliales rénales d'une espèce de singe africain (« *Verda Reno* »)

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables d'infections graves chez l'Homme : le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) (Kaper et al., 2004). Le SHU touche particulièrement les jeunes enfants et représente la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant de moins de 3 ans. Les données de surveillance montrent également que le sérotype O157:H7 est prédominant dans les cas de SHU. Le réservoir principal de ces souches est le tube digestif des bovins, chez lesquels elles font l'objet d'un portage asymptomatique (Karmali et al., 2010). L'Homme se contamine lors de la consommation d'aliments contaminés ou par le contact avec des bovins ou des humains porteurs d'EHEC. Les aliments les plus incriminés dans les cas d'infections à EHEC sont : (i) la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite, (ii) le lait cru et les produits au lait cru et (iii) les produits végétaux consommés crus ou non pasteurisés. Chaque fois que des épidémies de SHU surviennent, les filières viandes ou lait impactées doivent faire face à une baisse progressive de la confiance du consommateur.

De nombreuses études se sont intéressées aux différentes caractéristiques épidémiologiques du réservoir des EHEC qui est essentiellement constitué par les bovins. Dans la lutte contre ce problème de santé publique, il importe également de mieux comprendre le portage et l'excrétion des EHEC par les bovins. L'étude que nous avons menée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) consiste à mettre au point un modèle d'infection expérimentale permettant d'étudier le portage et l'excrétion d'EHEC O157:H7. L'objectif était de mieux comprendre les caractéristiques du portage de ces souches tant au niveau des profils d'excrétion que de la localisation précise de la colonisation intestinale du bovin. Par la suite, un tel modèle pourrait permettre d'évaluer l'efficacité des différentes stratégies destinées à diminuer le portage intestinal bovin.

Dans une première partie bibliographique nous allons commencer par présenter les EHEC O157:H7, les infections dont elles sont responsables ainsi que leur épidémiologie. Nous exposerons également les différentes stratégies destinées à réduire le portage et donc l'excrétion des bovins porteurs.

Dans une seconde partie expérimentale, nous présenterons le modèle développé à l'école vétérinaire ; nous présenterons notamment les résultats relatifs au suivi de l'excrétion fécale de la souche inoculée EHEC O157:H7 MC2 ainsi que les résultats des dénombrements de cette souche dans les contenus et parois digestifs.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DU PORTAGE DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES (EHEC) PAR LES BOVINS ET MESURES DE MAITRISE

CHAPITRE 1 : LES INFECTIONS A *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUE (EHEC) CHEZ L'HOMME

1.1 Définition des EHEC

Escherichia coli est une bactérie Gram-négatif anaérobie facultative appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est habituellement une bactérie commensale qui coexiste avec son hôte humain dans les intestins dans une relation mutuellement bénéfique (Tchaptchet et Hansen, 2011). Elle est utilisée comme indicateur biologique de contamination fécale. La majorité des souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes pour l'Homme. Cependant, certaines souches ont acquis des facteurs de virulence leur permettant de survivre dans un environnement compétitif, et peuvent également causer de graves maladies intestinales et extra-intestinales. Les souches pathogènes ont été regroupées en pathovars en fonction des signes cliniques chez l'Homme et des modes d'interaction avec les cellules de l'hôte. Parmi les pathovars intestinaux, les *Escherichia coli* entérohémorragiques (Enterohemorragic *Escherichia coli* en anglais, désignées sous l'acronyme EHEC) sont responsables de signes cliniques modérés à graves chez l'Homme. Il s'agit de la colite hémorragique, du syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou encore du purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT).

Toutes les EHEC produisent des shigatoxines Stx. Chez l'Homme, ces shigatoxines sont responsables de lésions de l'endothélium vasculaire intestinal, rénal et cérébral (O'Loughlin and Robins-Browne, 2001). Cependant, toutes les souches qui possèdent le gène *stx* (codant pour ces shigatoxines) ne sont pas pathogènes pour l'Homme. L'ensemble des souches qui possèdent le gène *stx* sont appelées STEC (*Escherichiacoli* productrices de shigatoxines ou Shigatoxin producing *Escherichia coli*).

Au sein des EHEC on distingue deux catégories : les EHEC dites « typiques » et celles dites « atypiques ».

Les EHEC typiques possèdent un îlot de pathogénicité que l'on appelle « Locus of Enterocyte Effacement » (LEE). Cet îlot regroupe des gènes qui codent pour l'ensemble des protéines responsables des lésions d'« Attachement/Effacement » (A/E) à l'origine de la colonisation du tube digestif. Chez l'Homme, ces lésions sont observées dans le côlon et la partie distale de l'iléon (McDaniel et al., 1995). Sur le plan génétique, toutes les souches qui possèdent le LEE (dont le gène marqueur est le gène *eae*, qui code pour la protéine intimine) sont désignées par l'acronyme AEEC pour « Attaching and Effacing *E. coli* ».

Les EHEC atypiques sont par opposition les EHEC qui ne possèdent pas le gène *eae* et ne produisent pas de lésions A/E. L'adhésion que l'on observe chez ces souches est assurée par des mécanismes différents de l'attachement et effacement. Ainsi, la souche EHEC O104:H4, responsable d'une épidémie à l'échelle européenne en 2011, a colonisé la muqueuse grâce au mécanisme d'adhésion propre aux *E. coli* entéroaggrégatives.

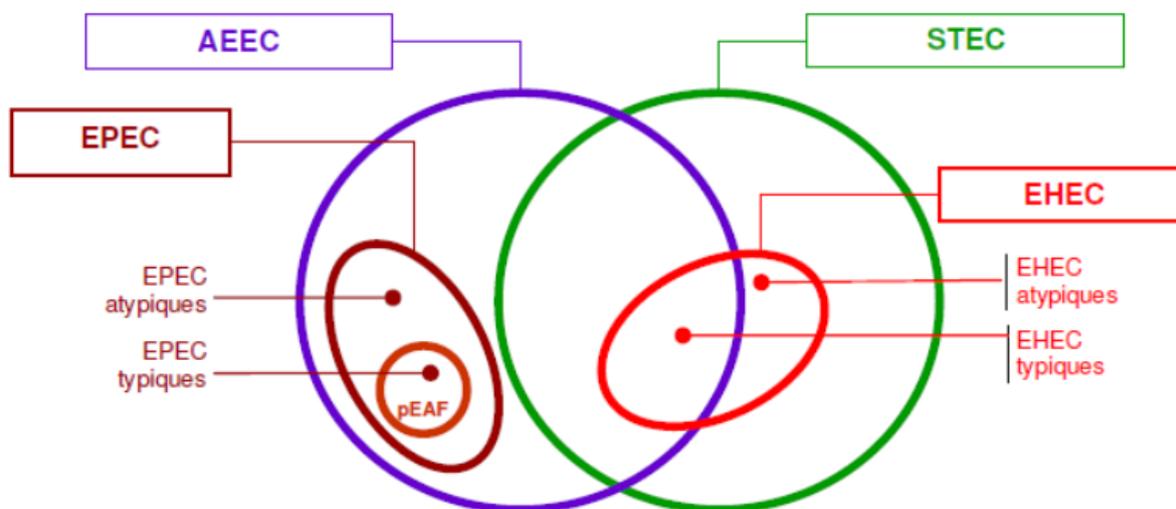


Figure 1 : Diagramme de Venn de la classification des *E. coli* pathogènes typiques et atypiques (Source : Afssa – Saisine n°2010-SA-0031)

Toutes les souches qui possèdent le LEE, incluant le gène *eae*, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des AEEC. Toutes les souches possédant les gènes codant pour les toxines Stx, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC.

Les souches appelées EPEC pour Enteropathogenic *E. coli* sont associées à une diarrhée aqueuse chez l'Homme et sont définies comme des souches possédant le LEE et ne produisant pas de toxine Stx. Le plasmide pEAF (qui code pour le facteur EAF, ou EPEC Adhesion Factor) permet de distinguer les souches EPEC typiques des EPEC atypiques.

Le terme EHEC regroupe les souches cliniques isolées chez des patients atteints de colite hémorragique et/ou de SHU. Hors contexte clinique, i.e. dans un prélèvement environnemental ou alimentaire, il est difficile d'identifier les souches qui, parmi les STEC, seraient susceptibles d'entraîner des maladies chez l'Homme. Plusieurs facteurs sont à considérer comme la présence de marqueurs de virulence, les statuts sanitaires des individus ainsi que la grande variabilité des symptômes que l'on observe. En effet, certains patients ne déclarent aucun symptôme alors que d'autres peuvent souffrir d'une diarrhée légère susceptible d'évoluer en colite hémorragique sévère.

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

Ces cinq sérotypes sont : O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28. Ces souches possèdent toutes les gènes *stx* et *eae*.

Hors contexte clinique, c'est-à-dire uniquement dans des prélèvements alimentaires ou environnementaux, si des STEC possèdent les mêmes caractéristiques que les EHEC du top 5 (autrement dit si elles appartiennent au même sérotype) alors elles peuvent être considérées comme potentiellement pathogènes chez l'Homme.

1.2 Les facteurs de virulence

1.2.1 Les shigatoxines (Stx)

Les shigatoxines sont les principaux facteurs de virulence des EHEC. Leurs cibles sont les récepteurs Gb3 (Globotriaosylcéramide) qui se trouvent au niveau des cellules endothéliales du côlon, des reins et du cerveau chez l'Homme. Elles sont de deux types (Stx1 et Stx2) qui présentent des différences au niveau de leur séquence nucléotidique et de leur toxicité. Pour détecter ces toxines on utilise un test de cytotoxicité sur cellules Véro (pour Verda Reno, nom donné aux cellules épithéliales rénales d'une espèce de singe vert africain). Pour cette raison les shigatoxines sont aussi parfois appelées vérotoxines. Ces toxines sont composées de deux sous-unités : A (pour Activity) et B (pour Binding).

Support génétique

Les Stx sont composées de sous-unités codées par un opéron présent sur le génome d'un phage lysogénique appelé « phage-Stx ». Ce phage est intégré dans le chromosome même des souches STEC (Herold et al., 2004). L'induction du phage déclenche la production des Stx. Après cette induction, le phage-Stx peut infecter d'autres bactéries. Cette transmission par le phage du gène *stx* étant assez fréquente, cela favoriserait l'émergence de nouvelles souches pathogènes pour l'Homme (Imamovic, Jofre et al. 2009).

Mode d'action

Les shigatoxines Stx1 et Stx2 ont le même mode d'action. D'abord la toxine se lie au récepteur Gb3 de la cellule grâce à la sous-unité B. Ce complexe va fusionner avec l'endosome, rejoindre l'appareil de Golgi puis le réticulum endoplasmique (REG). Une fois sur le REG, la toxine se libère de sa sous-unité A. La sous-unité A atteint les ribosomes cibles puis les dissocie. Cela a pour effet de stopper toute la synthèse protéique cellulaire (Obrig et al., 1987).

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

Les EHEC doivent coloniser le tube digestif de leur hôte en se liant aux entérocytes. Localement, pour les EHEC typiques, on observe des lésions d'attachement-effacement (A/E). Ces lésions sont le résultat de l'action combinée de plusieurs facteurs de virulence qui sont codés par des gènes regroupés sur l'îlot de pathogénicité appelé « Locus of Enterocyte Effacement » ou LEE.

Le LEE est composé de plusieurs régions majeures (Delahay et al., 2001 ; Deng et al., 2004 ; Stevens and Frankel, 2014) qui codent pour des protéines responsables de l'adhésion avec la cellule hôte. Parmi ces protéines on pourra citer le système de sécrétion de type III (T3SS) et l'intimine, protéine de la membrane externe bactérienne responsable de l'adhésion avec la cellule cible et qui est codée par le gène *eae*.

1.2.3 Le plasmide de virulence des EHEC

Les shigatoxines et le LEE sont systématiquement retrouvés dans les isolats cliniques d'EHEC O157:H7. C'est aussi le cas d'un plasmide de virulence. Dans le cas d'O157:H7 celui-ci est nommé pO157 (Schmidt et al., 1994).

Une corrélation très forte entre la présence du plasmide de virulence des EHEC et le développement de SHU chez les patients a été observée (Schmidt and Karch., 1996). Le séquençage génétique des plasmides de virulence a permis de caractériser plusieurs gènes ayant un rôle plus ou moins bien identifié dans la colonisation bactérienne. On a ainsi décrit le gène d'entérohémolysine A (*exhA*) ainsi que celui de l'adhésine putative (*toxB*).

L'entérohémolysine A est présente dans la majorité des souches O157:H7. Son gène, le gène *exhA*, est donc considéré comme un marqueur fiable pour le diagnostic des *E. coli* O157:H7 mais aussi des autres EHEC (Levine et al., 1987 ; Brunder et al., 1999). Le rôle de la protéine en question demeure incertain mais il a été avancé que l'entérohémolysine A est la cause d'une lyse des érythrocytes qui, par libération de l'hème, permettrait à la bactérie de satisfaire ses besoins en fer (Nataro and Kaper, 1998).

L'adhésine putative (*toxB*) jouerait, comme son nom l'indique, un rôle dans l'adhésion d'*E. coli* O157:H7 à la cellule épithéliale cible en augmentant la sécrétion des protéines codées par le système de sécrétion de type III dont nous avons parlé (T3SS) (Nicholls et al., 2000 ; Tatsuno et al., 2001).

1.3 Les infections humaines liées aux EHEC

1.3.1 Physiopathologie des infections liées aux EHEC

La dose infectieuse minimale d'EHEC pouvant causer des symptômes est très faible, de l'ordre de 5 à 50 bactéries pour O157:H7 (Betts, 2000). Les symptômes chez l'Homme peuvent aller du portage bénin au décès. L'évolution clinique suit généralement le schéma suivant :

- colonisation du tube digestif qui se traduit par une diarrhée aqueuse,

- libération des shigatoxines par la bactérie au niveau des cellules intestinales. Les tissus épithéliaux et endothéliaux sont altérés et on observe l'apparition d'une diarrhée sanglante. Dans le même temps les Stx et le lipopolysaccharide (LPS) de la bactérie passent dans la circulation sanguine ce qui entraîne la sécrétion de cytokines chez l'hôte,

- Stx et cytokines peuvent avoir un impact sur les cellules endothéliales rénales et sur le tissu cérébral. Dans ce cas de figure on observe alors une Microangiopathie thrombotique (MAT) qui consiste en une lésion des cellules de la microcirculation, un gonflement cellulaire local et une adhérence accrue des plaquettes.

Le Syndrome hémolytique et urémique (SHU)

La Micro-angiopathie thrombotique (MAT) est à l'origine du Syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez les populations les plus sensibles (franges jeunes et âgées de la population). Le SHU s'ajoute à une colite hémorragique pour

10% des patients (Bouvet et al., 2003). Lorsque c'est le cas on parle de SHU typique. Un SHU atypique survient en l'absence de diarrhées sanglantes (10% des SHU sont atypiques en moyenne d'après Lopez et al., 1989).

Le SHU typique se caractérise par une anémie hémolytique brutale, une thrombocytopénie, une insuffisance rénale aiguë voire, dans 20 à 50% des cas, par une atteinte du système nerveux central impliquant convulsions, torpeur ou coma (Steinborn et al., 2004 ; Nathanson et al., 2010). Cette atteinte nerveuse est en France la principale cause de décès associée aux infections à EHEC (Decludt et al., 2000). Les SHU typiques sont principalement causés par *E. coli* O157:H7 (Davis et al., 2014).

Un enfant souffrant d'infection à *E. coli* O157:H7 a 10% de risque de développer un SHU. On observe généralement d'importantes séquelles rénales et environ 1% des enfants atteints de SHU en meurent.

Le Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

Le PTT est une manifestation clinique plus rare qui touche essentiellement les adultes (Andreoli et al., 2002). Dans le cas de la PTT on a une atteinte neuronale prononcée, à la différence du SHU (Remuzzi, 1987).

Au niveau tissulaire on observe la formation de thrombi plaquettaires et de dépôts de fibrine au niveau des artérioles. Le PTT peut durer quelques jours ou plusieurs semaines et les affections neurologiques peuvent dans certains cas entraîner la mort (Bouvet et al., 2003).

1.3.2 Diagnostic, pronostic et traitement des infections à EHEC

Le diagnostic bactériologique repose sur l'isolement dans les matières fécales des EHEC. Des outils de biologie moléculaire permettent de détecter les gènes de virulence *stx*. Cette recherche n'est pas réalisée systématiquement lors de demande de coproculture par les médecins. L'augmentation du titre sérique des anticorps anti-lipopolysaccharides (anti-LPS) est également un outil diagnostique. En effet, les LPS diffusent dans le sang au cours de l'infection bactérienne de la même manière que les shigatoxines.

L'utilisation des antibiotiques reste controversée dans le traitement des infections à EHEC. Presque aucune étude n'a pu montrer par exemple que l'utilisation d'antibiotiques auxquels O157:H7 est sensible réduit effectivement la durée de la maladie. Pire, la destruction de la cible bactérienne accentue la libération dans le sang des toxines que sont les *stx* et les LPS (Cimolai et al., 1990, Tarr, 1995, Wong et al., 2000).

Ainsi, l'utilisation d'antibiotiques chez les sujets ayant une diarrhée à *E. coli* O157:H7 n'est pas recommandée. En Allemagne, une étude menée sur des patients infectés par *E. coli* O104:H4 a cependant montré que l'utilisation d'azithromycine peut diminuer le portage de la bactérie (Nitschke et al., 2012). Récemment, une revue d'études menée en 2015 par Agger et al. a mis en évidence la grande variabilité des réponses au traitement antibiotique. Certaines études montraient une augmentation du risque de développer un SHU, d'autres une absence d'effet et deux études encore ont montré une diminution de ce risque. Il convient donc de nuancer les conclusions en soulignant la variabilité des facteurs à prendre en compte (nature de l'antibiotique, virulence de la souche cible, catégorie de patient...).

Toutefois, l'observation des symptômes de diarrhée sanglante avec fièvre chez l'enfant ne doit pas remettre en cause l'administration d'antibiotiques. En effet, il est possible que de tels symptômes soient dus à une infection intestinale à *Shigella* ou *Salmonella*, qui elles répondent favorablement au traitement par antibiotiques (en l'absence de résistance particulière des souches). Les techniques actuelles ne permettant pas d'établir le diagnostic différentiel assez rapidement, les antibiotiques sont administrés par défaut. En outre, il n'existe aucun vaccin disponible pour les EHEC actuellement.

Aujourd'hui le taux de mortalité à la phase aiguë d'un SHU est inférieur à 5% (Decludt et al., 2000 ; Repetto, 1997). Ce résultat est obtenu par la mise en place de traitements symptomatiques comme des apports hydro-électrolytiques et nutritionnels par voie orale voire parentérale. Pour les enfants oliguriques la dialyse péritonéale est indiquée.

1.3.3 Epidémiologie des infections à EHEC

La population la plus sensible au SHU est constituée par les enfants de moins de trois ans et par les personnes âgées (plus de 65 ans). En 2015 par exemple, l'incidence annuelle était de 3,1 cas pour 100 000 enfants âgés de 0 à 2 ans (Bilan SHU InVS 2015). Cette incidence passe à 0,9 de 3 à 5 ans et tombe à 0,2 pour la tranche 11-14 ans. De manière générale, 10% des enfants de moins de 10 ans souffrant d'infection à *E. coli* O157:H7 développeront un SHU et pour les personnes de plus de 65 ans les chiffres sont de 10 à 20% de risque.

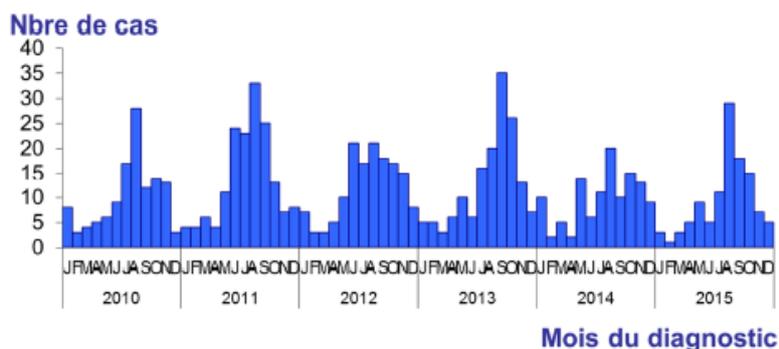


Figure 2 : Distribution mensuelle du nombre de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans en France de 2010 à 2015 (Bilan SHU InVS 2015)

La surveillance des infections aux EHEC qui surviennent en France se fonde essentiellement sur la surveillance du SHU chez les enfants de moins de 15 ans réalisée par un réseau de pédiatres néphrologues volontaires. La survenue de cas groupés de colite hémorragique peut faire l'objet de notifications dans le cadre de la surveillance des TIAC (Toxi-infections alimentaires collectives). La recherche des STEC dans les selles n'est pas un examen qui s'effectue en routine dans les laboratoires d'analyse. La surveillance des SHU a débuté en 1996 et est réalisée par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) et par la Société de néphrologie pédiatrique. La confirmation de l'infection est réalisée par le Centre national de référence (CNR) des *E. coli* qui met en évidence la présence d'anticorps sériques dirigés vers le LPS des souches STEC les plus communes.

La confirmation passe également par l'isolement des souches STEC ou par la détection des gènes *stx* et *eae* par PCR.

Le dernier rapport de l'InVS stipule que 111 cas de SHU ont été notifiés en 2015 parmi lesquels on compte un décès. L'incidence annuelle est de 0,94 cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans. Le sérotype le plus fréquent, cette année encore, était O157 avec 17% des cas totaux.

Sérogroupe*	n	% des cas totaux de 2015
0157	19	17
026	16	14
080	15	13
055	4	4
0111	4	4
0145	3	3
0103	2	2
0121	2	2
0104	1	1
026-080	3	3
026-0111	1	1
026-0145	1	1
055-0145	1	1
055-080	1	1
Non-sérotypable (NST)	6	5
Présence de gènes <i>stx</i> dans les selles sans souche	14	12
Infection non-confirmée	18	16
Total	111	100

* Pour 21 patients le sérotype a été déterminé uniquement par la sérologie.

Figure 3 : Résultats des recherches des STEC chez les 111 cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans identifiés par PCR, isolement de souche ou sérologie en France pour l'année 2015 (Bilan SHU InVS 2015)

1.4 Les réservoirs d'EHEC

De très nombreux animaux sont susceptibles de porter les *E. coli* productrices de shigatoxines. Le portage est alors asymptomatique (Persad and LeJeune, 2014 ; Pruimboom-Brees et al., 2010).

Les bovins sont le réservoir naturel des EHEC (Gyles, 2007). Il a été estimé que 1,8% des bovins adultes abattus en France sont porteurs d'EHEC du top 5. Parmi les sérotypes détectés, O157:H7 est le plus présent (Bibbal et al., 2014, Bibbal et al., 2015).

Les caprins et les ovins constituent également un réservoir à EHEC. Une étude menée en 2016 par Alvarez-Suarez et al. s'est intéressée à l'identification de plusieurs EHEC présentes dans le lait de chèvre et dans l'environnement d'élevage. Il en ressort que le réservoir caprin est aussi à prendre en compte dans l'épidémiologie des EHEC et en particulier d'O157:H7.

D'autres hôtes, qualifiés d'accidentels en raison de leur incapacité à maintenir une colonisation intestinale en dehors de toute exposition à la bactérie, peuvent jouer un rôle dans la contamination humaine. Il s'agit des porcs, des chiens, des chevaux et de la volaille (surtout les dindes).

Enfin, les poissons et fruits de mer, s'ils peuvent posséder les sérotypes producteurs de shigatoxines, sont incapables de les transmettre aux autres espèces autrement qu'en étant directement ingérés.

1.5 Voies de transmission des EHEC à l'Homme

Un humain peut s'infecter par une souche EHEC de plusieurs façons : consommation de viande insuffisamment cuite (en particulier la viande de bovin hachée), de produits laitiers, de fruits ou légumes crus, par contact avec des animaux contaminés ou leurs fèces, ou encore par contact avec une autre personne contaminée. Comme on le comprend, ces facteurs impliquent le compartiment animal, environnemental et bien entendu humain. Cela nécessite d'approcher ce problème de santé publique de manière intégrée, systémique et unifiée (approche dite « One Health » pour « Une seule santé »).

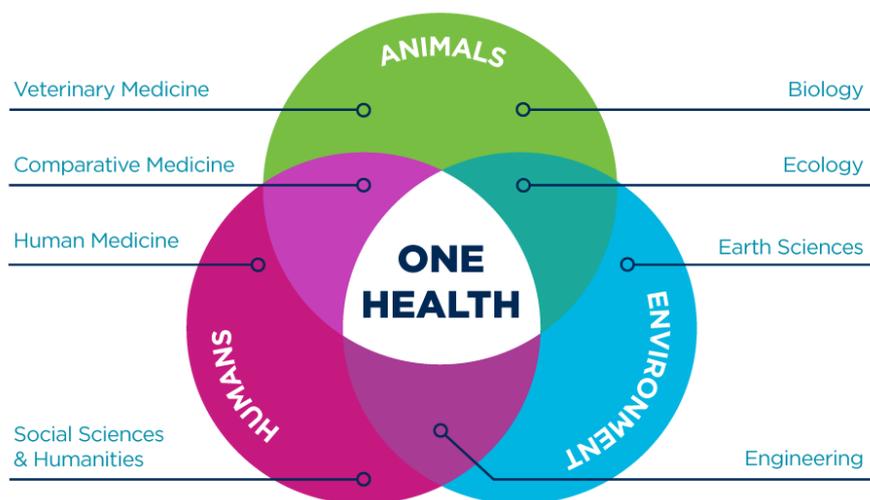


Figure 4 : Illustration du concept du système One Health par un diagramme de Venn (Source : www.ucdavis.edu/one-health/collaborations)

CHAPITRE 2 : CARACTERISTIQUES DU PORTAGE DES EHEC O157:H7 CHEZ LE BOVIN

2.1 Les caractéristiques du portage chez le bovin

2.1.1 Les zones de colonisation intestinale

Dans une étude menée sur quatre souches d'*E. coli* O157:H7, Naylor, S. W. et al. (2003) ont montré que les niveaux de concentration étaient les plus élevés dans les fèces. Les tissus les plus colonisés par ces bactéries sont une partie de la muqueuse épithéliale sur une zone d'environ 5 cm qui part de la jonction recto-anale et remonte le rectum. Ce tissu, cible d'O157:H7, se distingue par une haute densité en follicules lymphoïdes. Par la suite, les bactéries se trouvent majoritairement présentes à la surface de l'échantillon de fèces. Ces caractéristiques ne sont pas partagées par les autres sérotypes d'*E. coli* (qui eux sont présents dans la totalité du côlon).

Naylor, S. W. et al. (2005) ont poursuivi l'investigation menée sur la colonisation bactérienne d'*E. coli* O157:H7 des quelques centimètres les plus distaux du rectum bovin. Ils ont montré dans cette étude le rôle essentiel de l'opéron LEE4 qui encode pour la protéine T3SS (Type III secretion system) dans la colonisation tissulaire. T3SS est une protéine ayant la forme d'une aiguille qui joue un rôle central dans l'infection de la cellule hôte. On en trouve de plusieurs types chez plusieurs bactéries Gram-négatif telles que *Shigella* ou *Salmonella*. Des lésions de type attachement et effacement (A/E) ont de plus été détectées dans la partie terminale du rectum. La colonisation en *E. coli* des bovins semble donc caractérisée par une sécrétion de type III et par l'apparition de ces lésions A/E dans la région terminale du rectum.

2.1.2 La durée d'excrétion

Les études d'Hancock et al., Widiasih et al., Liebana et al. et Ezawa et al. ont cherché à évaluer la durée d'excrétion moyenne d'*E. coli* O157:H7. Il en ressort que cette excrétion est intermittente et de courte durée à l'échelle de l'animal. A l'échelle du troupeau elle peut persister bien plus longtemps. A titre d'exemple l'étude de Widiasih montre que pour des veaux de 1 à 10 mois cette excrétion est comprise entre 1 et 10 semaines. Les autres études, à prélèvements mensuels, observent la fin de l'excrétion entre le quatrième et le cinquième mois de prélèvement. Certains clones ont pu être prélevés pendant 17 mois sur le même site d'élevage.

Ces études ne permettent pas de savoir si les souches d'*E. coli* O157:H7 sont totalement éliminées par le bovin lorsque les prélèvements sont négatifs ou si la bactérie persiste à bas bruit dans le tube digestif.

2.1.3 Les animaux « super-excréteurs » ou « super-shedders »

Certains animaux présentent de très hauts niveaux d'excrétion et pourraient jouer un rôle dans la persistance de ces souches au niveau des élevages. Ces animaux sont appelés « super-shedders » en Anglais et « super-excréteurs » en Français. Ils peuvent excréter des souches *E. coli* O157:H7 à plus de 10^3 - 10^4 UFC par gramme de fèces, à la différence de la plupart des autres individus qui excrètent souvent à des niveaux inférieurs aux seuils de détection. La présence de ces super-

excréteurs dans le troupeau peut à elle seule expliquer la contamination observée de l'environnement d'élevage (Brichta-Harhay et al. 2007 ; Omisakin et al. 2003 ; Robinson et al. 2004) et donc être à l'origine des prévalences relevées dans ces élevages.

Low et al. (2005) ont montré qu'un lot contenant un animal excréteur de tels taux avait un risque très important de compter de nombreux animaux positifs en son sein. Telle observation a été confirmée par d'autres études (Chase-Topping et al. 2007 ; Cobbold et al., 2007).

Un lot contenant un ou plusieurs individus super-excréteurs voit les différents animaux qui le composent porter davantage de bactéries sur les cuirs qu'un lot sans ces individus particuliers, ce qui augmente les risques de contamination des carcasses lors des opérations réalisées en abattoir (Arthur et al., 2009).

2.2 La prévalence régionale des EHEC O157:H7

Une méta analyse sur la variation régionale de la prévalence d'*E. coli* O157:H7 a été publiée en 2014 par Md. Zohorul Islam et al.. Elle recueille des données pour 138 pays différents et comprend environ 140 études. La conclusion est que la prévalence associée à O157:H7 est de 5,68% en moyenne avec une valeur maximale moyenne de 31,2% en Afrique et une valeur minimale moyenne de 1,65% en Amérique Latine. L'Union Européenne est proche de la moyenne mondiale avec 5,15% de prévalence. La publication souligne le rôle important de la différence du type de bovin étudié (laitier, à viande, à l'engraissement...) qui accentue les différences régionales que l'on peut trouver.

L'étude précise aussi que les modes de prélèvement des échantillons peuvent influencer grandement les résultats obtenus (récolte de fèces classiques, de fèces rectales, de fèces intestinales, raclage rectal...). Les fèces prélevées directement dans l'intestin auraient ainsi en moyenne une plus grande quantité d'unités formant colonies par rapport aux autres types de prélèvement. De plus cette méta-analyse insiste sur le rôle majeur des protocoles d'isolation de la bactérie et plus généralement des techniques de détection. Les seuils de détection seraient par exemple variables selon la région du monde, de même que les quantités d'échantillons utilisées.

Enfin, la plupart des études ont été conduites sur des élevages industriels, qui pour certaines zones de la planète ne constituent pas la majorité des élevages que l'on rencontre. Les prévalences associées à ces zones ne reflètent donc a priori pas la prévalence réelle.

Geue et al. ont mis en évidence une grande hétérogénéité des portages d'EHEC non seulement entre les fermes (de 28,8% à 81,5%) mais aussi entre les animaux d'une même ferme. En effet, au sein d'un même troupeau on peut observer des animaux qui excrètent souvent (75 à 100% de prélèvements positifs sur trois ans) et d'autres très peu (0 à 10% sur la même période).

D'autres études (Hancock et al. ; Than et al., 1998) ont confirmé cette variabilité et observé des troupeaux initialement négatifs devenir positifs au cours de la période de surveillance, avec des jours de plus ou moins grande excrétion dans les troupeaux.

2.3 Les facteurs d'influence du portage observé des EHEC O157:H7

2.3.1 L'effet de l'âge des animaux

Plusieurs études ont montré que le regroupement de jeunes veaux dans le même environnement constituait un facteur de risque important pour l'excrétion massive d'*E. coli* O157:H7. En effet, les veaux excrètent plus fréquemment *E. coli* O157:H7 et à des taux bien supérieurs aux adultes. Ainsi, les veaux constitueraient, au sein même du réservoir bovin, un réservoir à EHEC qui contaminerait régulièrement les adultes situés à proximité (Cray and Moon, 1995).

2.3.2 L'effet du mode d'élevage

La plupart des études s'intéressant à la relation entre la taille du cheptel et la prévalence d'*E. coli* O157:H7 au sein des troupeaux laitiers n'ont pas montré de corrélation entre les deux facteurs (Dodson and Lejeune, 2005).

En 2006 Viodic et Korber ont montré en revanche que, pour les bovins à l'engraissement, plus la densité en animaux est forte et plus la prévalence en *E. coli* O157:H7 est élevée.

Une méta-analyse de plusieurs études menées sur la variation de prévalence régionale pour *E. coli* O157:H7 dans les troupeaux bovins a révélé que le type d'élevage (laitier, allaitant, d'engraissement) avait une grande importance dans cette prévalence. En particulier, une étude menée par Jeon et al. en 2013 montre que la prévalence en *E. coli* O157:H7 était largement supérieure dans les troupeaux à l'engraissement (autour de 20%) par rapport aux troupeaux laitiers (2% environ).

2.3.3 L'effet de la saison sur l'excrétion

De nombreuses études (Dunn et al., 2004, Than et al., 1998, Widiastih et al., 2001 ; Hancock et al., 1998) ont montré que la période estivale de l'année pour les zones à climat tempéré correspond à une période de prévalence plus importante. Dans l'étude de Dunn et al. par exemple, on constate que les prévalences relevées en mai et juillet (7,6% et 6,6%) sont nettement supérieures à celles observées en février (0,61%) et octobre (0,63%).

Il est cependant difficile de caractériser nettement l'« effet saison » car les périodes de temps ne sont pas identiques d'une étude à l'autre et de multiples facteurs peuvent influencer les résultats (notamment les techniques de laboratoire, le type de bovin, l'environnement d'élevage...).

Ainsi Callaway et al. (2009) ont montré que la prévalence de souches potentiellement pathogènes peut varier de 5% l'hiver à 80% l'été chez les bovins à l'engraissement de type « feedlot ».

Les mois les plus chauds favoriseraient la survie d'*E. coli* O157:H7 dans le milieu naturel (eau, nourriture, litière...) et donc sa transmission au sein du troupeau. Toutefois certaines études (Alam et Zurek, 2006 ; Ogden et al., 2004 ; Sargeant et al., 2000) montrent des résultats inverses, avec une prévalence supérieure durant

les mois d'hiver. Cela pourrait s'expliquer par la mise en claustration des troupeaux qui diffuseraient mieux la bactérie, la densité en animaux dans le bâtiment étant bien plus élevée que le reste de l'année. D'autres études (Berry et al. 2007, Ishii et al., 2006) ont montré que les basses températures pouvaient stimuler la prolifération d'O157:H7 dans les sols et les déjections, ce qui expliquerait les résultats contradictoires de prévalence.

D'autres facteurs peuvent expliquer les résultats observés lors de changements de températures, comme le stress des animaux en période de chaleur ou l'adaptation du métabolisme au rallongement de la photopériode (Edrington et al., 2006).

CHAPITRE 3 : MESURES DESTINEES A REDUIRE LE PORTAGE DES EHEC PAR LES BOVINS

Limiter le portage sain par les ruminants, et donc l'excrétion fécale de ces pathogènes, permettrait de limiter leur propagation dans la chaîne alimentaire de l'Homme. En effet, aucune thérapie spécifique n'existe à ce jour pour lutter efficacement contre l'infection humaine. Réduire le portage animal est donc une stratégie de choix pour réduire les toxi-infections à EHEC et éviter les situations épidémiques et les crises qui peuvent en résulter dans les filières de production concernées. Il a en effet été démontré qu'il existait une corrélation forte entre la prévalence d'*E. coli* O157:H7 dans les fèces des bovins et sur leurs poils et la contamination des carcasses au cours de la préparation (Elder et al., 2000).

3.1 Sources, transmission et modalités de contrôle des EHEC

Le réservoir des EHEC est le tube digestif des ruminants. Les souches EHEC sont ensuite disséminées par excrétion dans les matières fécales. Les EHEC, notamment celles appartenant au sérotype O157:H7, peuvent persister longtemps dans l'environnement. Les fumiers, lisiers, sols, eaux, abreuvoirs, cornadis souillés ont ainsi été identifiés comme étant des sources de contamination. Une étude menée dans un troupeau de bœufs infectés expérimentalement a permis d'isoler dans l'environnement des *E. coli* O157:H7 jusqu'à 14 semaines après l'inoculation (Davis et al., 2005). Cette étude a par ailleurs mis en évidence que les souches *E. coli* O157:H7 inoculées avaient pu être isolées de l'aire de couchage et au niveau de l'eau des abreuvoirs alors qu'elles n'étaient pas isolées de fèces de bovins.

Les EHEC peuvent donc survivre dans de nombreuses « niches environnementales » qui pourront être à l'origine de la contamination des bovins. Par ailleurs d'autres hôtes peuvent être porteurs d'EHEC et amplifier la dissémination de ces pathogènes comme les mammifères ou les oiseaux. Les insectes, notamment les mouches, ont également été identifiés dans la dissémination des *E. coli* O157:H7. Certains bovins, qualifiés de « super excréteurs » (super-shedders), présentent une excrétion plus longue et plus importante d'*E. coli* O157:H7 que les autres animaux. Ils pourraient servir de relais de contamination et contribueraient à une augmentation de la prévalence au sein des troupeaux (Chase-Topping et al., 2008).

Des revues ont procédé à l'examen critique de l'ensemble des facteurs de risques de la prévalence et de la transmission des *E. coli* O157:H7 (Berry and Wells, 2010 ; Besser et al., 2014 ; Ferens and Hovde, 2011 ; Soon et al., 2011). La **figure 5** illustre et résume les sources et les voies de transmission des *E. coli* O157:H7 dans les élevages de bovins.

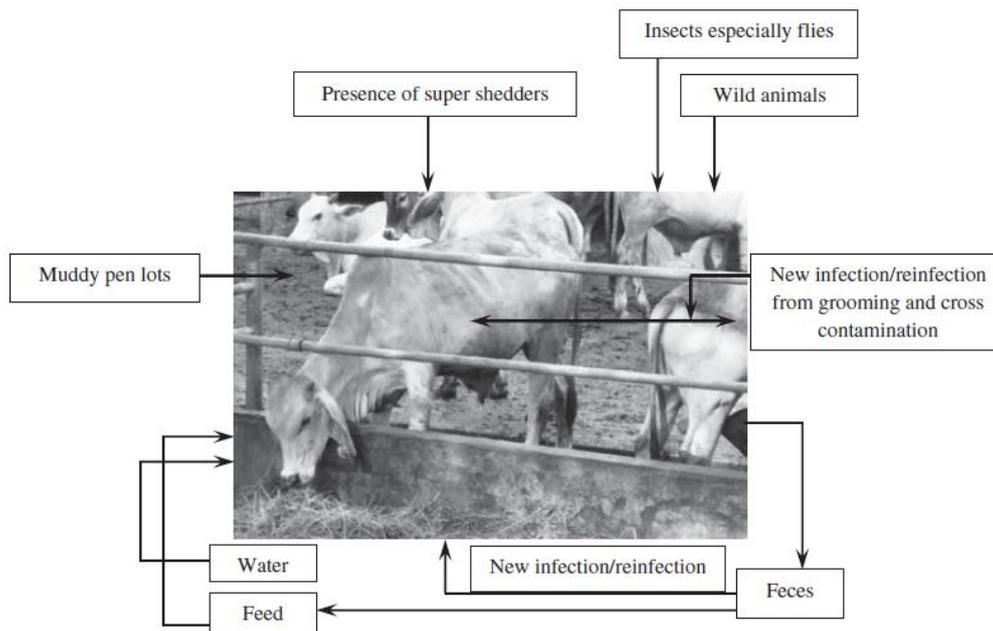


Figure 5 : Sources et voies de transmission des *E. coli* O157:H7 dans les élevages de bovins. (Source : Soon et al., 2011)

A la vue des caractéristiques épidémiologiques et écologiques des EHEC, deux types de mesures de maîtrise de ce pathogène peuvent être mises en place.

Tout d'abord, des actions globales au niveau de l'élevage permettront de limiter la contamination des bovins à partir de « niches environnementales ». Ces mesures relèvent des bonnes pratiques d'élevage. Elles permettent de prévenir la contamination des aliments par les bactéries pathogènes pour l'Homme qui ont un portage digestif chez le bovin (notamment les salmonelles).

Par ailleurs, des actions ciblées permettront de réduire le portage intestinal des EHEC par les bovins s'il y a eu contamination. Il s'agit principalement de modification de la ration alimentaire, de l'utilisation de probiotiques, de bactériophages ou la vaccination des troupeaux. La **figure 6** illustre et résume les mesures de contrôle des EHEC O157:H7 proposées.

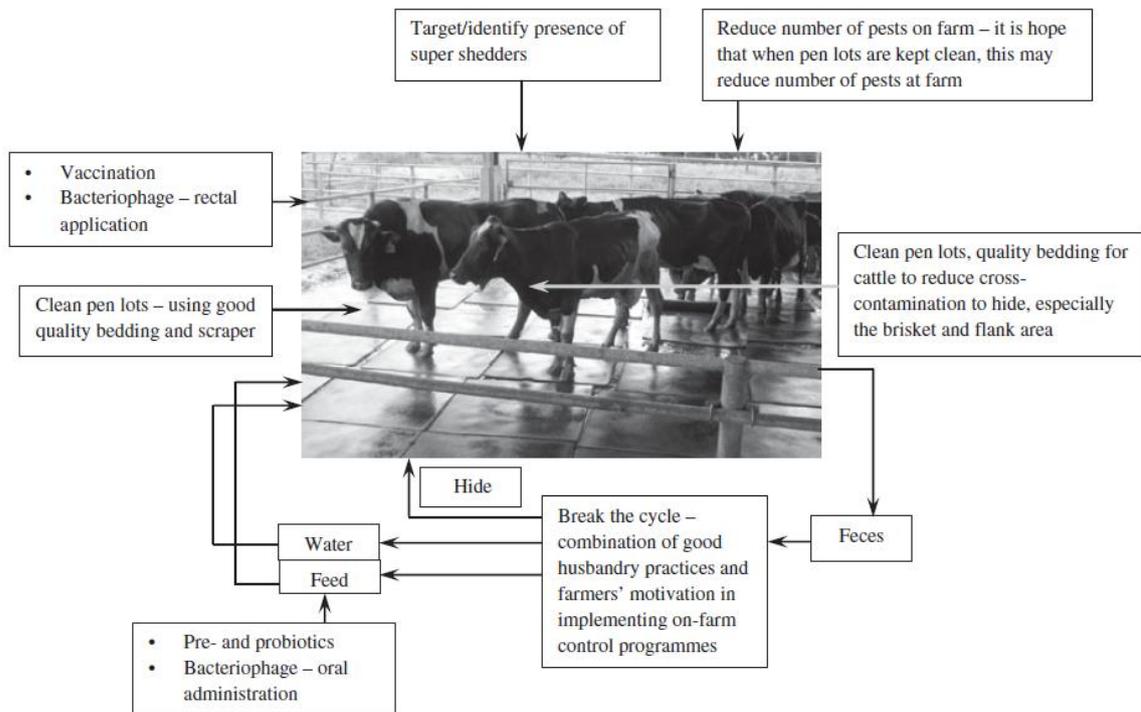


Figure 6 : Mesures de contrôle des *E. coli* O157:H7 dans les élevages de bovins.
(Source : Soon et al., 2011)

Les principales études visant à évaluer ces mesures ont été menées sur le sérotype O157:H7. Des revues récentes font une analyse critique des études des différentes mesures de contrôle des EHEC à la ferme (Berry and Wells, 2010 ; Besser et al., 2014 ; Soon et al., 2011). Toujours au niveau de l'élevage, d'autres revues abordent à la fois la maîtrise des EHEC, mais également d'autres agents pathogènes dans la filière viande bovine et dans d'autres filières (Adam and Brulisauer, 2010 ; Doyle and Erickson, 2012). Enfin, en 2014, la FSIS (US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service) a dressé un état des lieux des travaux de recherche qui ont évalué différentes mesures de contrôle des EHEC au niveau de l'élevage (source : <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d5314cc7-1ef7-4586-bca2-f2ed86d9532f/Reducing-Ecoli-Shedding-in-Cattle.pdf?MOD=AJPERES>).

3.2 Mesures destinées à limiter la contamination des bovins par les EHEC

La **figure 7** résume et illustre les bonnes pratiques d'élevage destinées à éviter la contamination des bovins et de leurs produits par des EHEC et plus largement par des bactéries pathogènes pour l'Homme ayant un portage digestif.

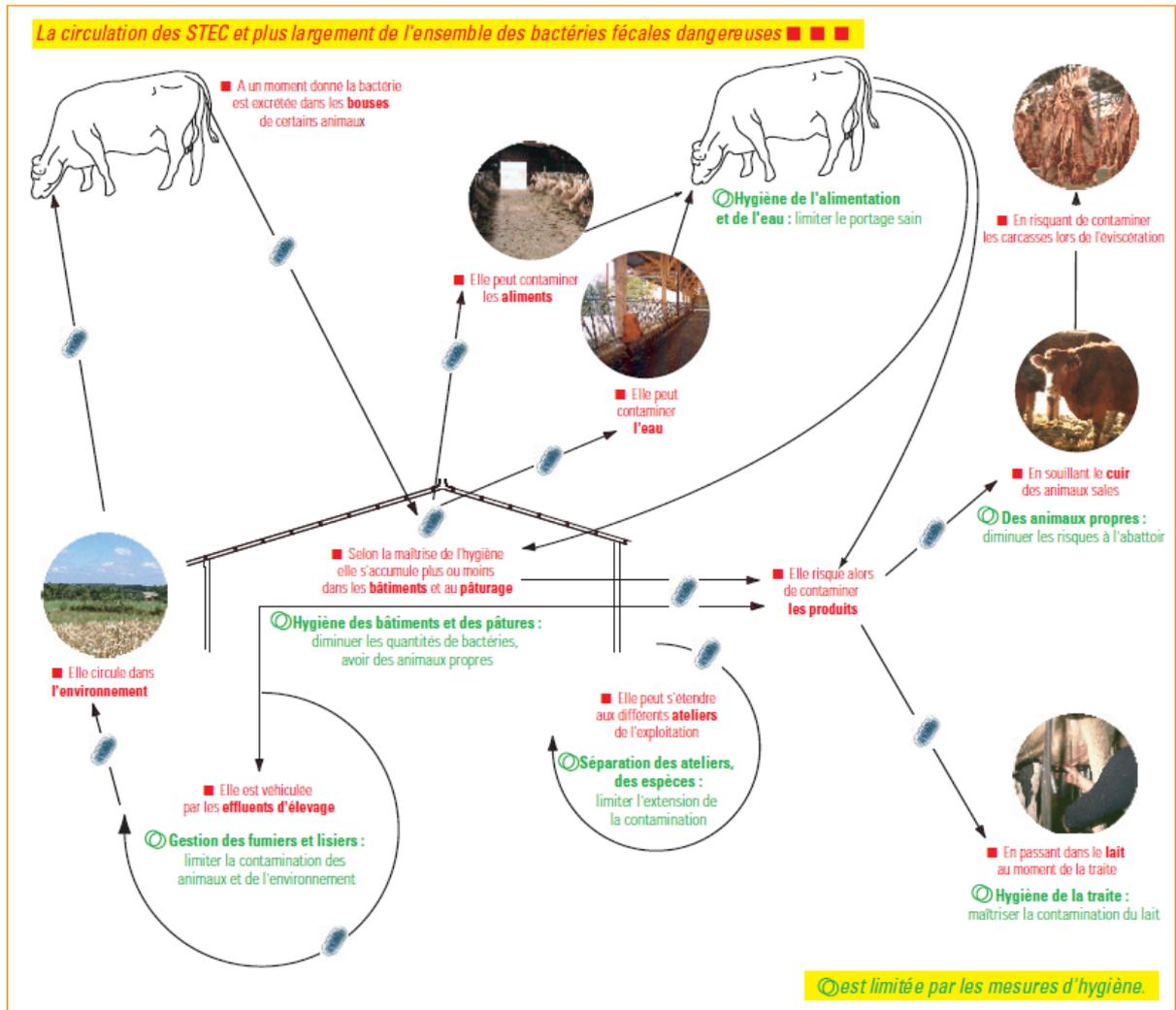


Figure 7 : Bonnes pratiques d'élevage destinées à limiter la contamination des bovins par les EHEC.

(Source : Plaquette FNGDS et Institut de l'Élevage « Dès l'élevage, prévenir les risques de contamination des aliments par des bactéries fécales »)

Les paragraphes suivants se concentrent sur les études qui se sont intéressées à l'effet de ces mesures sur le portage et l'excrétion des EHEC par les bovins.

3.2.1 Abreuvement et alimentation

Abreuvement

Les abreuvoirs ont été identifiés comme étant une source de contamination d'*E. coli* O157:H7 pour les bovins. Ces souches peuvent persister dans les sédiments et rester infectieuses pour les bovins pendant plusieurs mois, voire s'y multiplier pendant les périodes chaudes de l'année (Davis et al., 2005; LeJeune et al., 2001). Les sédiments consistent en un mélange de nourriture et de fèces colonisé par de nombreuses bactéries et protozoaires. Des clones identiques ont été extraits à la fois des bovins et de l'eau de boisson sur la même ferme (Shere et al., 1998 ; Van Donkersgoed et al., 2001). Par ailleurs, il a été démontré qu'une eau de boisson contaminée permettait l'inoculation d'*E. coli* O157:H7 aux bovins (Shere et al., 2002).

Tous ces éléments indiquent que le contrôle de la qualité de l'eau de boisson des bovins serait un point de contrôle des EHEC. Un certain nombre d'études se sont attachées à évaluer l'effet de mesures de décontamination de l'eau en prenant en compte les quantités importantes de matière organique qui peuvent se trouver au niveau des abreuvoirs et donc compromettre l'efficacité de la décontamination (Berry and Wells, 2010).

Néanmoins, l'impact de la décontamination de l'eau de boisson sur la diminution de la prévalence des EHEC n'a pas été démontré. Des auteurs ont montré que la prévalence de bovins porteurs d'*E. coli* O157:H7 n'était pas corrélée avec la présence de ce pathogène dans l'eau de boisson, le pH ou la propreté de l'eau (Smith et al., 2001). L'amélioration de l'hygiène des abreuvoirs n'a également pas permis de diminuer la prévalence d'*E. coli* O157:H7 chez les jeunes bovins (Ellis-Iversen et al., 2008).

Il faut tout de même souligner que d'autres études mettent en avant l'importance de maîtriser l'hygiène des abreuvoirs. Par exemple, une étude a modélisé la survie des populations d'*E. coli* O157:H7. Les simulations ont mis en évidence qu'*E. coli* O157:H7 était capable de survivre dans un « feedlot » à travers la contamination et la dissémination par les abreuvoirs et les sols, et ce sans croissance dans le tube digestif des bovins (Ayscue et al., 2009).

Alimentation

La nourriture des bovins peut également être contaminée par des *E. coli* O157:H7 et a été incriminée dans la dissémination de ce pathogène au sein des troupeaux. Une synthèse des études consacrées à ce facteur de risque a révélé que la détection d'*E. coli* O157:H7 dans la nourriture avant d'être donnée aux bovins était peu fréquente (Berry and Wells, 2010).

En effet, depuis 2004 le Codex Alimentarius a détaillé un « Code d'usage pour une bonne alimentation animale » qui permet, si l'on suit ses recommandations, d'éviter les contaminations en agents pathogènes. Ce code rappelle en outre que si le processus de fabrication ou de distribution s'y prête, l'usage de la méthode de contrôle HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) est conseillé.

Par contre, la prévalence de la contamination des aliments augmente une fois qu'ils ont été distribués aux bovins. La contamination peut être due aux bovins porteurs *via* la salive ou les fèces ou à d'autres animaux, oiseaux ou insectes porteurs (Dodd et al., 2003). L'hygiène des mangeoires apparaît donc comme un point de maîtrise important.

3.2.2 Nettoyage et désinfection des locaux

Les sols contaminés par les fèces de bovins porteurs sont également à l'origine de la contamination de nouveaux bovins. Une relation a été mise en évidence entre la propreté des cuirs, la prévalence du pathogène et l'état de l'enclos. Les pourcentages d'animaux excréteurs étaient plus élevés dans les environnements

boueux ou humides par rapport aux environnements classiques (Smith et al., 2001). Les auteurs de cette étude ont supposé que les enclos boueux favorisaient la transmission du pathogène par la voie oro-fécale. Cela tiendrait en partie au comportement naturel des bovins qui communiquent beaucoup par léchage. Certains auteurs suggèrent que les sols contaminés seraient une source d'infection plus importante que la nourriture ou la boisson (Bach et al., 2005).

Il a été montré par ailleurs que la mise à disposition des zones de couchage propres et sèches diminuait la prévalence d'*E. coli* O157:H7 (Ellis-Iversen et al., 2008).

Comme on l'a déjà dit, les *E. coli* O157:H7 ont une capacité à survivre longtemps dans l'environnement. Plusieurs études montrent que la plupart des souches isolées dans un même élevage présentent une grande proximité génétique et sont isolées pendant plusieurs années, et ce malgré un turn-over important au niveau du troupeau (Lahti et al., 2003; LeJeune et al., 2004).

Ces éléments indiquent que de bonnes pratiques de manipulation, de compostage et d'épandage du fumier et des lisiers doivent permettre de réduire la contamination de l'environnement par des souches d'*E. coli* O157:H7 et donc sa dissémination.

3.3.3 Conduite d'élevage

Un certain nombre de facteurs ont été identifiés comme pouvant augmenter la prévalence de bovins porteurs d'EHEC : élevage à l'intérieur de bâtiments, densité de bovins importante, augmentation du stress des bovins (comme lors d'un transport), etc. Une revue détaillée en est réalisée par Ferens et al. (Ferens and Hovde, 2011).

Une piste intéressante serait la détection des bovins super-excréteurs. En effet, une étude de modélisation, à l'aide de données épidémiologiques de plusieurs fermes en Ecosse, a mis en évidence que 80% de la transmission des souches d'*E. coli* O157:H7 serait due aux 20% de bovins super-excréteurs (Matthews et al., 2006). Néanmoins, aucune technique n'est au point pour réaliser ce dépistage en routine dans les élevages.

3.3 Mesures destinées à diminuer le portage par modification du milieu intestinal

3.3.1 Modifications de la ration alimentaire

Plusieurs réflexions ont été menées sur l'optimisation de la ration alimentaire dans l'objectif d'influencer la prévalence d'*E. coli* O157:H7 dans la partie intestinale du tube digestif chez le bovin. L'idée est de modifier le micro-environnement gastro-intestinal du bovin pour empêcher la croissance de cette bactérie pathogène. Cela peut par exemple s'obtenir en favorisant la croissance d'autres bactéries susceptibles de prendre la place de la bactérie pathogène dans la niche écologique, ou de provoquer la sécrétion de composés nocifs pour la bactérie pathogène (Fuller, 1989).

Ainsi, il existe de nombreuses études sur les effets de régimes à base de fourrage ou de céréales sur l'excrétion fécale d'*E. coli* chez les ruminants. Deux revues en ont

fait une analyse critique : les conclusions sont souvent contradictoires (Callaway et al., 2009 ; Jacob et al., 2009). Il en ressort néanmoins que, dans la plupart des cas, les animaux excrètent plus longtemps lorsque leur régime alimentaire est principalement constitué de fourrage plutôt que de céréales. L'explication tiendrait au fait qu'avec le fourrage on obtient un pH fécal plus élevé et une concentration en acides gras volatils plus basse ce qui rendrait l'environnement plus favorable à la survie et à la multiplication d'*E. coli* O157:H7.

Un certain nombre d'études s'est également attaché à étudier l'effet de l'utilisation de DG (« Distiller's grain ») dans les rations. Cette utilisation des DG dans l'alimentation des bovins est assez récente. Il s'agit de sous-produits issus de l'industrie de la distillation de céréales (production d'éthanol par fermentation de céréales, dans le cas de l'industrie de la bière par exemple). L'influence de ces composés sur l'excrétion en *E. coli* O157:H7 n'est pas claire. Les divergences observées entre les études seraient liées à des niveaux d'inclusion des DG dans la ration différents et à la variabilité de la composition en nutriments des DG (Doyle and Erickson, 2012) .

Bien que plusieurs explications biologiques puissent être avancées pour expliquer les évolutions constatées du microbiote intestinal responsable de l'amplification ou de la diminution de la croissance d'*E. coli* O157:H7, les mécanismes impliqués sont encore trop complexes pour qu'il soit possible de prévoir avec précision l'effet de telles modifications de la ration. Il en ressort qu'aucune stratégie de modification de ration ne soit véritablement fiable à l'heure actuelle.

3.3.2 Les probiotiques

De nombreuses études ont été réalisées afin d'étudier l'effet de divers probiotiques sur l'excrétion des EHEC par les bovins. Le traitement consiste à administrer une ou plusieurs souches non pathogènes aux bovins. Ces souches vont coloniser le tractus digestif de l'animal et donc créer des conditions défavorables pour les EHEC. Les bactéries utilisées sont la plupart du temps des souches appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*. *Lactobacillus* est le genre le plus utilisé, notamment la souche *Lactobacillus acidophilus* NP51.

Une méta-analyse récente de 16 de ces études a révélé que le traitement par des probiotiques permettait de diminuer la prévalence du portage d'*E. coli* O157:H7 (Wisener et al., 2015). Une combinaison à base de *Lactobacillus acidophilus* NP51 et de *Propionibacterium freudenreichii* NP24 serait la plus efficace comparée à d'autres traitements, bien que cette différence ne soit pas significative.

Sur la base de la littérature existante, différents additifs ont été évalués par la BIFSCO (Beef Industry Food Safety Council) aux USA, pour leur efficacité à réduire la prévalence des *E. coli* O157:H7 chez le bovin en engraissement. En 2015, cette évaluation a conduit le comité à reconnaître l'effet de la souche *Lactobacillus acidophilus* BT-1386 (Lallemand) et à reconnaître son utilisation en tant que bonne pratique d'élevage (« Production Best Practice »).

(source : <http://lallemandanimalnutrition.com/en/asia/products/micro-cell-la/>)

Différents modes d'action des probiotiques ont été proposés pour expliquer l'inhibition des EHEC à différents niveaux du tractus digestif :

(source : McAllister et al., 2011, <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/cjas10047>)

- la production de composés antibactériens,
- la modulation des espèces microbiennes commensales digestives, permettant d'accroître l'effet de barrière,
- l'exclusion du pathogène par compétition pour des nutriments ou des sites d'adhésion,
- la stimulation du système immunitaire chez l'animal.

Cependant, jusqu'à maintenant, aucun de ces mécanismes n'a réellement été démontré *in vivo* chez les bovins.

Il faut enfin ajouter qu'en plus de permettre le contrôle des EHEC, les probiotiques ont d'autres apports bénéfiques. Ils peuvent permettre un meilleur taux de conversion alimentaire et donc un meilleur taux de croissance (Gaggia et al., 2010). C'est pour cela que la souche *Lactobacillus acidophilus* NP51 est largement utilisée dans les « feedlots » aux Etats-Unis d'Amérique (Callaway et al., 2008).

3.3.3 Les bactériophages

Les bactériophages sont des parasites obligatoires de bactéries hôtes spécifiques. Ils ont un spectre de cibles étroit, ce qui permet de les utiliser dans des stratégies de contrôle précises lorsque l'on travaille dans un milieu contenant plusieurs populations bactériennes distinctes. Ils peuvent être isolés du même environnement que celui de leur bactérie hôte. Des bactériophages qui infectent *E. coli* O157:H7 ont été isolés dans l'environnement de « feedlots », dans les fèces de bovins, les abreuvoirs ou encore les effluents. Plus d'une soixantaine de phages spécifiques d'*E. coli* O157:H7 ont été isolés (Sabouri et al., 2017).

L'efficacité des phages serait optimale lorsque un « cocktail » de phages, i. e. plusieurs phages différents et dirigés vers la même cible, serait utilisé (Niu et al., 2009). Une revue récente recense l'ensemble des études qui ont été réalisées *in vivo* et *in vitro* afin d'évaluer si la phagothérapie pourrait être une mesure de bio-contrôle des *E. coli* O157:H7 (Sabouri et al., 2017). Il en ressort que les études *in vitro* ont permis de diminuer ou d'éliminer le nombre d'*E. coli* O157:H7. Par contre, les études *in vivo* destinées à diminuer, voire éliminer le portage d'*E. coli* O157:H7, sont moins prometteuses.

La problématique principale est que les phages sont sensibles à l'acidité et aux activités protéolytiques des compartiments stomacaux et intestinaux proximaux (Ryan et al., 2011). Des études ont testé la co-administration de phages et d'une solution tampon. Plus récemment, l'encapsulation de phages afin de les protéger des conditions environnementales hostiles a également été testée.

Cependant, certains traitements à base de phages testés chez les bovins ont réussi à diminuer le nombre d'*E. coli* O157:H7, mais ils n'ont pas permis d'éliminer le

pathogène (Sabouri et al., 2017). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées (Doyle and Erickson, 2012). La bactérie, proie du virus, voit sa population diminuer sous l'action du phage jusqu'à un palier. A cet effectif réduit les phages ne trouveraient alors plus assez de proies pour poursuivre leur réplication et leur population elle-même finirait par diminuer. Par conséquent, les réductions observées sont transitoires et les populations d'*E. coli* O157:H7 finissent par retrouver leurs concentrations initiales. L'efficacité de la phagothérapie pourrait également être compromise par l'émergence de sous-populations résistantes.

Dû à son effet transitoire (1 à 3 jours), l'intérêt de la phagothérapie pour diminuer le portage intestinal résiderait dans le traitement des bovins juste avant leur départ pour l'abattoir. La phagothérapie serait d'autant plus pertinente pour traiter les super-excréteurs.

La phagothérapie pourrait donc avoir un intérêt pour diminuer le nombre d'*E. coli* O157:H7 rentrant dans la chaîne alimentaire, mais ne permettrait pas de diminuer la prévalence de ce pathogène à la ferme ni de diminuer sa dissémination dans l'environnement.

A noter qu'il existe aux USA une préparation commerciale de phages sous forme de spray destinée à être pulvérisée sur le cuir des bovins (Omnilytics and Elanco's Finalyse). Les firmes qui commercialisent ces produits ont montré qu'il y avait une réduction du nombre d'échantillons de viande découpée positifs lorsque le spray était pulvérisé sur les bovins entrant en stabulation (Brashears and Chaves, 2017).

3.3.4 La vaccination des troupeaux

L'objectif de la vaccination des troupeaux contre les *E. coli* O157:H7 est de faire en sorte que le tube digestif des bovins soit un environnement que les *E. coli* O157:H7 ne puissent pas coloniser. Ainsi, la durée du portage et la dissémination sont réduites. Une revue récente fait un bilan des études de la vaccination des troupeaux contre les *E. coli* O157:H7 et deux méta-analyses ont fait une étude critique des diverses études menées (Smith, 2014 ; Snedeker et al., 2012 ; Varela et al., 2013). Deux types de vaccins ont montré une efficacité dans la lutte contre le portage d'O157:H7 par les bovins et sont commercialisés : le vaccin ECONICHE™ au Canada et le vaccin Etopix™ SRP aux USA.

Les cibles du vaccin ECONICHE™ sont les protéines du système de sécrétion de type III (T3SS : type-III secretion system). Ces protéines sont impliquées dans la colonisation des muqueuses recto-anale et intestinale. La vaccination basée sur les protéines T3SS résulte en la diminution de l'adhérence, et donc de la colonisation de la muqueuse intestinale par *E. coli* O157:H7. Suite à la vaccination de bovins, il a été observé une baisse de la prévalence, de la durée et aussi de l'ampleur de la sécrétion d'O157:H7 au sein du troupeau inoculé expérimentalement (Potter et al. 2004). Plusieurs études ont montré l'efficacité de ce vaccin (Berry and Wells, 2010). En 2013, la BIFSCO (Beef Industry Food Safety Council) a reconnu son utilité dans le contrôle des *E. coli* O157:H7 au sein des troupeaux.

(source : <https://www.bifsc.org/CMDocs/BIFSCO/Best%20Practices/Production%20Best%20Practices.pdf>).

La cible du vaccin Epitopix™ SRP est la protéine SRP (Siderophore Receptor and Porin). Cette protéine est nécessaire à la bactérie pour qu'elle puisse survivre dans l'hôte. En effet en cas de faible concentration ambiante en fer, la bactérie produit un système de transport du fer à haute affinité pour ce dernier (les protéines SRP) afin de combler ses besoins. Le vaccin a pour effet de provoquer la production d'anticorps se liant à ces protéines SRP sur la surface externe de la bactérie, empêchant cette dernière de capter le fer. Ce désavantage sélectif a pour effet, dans un milieu où la pression en micro-organismes est grande, de limiter considérablement la multiplication d'*E. coli* O157:H7 et de réduire sa population. Il a été montré son efficacité dans la réduction de la prévalence fécale (Fox et al., 2009).

Ces deux vaccins sont basés sur des segments antigéniques précis. Ils ont l'avantage d'être plus sûrs d'utilisation que les vaccins vivants, et de diminuer d'éventuelles compétitions antigéniques. Il est possible en outre de différencier les animaux vaccinés des animaux contaminés. En revanche, ils nécessitent l'emploi de puissants adjuvants et n'offrent que des durées de protection vaccinale inférieures aux vaccins vivants (Doyle and Erickson, 2012). Le résultat de la vaccination dans le contrôle du portage d'*E. coli* O157:H7 est donc modéré.

CONCLUSION

Les bonnes pratiques d'élevage ainsi que les bonnes pratiques d'hygiène sont indispensables pour éviter la contamination et la dissémination des bovins par les EHEC. Des mesures ciblées destinées à limiter le portage des EHEC chez les bovins ont démontré leur efficacité afin de diminuer la prévalence, la durée et/ou le niveau d'excrétion des EHEC O157:H7. Il s'agit notamment de l'administration de probiotiques et de la vaccination des troupeaux. Une synergie des mesures devrait être recherchée afin d'avoir l'effet maximal.

L'éradication des EHEC semble toutefois difficilement réalisable au vu de leurs caractéristiques épidémiologiques et écologiques, ce qui justifie l'importance des mesures prises au stade de la préparation des carcasses et de la transformation. Des revues récentes s'intéressent plus spécifiquement à ces maillons de la chaîne alimentaire (Brashears and Chaves, 2017 ; Moxley and Acuff, 2014).

Tout à fait en aval de la chaîne épidémiologique, la gestion du produit à risque par le particulier à son domicile est d'une importance cruciale dans la lutte contre le danger EHEC. Il est en effet très important que les consignes de cuisson soient respectées, en particulier pour la viande hachée qui doit être cuite à cœur (température à cœur de 65°C). Les légumes, fruits, graines germées et herbes consommés crus doivent être lavés et éventuellement épluchés. Les surfaces et instruments de cuisine au contact de la viande crue doivent être lavés après usage pour ne pas contaminer de produits directement ingérés. Les produits à base de lait cru ne doivent pas être consommés par les enfants de moins de 3 ans.

Enfin, il est recommandé de se laver les mains avant et après la manipulation de ces produits à risque ainsi qu'après tout passage aux toilettes.

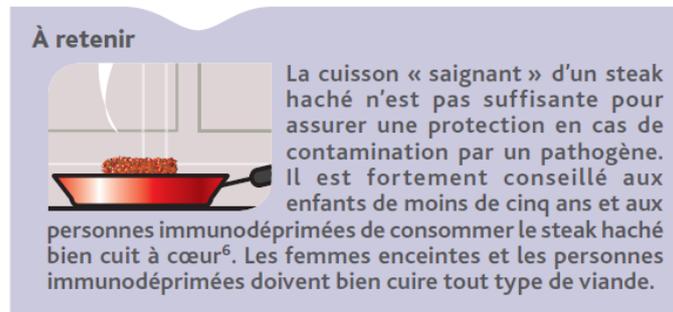


Figure 8 : *Recommandation illustrée de la cuisson du steak haché par le consommateur final*

(Source : ANSES - Fiche Hygiène domestique - <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2012sa0005Fi.pdf>)

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE POUR COMPRENDRE ET MAITRISER LE PORTAGE DIGESTIF DES EHEC CHEZ LES BOVINS

L'étude expérimentale a été réalisée dans l'équipe « Pathogénie et commensalisme des entérobactéries » qui fait partie de l'Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD, INSERM UMR1220, INRA UMR1416, ENVT, Université de Toulouse Paul Sabatier). Cette étude a été menée en partenariat avec l'UMR454 MEDIS, INRA Auvergne-Rhône-Alpes.

L'objectif de l'étude était de développer un modèle expérimental d'infection par les EHEC O157:H7 afin de caractériser le portage et l'excrétion par de jeunes bovins pour une meilleure maîtrise dans ce réservoir animal. A terme, l'objectif est de mieux comprendre le portage par le réservoir bovin de ce type de bactéries et de le caractériser pour augmenter l'efficacité des mesures de lutte qui ont été décrites plus haut. Cette étude a été financée par Interbev et FranceAgrimer. En amont de ce travail, l'équipe avait conduit deux programmes d'études, sous financement Interbev et FranceAgrimer, qui avaient permis d'isoler la souche *E. coli* O157:H7 MC2 qui a été inoculée aux bovins hébergés en animalerie confinée (niveau de protection 3, sur le site de l'ENVT) dans la présente étude.

Dans le cadre de ce travail de thèse seront présentés les résultats relatifs (i) au suivi clinique des bovins, (ii) au suivi de l'excrétion de la souche MC2, (iii) à la colonisation des segments du tube digestif par MC2. Les objectifs de l'étude ont été également d'étudier l'adhésion de MC2 aux parois digestives, d'étudier la physiologie de MC2 dans le tractus digestif, l'expression des gènes impliqués dans la virulence, l'interaction du microbiote digestif avec l'hôte et enfin la réponse de l'hôte.

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODE

1.1 Démarche expérimentale générale

Quinze bovins ont été inclus dans cette étude, répartis en 3 groupes de 5 (groupes A, B et T). Les deux groupes A et T sont arrivés ensemble à l'ENVT au cours de la première phase de l'étude (phase 1). Le groupe B est arrivé un mois plus tard (phase 2).

Les groupes A et B ont été inoculés avec la souche MC2 EHEC O157:H7 résistante à la rifampicine (RifR). Compte tenu de la virulence de cette souche (cf. paragraphe 1.2), ces deux groupes ont été logés dans l'animalerie A3 de l'ENVT. Le groupe témoin (T) a lui été hébergé en animalerie conventionnelle et a reçu une solution de NaCl.

Le projet, référencé sous le numéro 2016032517325815-APAFIS#4704, a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale N°115. Il a reçu un avis favorable. Il n'a pas dû faire l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

La démarche expérimentale générale est présentée dans la **figure 9**.

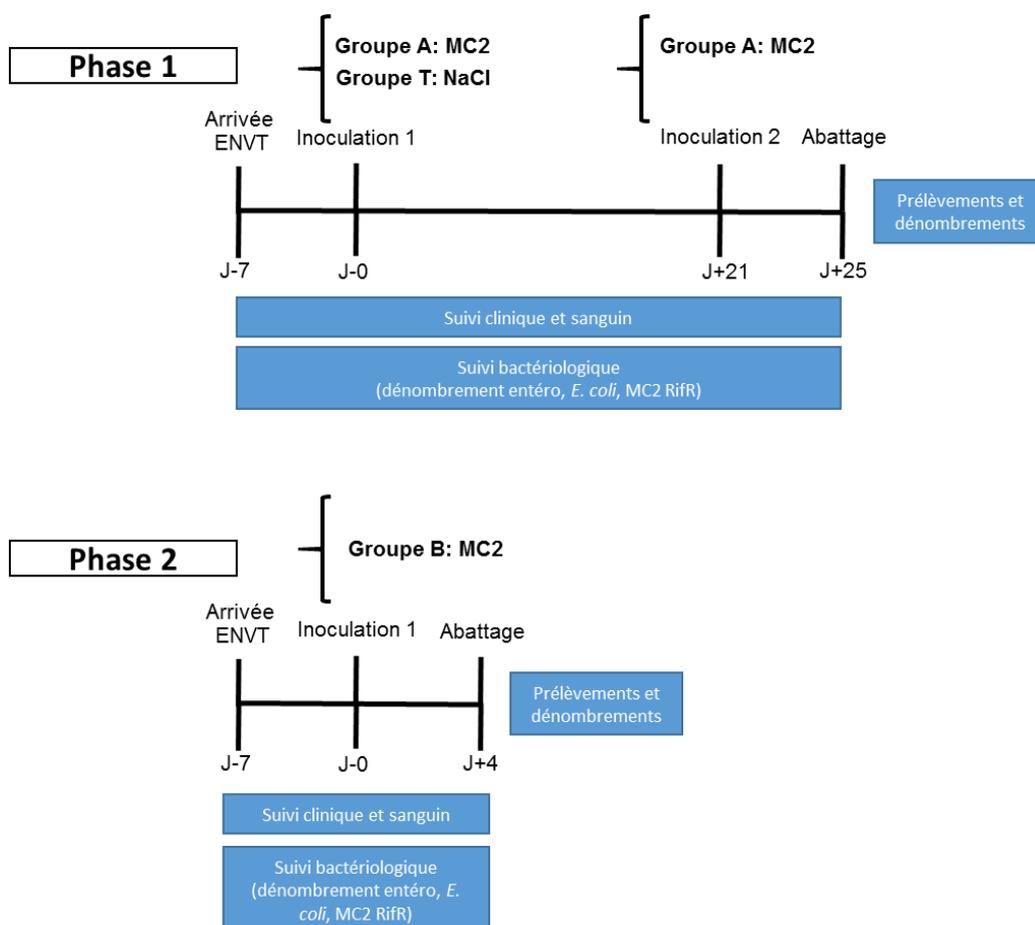


Figure 9 : Démarche expérimentale générale de l'étude

Lors de la phase 1, les groupes A et T étaient présents à l'ENVT en même temps dans deux animaleries différentes. Ces deux groupes ont fait l'objet d'un suivi pendant trois semaines avant euthanasie. A l'autopsie, des prélèvements de tissus et de contenus digestifs ont alors été réalisés.

Au cours de ces trois semaines, les groupes A et T ont reçu un examen clinique quotidien et des fèces ont été prélevées. Le suivi de l'excrétion bactérienne a été mené dès l'obtention des premiers prélèvements de fèces. Une deuxième inoculation a été réalisée pour les bovins du groupe B, et ce 4 jours avant l'euthanasie.

Le groupe B, lors de la phase 2, a reçu une unique inoculation 4 jours avant l'euthanasie. Il a fait également l'objet d'examens cliniques et de prélèvements de fèces.

1.2 Caractéristiques de la souche MC2 et procédure d'administration

1.2.1 Caractéristiques de MC2

Une étude préalable menée par l'ENVT avait mis en évidence une persistance de souches EHEC O157:H7 dans un élevage bovin (désigné par la lettre M). La souche MC2 provient de cet élevage. Cette souche possède les gènes *stx1a* et *stx2c* et présente une activité cytotoxique sur les cellules Véro. Cette activité cytotoxique est comparable à celle de la souche pathogène EDL933 qui a été utilisée comme témoin positif dans les analyses de laboratoire.

Cette souche EHEC O157:H7 est sensible à tous les antibiotiques qui ont été testés : ampicilline, amoxicilline plus acide clavulanique, cefalexine, céfuroxime, céfotaxime, ceftazidime, cefepime, ertapenem, gentamicine, streptomycine, tétracycline, chloramphenicol, triméthoprim, sulfonamide, acide nalidixique et ciprofloxacine. L'Institut national de la recherche agronomique (INRA) a obtenu un mutant spontanément résistant à la rifampicine (Rif^R). Ce mutant, appelé MC2 Rif^R, possède des caractéristiques de cytotoxicité et d'adhésion comparables à la souche MC2 simple. Sa croissance est également similaire. La résistance de cette souche MC2 Rif^R permet de la dénombrer dans des géloses enrichies en rifampicine. C'est donc ce mutant qui a été utilisé dans cette étude.

Une précaution préalable à ce travail a consisté à s'assurer que les jeunes bovins auxquels le mutant a été inoculé ne possédaient pas de souches du sérotype O157 elles-mêmes résistantes à la rifampicine.

1.2.2 Procédure d'administration de MC2

La souche MC2 Rif^R a été inoculée aux bovins des groupes A et B. A partir d'un isolement sur gélose SMAC + rifampicine à 100 µg/mL, 10 colonies ont été mises en suspension dans 100 mL de bouillon Luria-Bertani et incubées à 37°C pendant 12 heures. Une mesure de l'absorbance a été réalisée afin de préparer une solution de 20 mL contenant 10^{10} bactéries MC2. Un dénombrement sur gélose SMAC + rifampicine 100 µg/mL a été réalisé en parallèle afin de vérifier ce titre.

Une sonde œsophagienne en PET de 10 mm x 80 cm (Dahlhausen, Réf 22 30 520) a été utilisée. Une contention de l'animal a été réalisée et un pas-d'âne a permis de guider la sonde. Une seringue de 60 mL a été reliée à la sonde. 50 mL de NaCl ont été administrés, puis 20 mL de la suspension de MC2 Rif^R, et à nouveau 50 mL de NaCl. Les bovins ont ensuite reçu leur repas.

Une solution de 20 mL de NaCl a été inoculée aux bovins du groupe T, avec une procédure identique.

1.3 Caractéristiques des bovins

Quinze bovins mâles de race laitière Prim'Holstein âgés de 3 mois environ et tous sevrés ont été utilisés pour ce travail. Ils provenaient de l'élevage du domaine expérimental de Marcenat (Cantal). Chacun d'entre eux pesait entre 100 et 150 kg et ils ont été répartis dans les trois groupes A, B et T. Tous possédaient une boucle auriculaire où figurait leur numéro d'identification. Les deux derniers chiffres de ce numéro ont constitué leur identification pour la phase expérimentale.

1.3.1 Hébergement

Les bovins des groupes A et B ont été hébergés au sein de l'animalerie A3 de l'ENVT. L'éclairage de la salle recréait un cycle jour-nuit d'une durée de 12h-12h.

Chaque groupe de cinq a été séparé en deux box (un de 2 bovins et un de 3). Pour le groupe A, les bovins 26 et 44 étaient dans le premier box et les bovins 36, 45 et 51 dans le second. Pour le groupe B les bovins 55 et 66 étaient dans le premier box, les 54, 57 et 58 dans le second.

Pour le groupe T l'hébergement a été conduit dans un unique box pouvant accueillir les 5 animaux au sein d'une animalerie classique en étable.

1.3.2 Alimentation

A leur arrivée les bovins ont été livrés avec l'aliment qu'ils consommaient dans leur élevage d'origine. Une transition alimentaire a été réalisée pendant une semaine entre cet aliment et un aliment complet de granulés à 30% de protéines auquel une ration de paille a été ajoutée.

Les granulés étaient donnés deux fois par jour à raison d'un kilogramme par animal. La paille était donnée en même temps en larges quantités.

Chaque bovin avait accès dans son box à un abreuvoir.

1.4 Protocole expérimental

La première phase a débuté le 25/01/16 avec la réception des 10 bovins des groupes A et T. Après un premier examen clinique et une brève période d'acclimatation, les premiers prélèvements ont débuté. Le tableau suivant résume le planning de cette première phase expérimentale en renseignant les dates auxquelles les différents prélèvements ont été réalisés, ainsi que les inoculations. La phase 2 a débuté le 9/03/17 et a suivi le même modèle, comme renseigné sur le **tableau 1**.

Tableau 1 : Planning de la phase expérimentale et type de prélèvements réalisés

	Phase 1	Phase 1	Phase 2
	Groupe A	Groupe T	Groupe B
J-7	Arrivée	Arrivée	Arrivée
J-4	F**, Fctle, S, CR	F**, Fctle, S, CR	F**, Fctle, S, CR
J0 : 1^{ère} Inoculation	F**	F**	F**
J1	F*, F**	F**	F*, F**
J2	F*		F*, F**
J3	F*, F**	F**	F*, F**
J4	F*		F*, F**, S, CD
J5	F*, F**	F**	
J6	F*, S	S	
J7	F*, F**	F**	
J9	F*		
J11	F*, F**	F**	
J13	F*		
J15	F*, F**	F**	
J17	F*		
J20	F*, F**, S	F**, S	
J21 : 2^{ème} inoculation	F*, F**	F**	
J22	F*, F**		
J23	F*, F**		
J24 : Euthanasie	F*, F**, S, CD	F**, S, CD	

- Fèces (**F**): **F*** : dénombrement de MC2 RifR, **F**** : dénombrement d'entérobactéries et *E. coli*, **Fctle** : recherche des marqueurs génétiques associés aux EHEC, recherche de souches de séro groupe O157 résistantes à la rifampicine
- Sang (**S**)
- Contenu ruminal (**CR**)
- Contenus digestifs (**CD**)

Suivi clinique et sanguin des bovins

Chaque jour les bovins recevaient leur ration et subissaient un examen clinique. La température, l'appétit et l'état général étaient évalués. Ces examens étaient complétés une fois par semaine par un bilan sanguin (S) permettant d'effectuer une numération de formule ainsi qu'une mesure de l'urée, de la créatinine, des ASAT, de la CK et des γ GT.

Les prélèvements de fèces étaient réalisés lors de la prise de température quotidienne au niveau de l'ampoule rectale.

Euthanasie et autopsie

Au terme de chaque phase, une euthanasie a été réalisée pour chaque bovin via une injection de T61 dosé à 1 mL pour 10 kg de poids vif en voie intraveineuse (veine jugulaire).

Chaque bovin a été autopsié immédiatement après.

Les oreilles et le cuir des bovins des groupes A et B ont fait l'objet de prélèvements.

Pour tous les bovins (A, B et T), l'abdomen a été ouvert et les nœuds lymphatiques iléo-caecaux ainsi que les nœuds lymphatiques mésentériques caudaux ont été prélevés le plus rapidement possible afin d'éviter toute contamination *post-mortem*. Les différents prélèvements digestifs ont ensuite été réalisés.

Au cours de l'autopsie chaque bovin a fait l'objet d'un examen anatomo-pathologique macroscopique complet.

1.5 Les différents prélèvements réalisés

1.5.1 Les prélèvements réalisés lors du suivi de l'excrétion de MC2 RifR

Les fèces

Chaque jour, lors de la prise de température quotidienne, les fèces étaient prélevées au niveau de l'ampoule rectale puis conservées à 4°C le temps d'effectuer les analyses bactériologiques.

Le sang et le serum

La prise de sang (S) a été effectuée à la veine jugulaire via des tubes secs (pour la sérologie et l'hémogramme), des tubes EDTA (pour les tests virologiques, notamment la BVD) et des tubes à héparine lithium (pour les analyses biochimiques). Les tubes secs ont donc permis après centrifugation d'obtenir du sérum.

1.5.2 Les prélèvements réalisés après l'euthanasie

Chaque bovin ayant reçu la souche MC2 RifR (groupes A et B) a fait l'objet de 16 points de prélèvement. Seulement 12 prélèvements ont été réalisés sur les bovins du groupe témoin (T).

Ces prélèvements ont été les suivants :

Prélèvements externes du cuir et des oreilles (A, B)

Chaque oreille des bovins a été échantillonnée via une chiffonnette imbibée de NaCl, y compris les conduits auriculaires.

Pour les cuirs une autre chiffonnette a été utilisée tout le long de la ligne blanche. Le but de ces deux prélèvements n'était pas de dénombrer les MC2 RifR mais de détecter leur éventuelle présence.

Prélèvements des contenus digestifs (A, B, T)

Cinq contenus digestifs ont été prélevés après la mise en place de ligatures. La localisation anatomique des zones concernées est détaillée dans l'**annexe 1**.

Ces contenus sont le contenu ruminal (CR), le contenu de l'iléon (CI), le contenu du caecum (CCae), le contenu du côlon spiralé (CCS) et le contenu du côlon descendant (CCD). Chaque contenu a permis le dénombrement de la bactérie MC2 RifR mais également des diverses entérobactéries et des *E. coli* présentes (résultats non présentés dans cette thèse).

Prélèvements des tissus digestifs et lymphatiques

La localisation de ces biopsies est détaillée en **annexe 1**.

Six parois digestives ont fait l'objet de biopsies pour les bovins des groupes A, B et T. Les tissus concernés sont le rumen (R), l'iléon (I), la valve iléo-caecale (V), le côlon spiralé (CS), le côlon descendant (CDD) et la jonction ano-rectale (RAJ).

Ces biopsies ont permis le dénombrement de MC2 RifR mais peuvent également servir de support à une analyse histologique (résultats non présentés dans cette thèse).

Enfin, les amygdales et les nœuds lymphatiques des bovins des groupes A et B ont fait l'objet de biopsies afin de détecter la présence de MC2 RifR.

1.6 Dénombrement et détection de la souche MC2 RifR

1.6.1 Traitement des échantillons en vue du dénombrement de MC2 RifR

Fèces, contenus digestifs : 10 g de fèces ou de contenu digestif ont été placés dans un sac Stomacher® avec 90 mL de diluant tryptone. Ils ont été malaxés pendant deux minutes au stomacher. Cette suspension (10^{-1}) a été ensuite diluée en série au $1/10^e$ jusqu'à 10^{-6} dans du diluant tryptone.

Parois digestives : les biopsies des parois avaient été placées dans des tubes Precellys® contenant 1 mL de diluant tryptone au moment de l'autopsie. Le contenu a été broyé deux fois pendant 20s à 6000 rpm (Precellys®). 500 µL de cette suspension ont été prélevés pour réaliser une dilution 10^{-1} dans du diluant tryptone. Des dilutions en série au $1/10^e$ ont ensuite été réalisées dans du diluant tryptone.

Dénombrement de MC2 RifR par NPP

Le dénombrement par NPP de MC2 RifR a été utilisé pour les prélèvements des :

- fèces lorsque MC2 RifR < 100 UFC/g,
- contenus et parois digestifs de manière systématique.

1 mL des dilutions préalablement réalisées dans le diluant tryptone a été ensemencé en duplicate dans 5 mL de TSB modifié + rifampicine à 100 µg/mL. Les tubes ont été incubés o.n. à 37°C.

La présence de MC2 RifR dans les tubes positifs a été confirmée par isolement de colonies sur gélose SMAC + rifampicine.

Le dénombrement a été réalisé grâce à l'utilisation de la table de McGrady. Les résultats ont été exprimés en NPP/g pour les fèces et contenus digestifs, et en NPP/mm² pour les parois.

1.6.2 Traitement des échantillons en vue de la détection de MC2 RifR

Amygdales, nœuds lymphatiques : les biopsies des amygdales et nœuds lymphatiques avaient été placées dans des tubes Precellys® contenant 1 mL de milieu TSB modifié + rifampicine à 100 µg/mL au moment de l'autopsie. Le contenu a été broyé deux fois pendant 20s à 6000 rpm (Precellys®). Les tubes ont ensuite été incubés à 37°C pendant 18 heures.

Oreilles, cuir : les chiffonnettes des oreilles et du cuir avaient été transférées dans un sac Stomacher® au moment de l'autopsie. 90 mL de milieu TSB modifié + rifampicine à 100 µg/mL ont été ajoutés dans le sac. Le sac a ensuite été malaxé pendant deux minutes au stomacher. Les sacs ont été incubés à 37°C pendant 18 heures.

Détection de MC2 RifR : oreilles, cuir, amygdales, nœud lymphatiques

Après enrichissement, les suspensions ont été ensemencées sur gélose SMAC + rifampicine à 100 µg/mL et incubées à 37°C. La présence de MC2 RifR a été confirmée par isolement de colonies sur les géloses.

CHAPITRE 2 : RESULTATS

Nous allons présenter ici les résultats du suivi clinique des bovins ainsi que les résultats des analyses hématologiques et biochimiques effectuées. Nous allons également présenter les dénombrements de MC2 réalisés dans les fèces des bovins (suivi de l'excrétion) et dans les contenus digestifs (colonisation des différents segments).

2.1 Suivi clinique et sanguin des bovins

2.1.1 Suivi de l'âge et du poids des bovins

Sur le **tableau 2** sont présentées les moyennes (et écarts types) de l'âge et du poids des bovins pour chaque groupe à leur arrivée et à la fin de chaque phase au moment de l'abattage.

Tableau 2 : Age et poids moyens des bovins à l'arrivée et à l'autopsie

Groupe	Age moyen arrivée (Nombre de Jours)	ET	Age moyen autopsie (Nombre de Jours)	ET	Poids Moyen arrivée (kg)	ET	Poids moyen abattage (kg)	ET
T	114.0	4.2	145.0	4.2	155.0	13.7	181.2	13.1
A	92.4	10.0	123.4	10.0	112.0	19.6		
B	107.0	9.0	118.0	9.0	134.0	21.1		

2.1.2 Suivi clinique quotidien des bovins

Chaque jour tous les bovins faisaient l'objet d'un examen clinique. Diverses observations ont pu être faites à ces occasions :

-tous les groupes (A, B, T) ont eu des épisodes de toux et de fèces molles. Chaque épisode a été de courte durée (quelques jours) et ne s'est pas répété,

-dès leur introduction, on a constaté sur quelques bovins des groupes A et T de la teigne et parfois aussi de la stomatite papuleuse. Les individus concernés étaient les numéros 18 et 26 (groupe A) et les numéros 15 et 45 (groupe T). Ces maladies, aux symptômes légers et sans conséquences cliniques importantes, étaient déjà présentes dans les élevages d'origine et n'ont fait l'objet d'aucun traitement,

-chaque examen clinique comprenait une prise de température et a permis de détecter plusieurs épisodes d'hyperthermie chez des bovins des groupes A et B (groupe A : 44 et 51 ; groupe B : 54, 55, 66). Ces épisodes sont apparus à J7 pour le groupe A et à J-5 pour le groupe B. Dans tous les cas l'état général de l'individu n'a pas été affecté et il n'a pas montré de perte d'appétit. L'hyperthermie a été traitée avec du METACAM® (meloxicam) à 0,5 mg/kg en intraveineuse ou par voie sous-cutanée. Chaque épisode d'hyperthermie s'est résolu après une période de deux à quatre jours.

2.1.3 Suivi hématologique et biochimique

Les objectifs de ces suivis étaient à la fois de compléter l'examen clinique des bovins et de préciser si l'inoculation de MC2 pouvait être à l'origine d'une modification de ces paramètres.

Suivi hématologique

Le tableau de l'**annexe 2** donne la moyenne des valeurs des paramètres de la numération formule par groupe des bovins et par jour de prélèvement.

Trois bovins du groupe B (bovins 54, 55 et 57) ont présenté à J-4 une augmentation transitoire des neutrophiles. Les bovins 54 et 55 ont également présenté une hyperthermie qui a nécessité un traitement (cf. paragraphe sur le suivi clinique des bovins).

Par ailleurs, à J21 et J27, les bovins du groupe A ont présenté une augmentation du nombre d'éosinophiles par rapport aux bovins du groupe T.

Mis à part cet événement, l'inoculation de MC2 RifR n'a pas eu d'impact sur les paramètres de la numération de formule sanguine.

Suivi biochimique

Le tableau en **annexe 3** présente les moyennes des valeurs des paramètres biochimiques par groupe de bovins et par jour de prélèvement.

Toutes les valeurs étaient dans les intervalles de référence excepté deux valeurs de créatine kinase. En effet, une élévation ponctuelle des créatines kinases a été identifiée pour le bovin 26 (groupe A) à J7 et le bovin 58 (groupe B) à J-4. Pour ces bovins, un épisode traumatique a été à l'origine de l'élévation de créatine kinase. Ces valeurs aberrantes ont été retirées pour le calcul de la moyenne.

La comparaison des moyennes des différents paramètres entre les groupes révèle que l'inoculation de MC2 RifR n'a pas eu d'impact sur les paramètres biochimiques.

2.1.4 Examen anatomopathologique des bovins au moment de l'autopsie

Aucune anomalie macroscopique n'a été constatée au moment de l'examen anatomopathologique réalisé au moment de l'autopsie. Une attention particulière a été apportée à l'examen du cœur, des poumons et des reins.

2.2 Dénombrement des suspensions inoculées de MC2 RifR

Pour la 1^{ère} inoculation du groupe A, les dénombrements de l'inoculum ont révélé un titre de $3,3 \times 10^{10}$ UFC. La 2^{ème} inoculation du groupe A s'est faite en deux fois. Les dénombrements de l'inoculum ont révélé un titre de $2,6 \times 10^{10}$ UFC pour les individus 26 et 44, et de $2,7 \times 10^{10}$ UFC pour les individus 36, 45 et 51.

Pour l'inoculation du groupe B, les dénombrements de l'inoculum pour les individus 55 et 66 ont révélé un titre de $6,5 \times 10^9$ UFC et $3,4 \times 10^{10}$ UFC pour les individus 54, 57 et 58.

2.3 Suivi de l'excrétion fécale de MC2 RifR

2.3.1 Suivi de l'excrétion fécale de MC2 RifR pour le groupe A

La moyenne des dénombrements de MC2 RifR pour le groupe A est présentée en **figure 10**. Les flèches rouges représentent les instants où les bovins de ce groupe ont fait l'objet d'une inoculation.

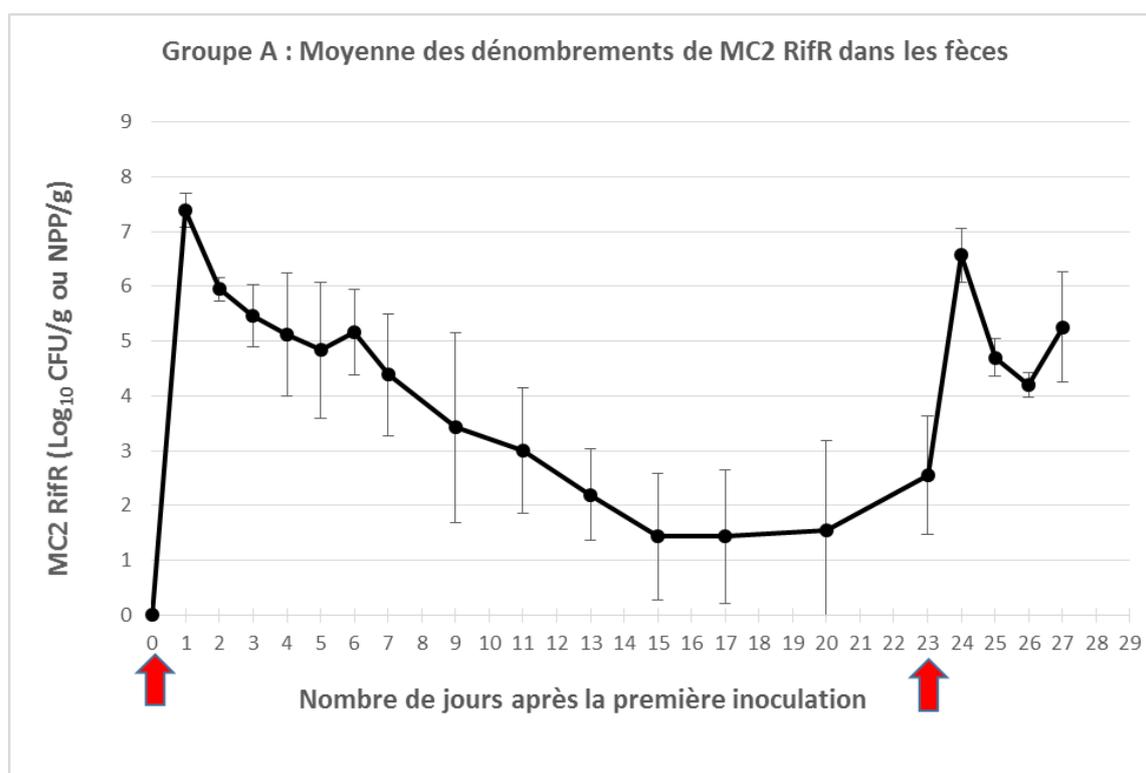


Figure 10 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins du groupe A de J0 à J23

Les résultats sont exprimés en Log₁₀ UFC/g de J0 à J9 et de J24 à J27 et en Log₁₀ NPP/g de J11 à J23.

Suite à la première inoculation, à J1, MC2 RifR a atteint en moyenne une valeur de $3,03 \times 10^7$ UFC/g de fèces. Dès J2, le niveau d'excrétion a diminué à $9,76 \times 10^5$ UFC/g de fèces. Le niveau moyen d'excrétion de MC2 RifR est resté au-dessus de 10^5 UFC/g de fèces jusqu'à J7. A partir de J11, les niveaux moyens d'excrétion de MC2 RifR se sont situés entre 10^2 et 10^4 NPP/g. La souche a été détectée chez tous les bovins jusqu'à J23, date de la deuxième inoculation.

Suite à la deuxième inoculation, le niveau d'excrétion a atteint en moyenne une valeur de $5,84 \times 10^6$ UFC/g de fèces. Les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} jours suivant cette deuxième inoculation, les valeurs moyennes d'excrétion ont oscillé entre 10^4 et 10^6 UFC/g de fèces. Après la deuxième inoculation, les moyennes des dénombrements sont inférieures d'un log à J2 et J3 par rapport à la première inoculation. Les valeurs sont identiques à J4.

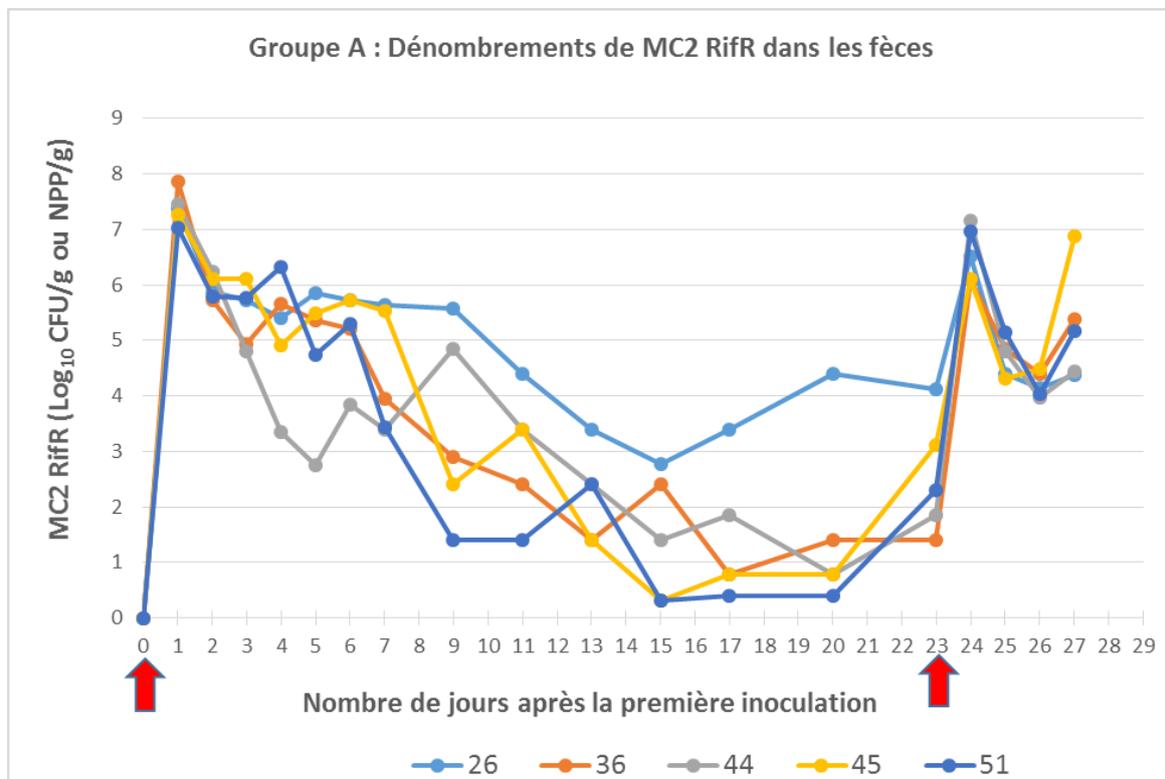


Figure 11 : Dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins 26, 36, 44, 45 et 51 (groupe A) de J0 à J23

Les résultats sont exprimés en Log₁₀ UFC/g de J0 à J9 et de J24 à J27 et en Log₁₀ NPP/g de J11 à J23.

Les écarts types représentés sur la **figure 10** indiquent une importante variabilité entre les individus, notamment à partir de 4 jours après inoculation. Les profils individuels d'excrétion de MC2 RifR sont présentés dans la **figure 11**.

Dans les 6 premiers jours qui ont suivi l'inoculation, peu de variabilité a été observée entre les bovins 26, 36, 45 et 51. Par contre, le bovin 44 a montré une baisse rapide de l'excrétion de MC2 RifR. A partir de J7, la variabilité d'excrétion entre les bovins s'est accentuée. Le bovin 26 a présenté des valeurs d'excrétion de MC2 RifR supérieures à celles des autres bovins.

2.3.2 Suivi de l'excrétion fécale de MC2 RifR pour le groupe B

La **figure 12** permet de comparer les moyennes de dénombrement de MC2 RifR pendant les 4 jours suivant les différentes inoculations pour les groupes A et B. Les bovins du groupe B ont fait l'objet d'une seule inoculation, représentée par une flèche rouge.

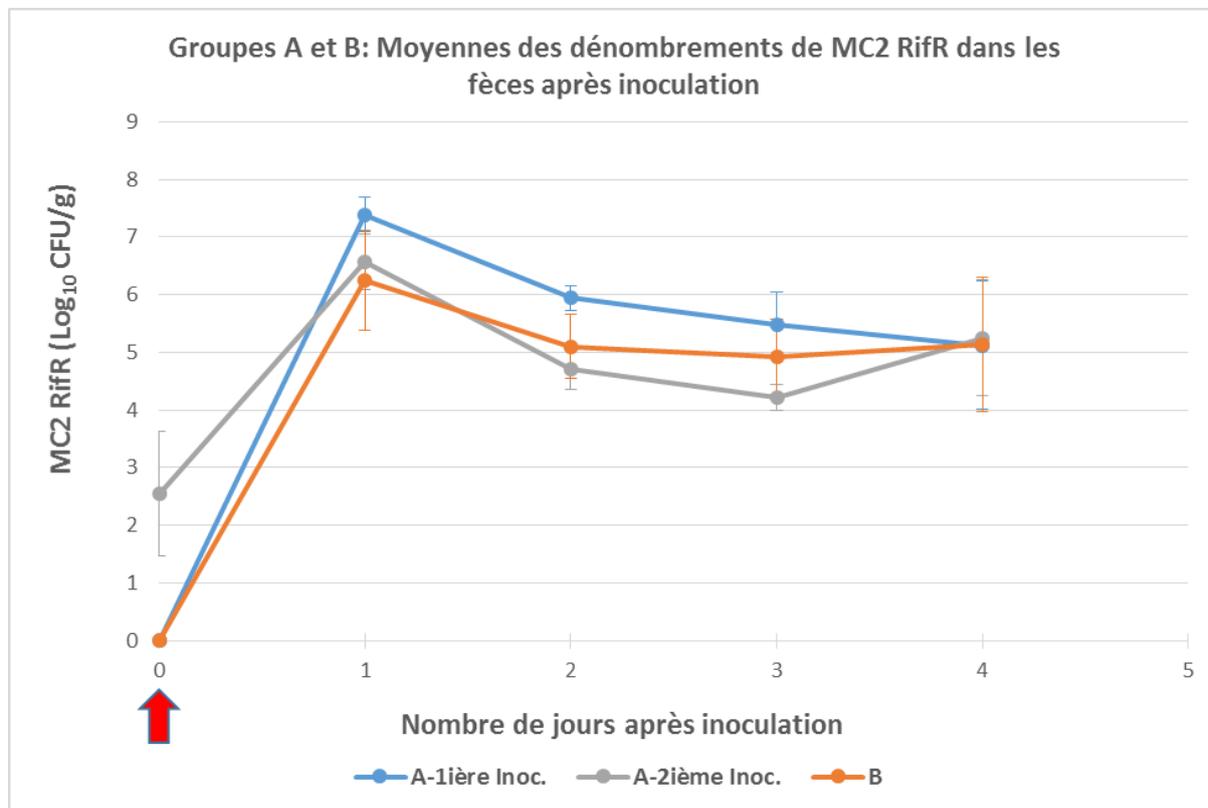


Figure 12 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins du groupe A après la 1^{ère} (J0 à J4) et la 2^{ème} inoculation (J23 à J27) et du groupe B de J0 à J4

Les résultats sont exprimés en Log₁₀ UFC/g de fèces.

Les dénombrements moyens de MC2 RifR du groupe B sont équivalents à ceux du groupe A lors de la première inoculation pour la même période de temps. Ceci indique que le modèle développé est reproductible.

Les profils individuels d'excrétion de MC2 RifR sont présentés dans la **figure 13**. Le bovin 66 a présenté le niveau d'excrétion le plus faible.

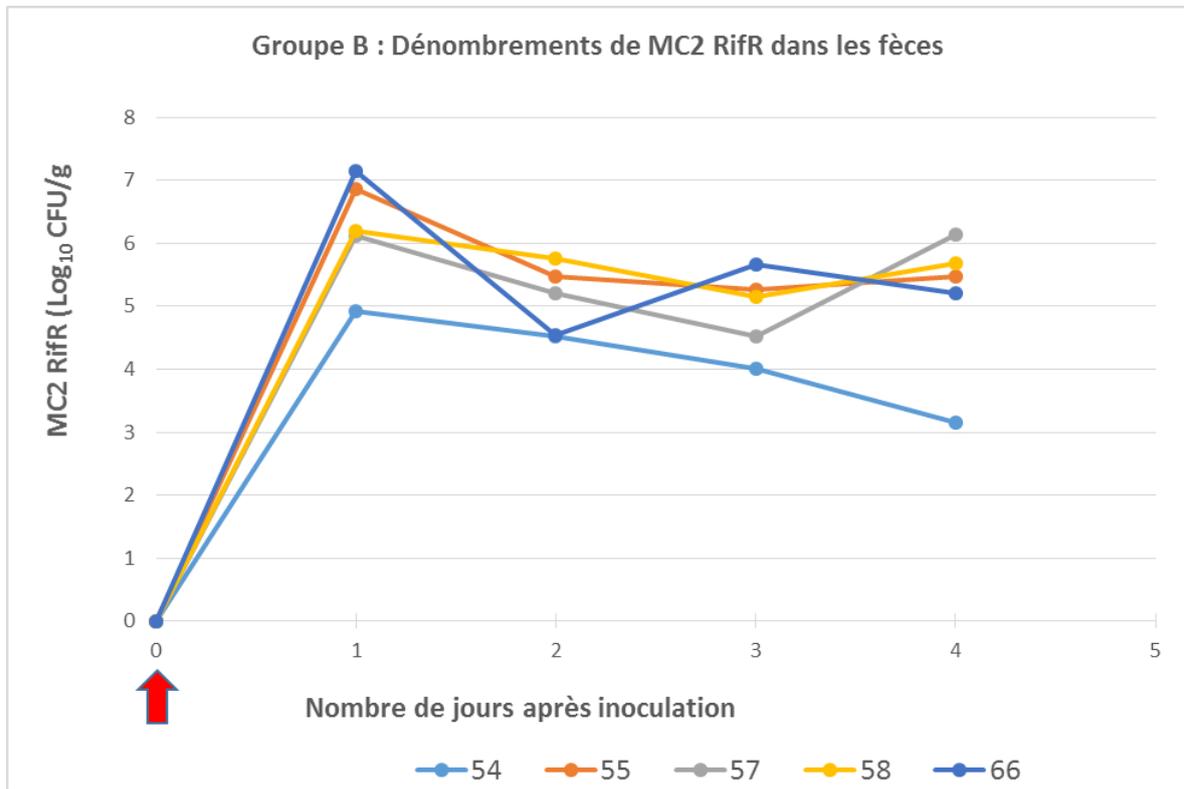


Figure 13 : Dénombrements de MC2 RifR dans les fèces des bovins 54, 55, 57, 58 et 66 (groupe B) de J0 à J4

Les résultats sont exprimés en Log_{10} UFC/g de fèces.

2.4 Dénombrement et détection des MC2 RifR dans les amygdales et nœuds lymphatiques digestifs

2.4.1 Détection de MC2 RifR dans les amygdales

Le **tableau 3** donne les résultats de détection de MC2 RifR au niveau des amygdales des bovins des groupes A et B.

Tableau 3 : Détection de MC2 RifR dans les amygdales des bovins des groupes A et B

Groupe A				
26	36	44	45	51
+	ND	+	+	ND
Groupe B				
54	55	57	58	66
ND	+	+	+	ND

+ : détection de MC2 RifR ; ND : pas de détection de MC2 RifR

On constate que 6 bovins sur 10 étaient positifs pour la présence de MC2 RifR dans les amygdales.

2.4.2 Détection de MC2 RifR dans les nœuds lymphatiques digestifs

Les nœuds lymphatiques iléo-caecal et mésentérique caudal ont été systématiquement testés pour la présence de MC2 RifR. Aucune biopsie ne s'est révélée positive pour la présence de souche MC2 RifR.

2.5 Dénombrement de MC2 RifR dans les prélèvements de contenus et parois digestifs

2.5.1 Groupe A

Contenus digestifs

La **figure 14** présente les moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs pour le groupe A, et la **figure 15** présente les valeurs pour chaque bovin de ce groupe.

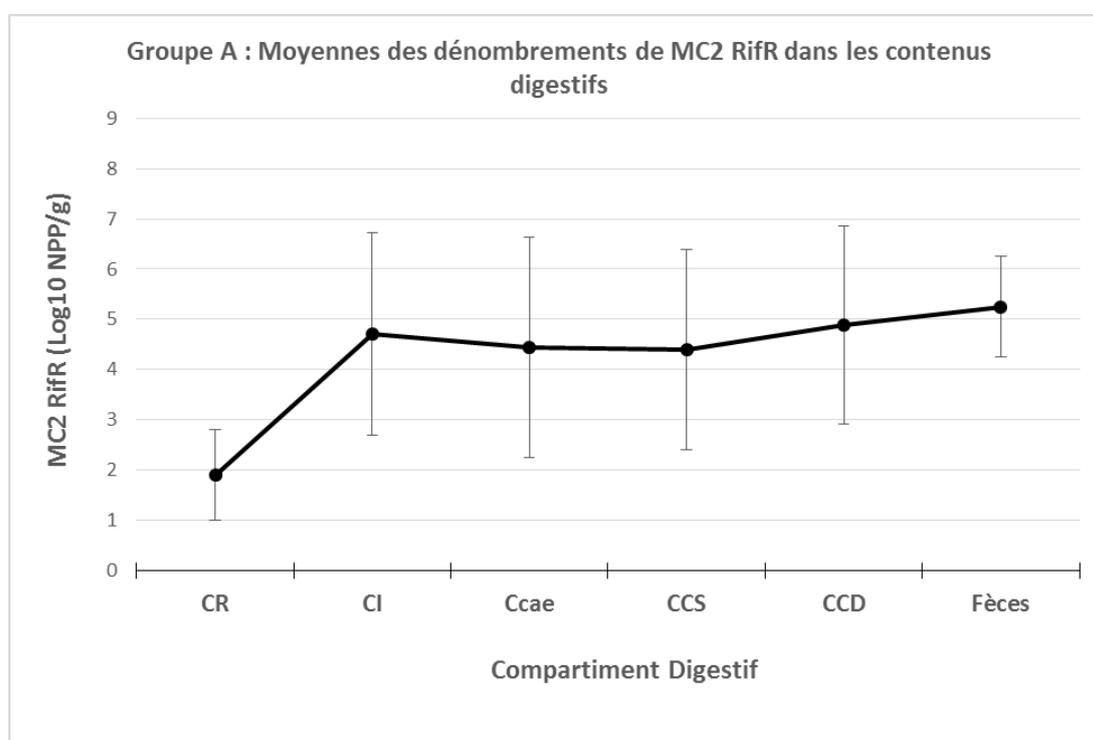


Figure 14 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins du groupe A

CR : contenu ruminal, CI : contenu de l'iléon, Ccae : contenu caecal, CCS : contenu du côlon spiral, CCD : contenu du côlon descendant. Les résultats sont exprimés en Log₁₀ NPP/g de contenus digestifs.

Dans le rumen, MC2 RifR avait la concentration la plus faible avec une valeur moyenne de $2,44 \times 10^2$ UFC/g de contenu. Une faible variabilité a été observée entre les individus pour cette localisation anatomique.

Au niveau des contenus de l'iléon, du caecum, du côlon spiral, du côlon distal et des fèces, les valeurs moyennes étaient de l'ordre de 10^5 UFC/g de contenus.

L'importance des écarts types indique cette fois une grande variabilité entre les bovins.

La **figure 15** montre en effet que pour un même bovin, à l'exception du rumen, les concentrations en MC2 RifR étaient homogènes à chaque étage du tractus digestif mais que le niveau de ces concentrations variait d'un bovin à l'autre.

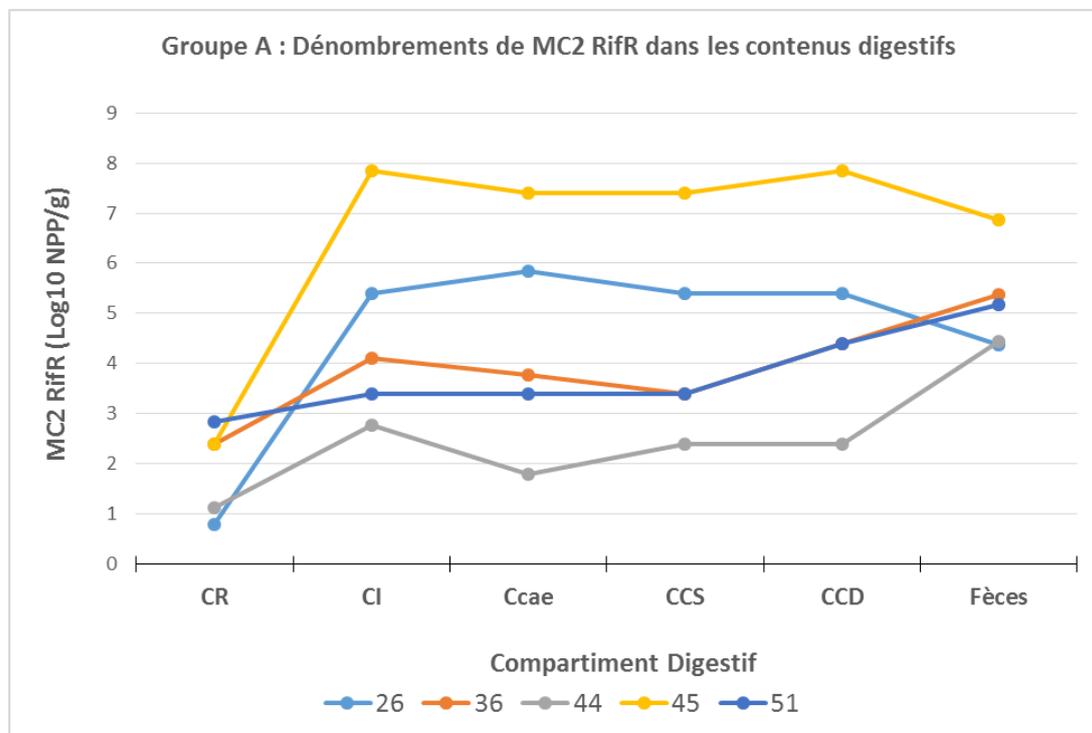


Figure 15 : Dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins 26, 36, 44, 45 et 51 (groupe A)

CR : contenu ruminal, CI : contenu de l'iléon, Ccae : contenu caecal, CCS : contenu du côlon spiral, CCD : contenu du côlon descendant. Les résultats sont exprimés en Log_{10} NPP/g de contenus digestifs.

Le bovin 44 avait les concentrations de MC2 RifR les plus faibles aux environs de 10^2 NPP/g dans l'iléon, le caecum, le côlon spiral et le côlon distal. Le bovin 45 présentait les concentrations les plus élevées de MC2 RifR avec des concentrations supérieures à 10^7 NPP/g dans les mêmes compartiments digestifs.

Parois digestives

La **figure 16** présente pour chaque bovin les résultats des dénombrements de MC2 RifR au niveau des parois digestives pour le groupe A. On a ici dénombré les colonies MC2 RifR qui étaient adhérentes aux parois digestives.

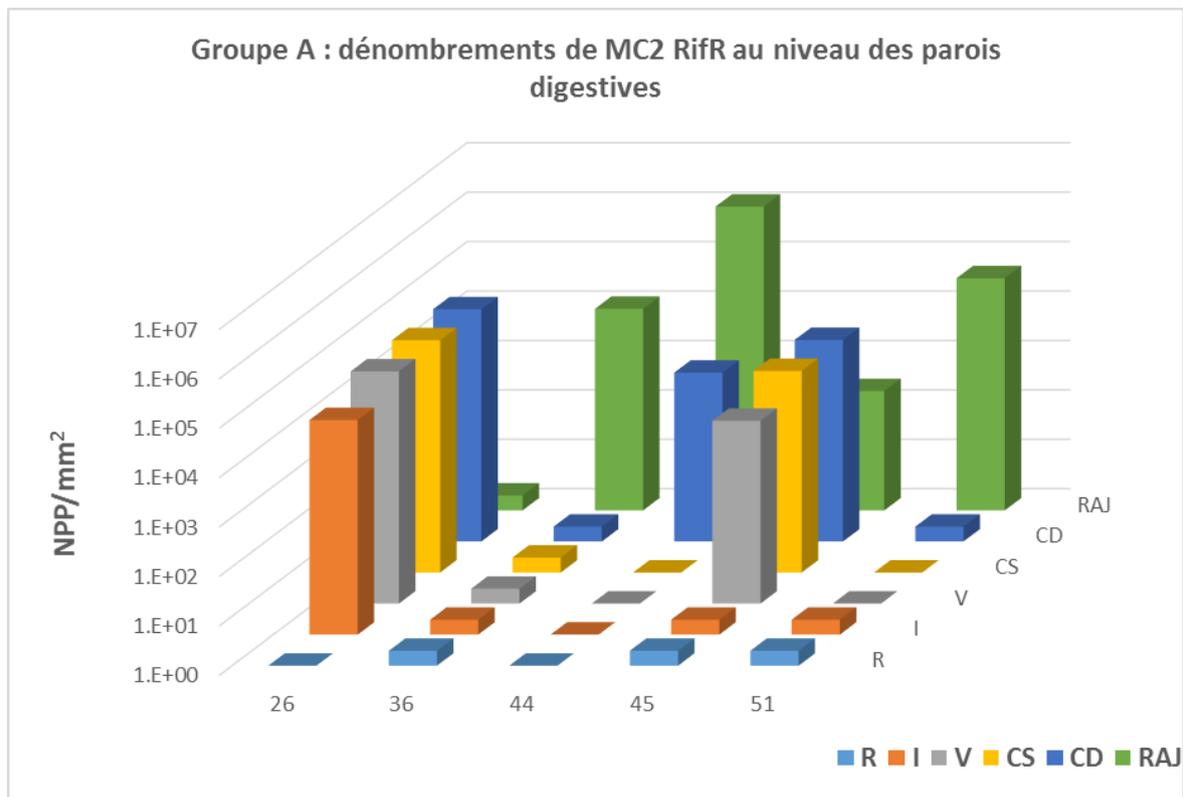


Figure 16 : Dénombrements de MC2 RifR au niveau des parois digestives des bovins 26, 36, 44, 45 et 51 (Groupe A)

R : rumen, I : iléon, V : valve iléo-caecale, CS : côlon spiralé, CD : côlon descendant, RAJ : jonction recto-anale. Les résultats sont exprimés en NPP/mm² de parois digestives.

Pour la représentation graphique, il a été attribué une valeur de 2 NPP/mm² pour les échantillons positifs et pour ceux ayant une concentration inférieure à 2 NPP/mm². Pour les échantillons négatifs, une valeur de 1 NPP/mm² a été attribuée.

Pour 3 bovins, MC2 RifR a été détectée au niveau de la paroi du rumen à des concentrations très basses.

Les concentrations les plus élevées ont été observées au niveau de la jonction recto-anale avec des niveaux entre 10² et 10⁶ NPP/mm² de paroi pour les bovins 36, 44, 45 et 51. MC2 RifR a été détectée dans la jonction recto-anale du bovin 26, mais à des niveaux non quantifiables.

Pour les autres échantillons de parois (valve iléo-caecale, côlon spiralé et côlon descendant), les concentrations en MC2 RifR sont variables d'un bovin à l'autre. Les bovins 26 et 45 ont montré des niveaux de 10³ à 10⁴ NPP/mm² pour ces parois. Ce sont également ces bovins qui présentaient les concentrations de MC2 RifR les plus élevées dans les contenus digestifs.

2.5.2 Groupe B

Contenus digestifs

La **figure 17** présente les moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs pour le groupe B, et la **figure 18** présente les valeurs individuelles pour ce groupe.

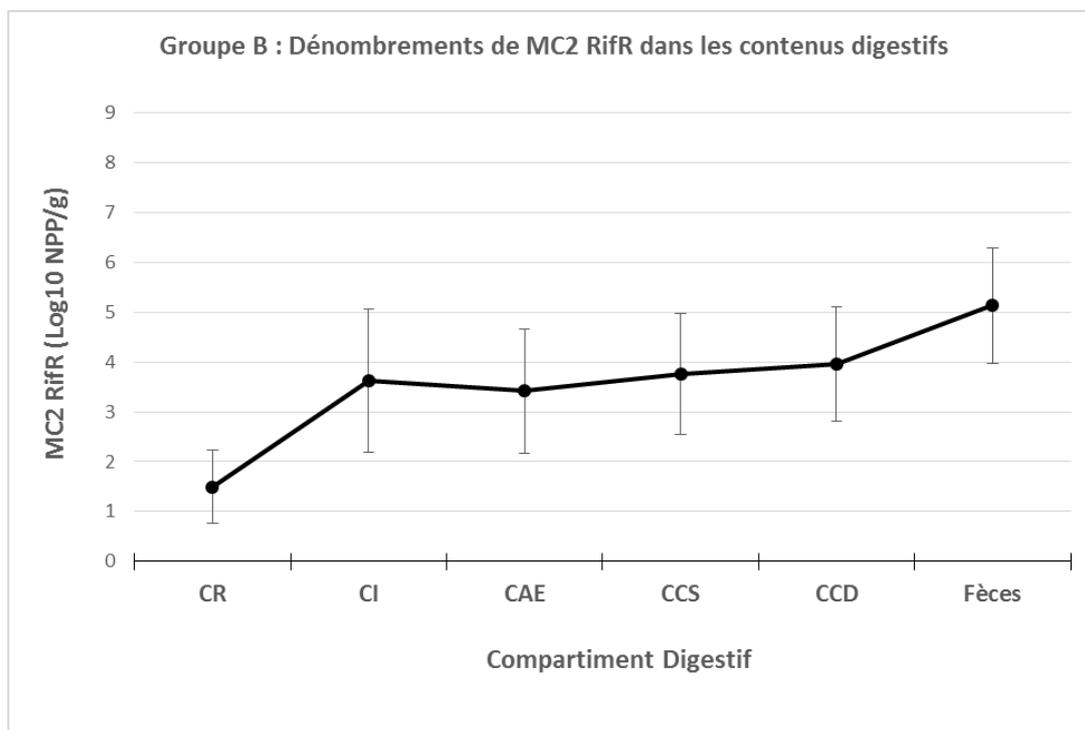


Figure 17 : Moyennes des dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins du groupe B

CR : contenu ruminal, CI : contenu de l'iléon, Ccae : contenu caecal, CCS : contenu du côlon spiral, CCD : contenu du côlon descendant. Les résultats sont exprimés en Log₁₀ NPP/g de contenus digestifs.

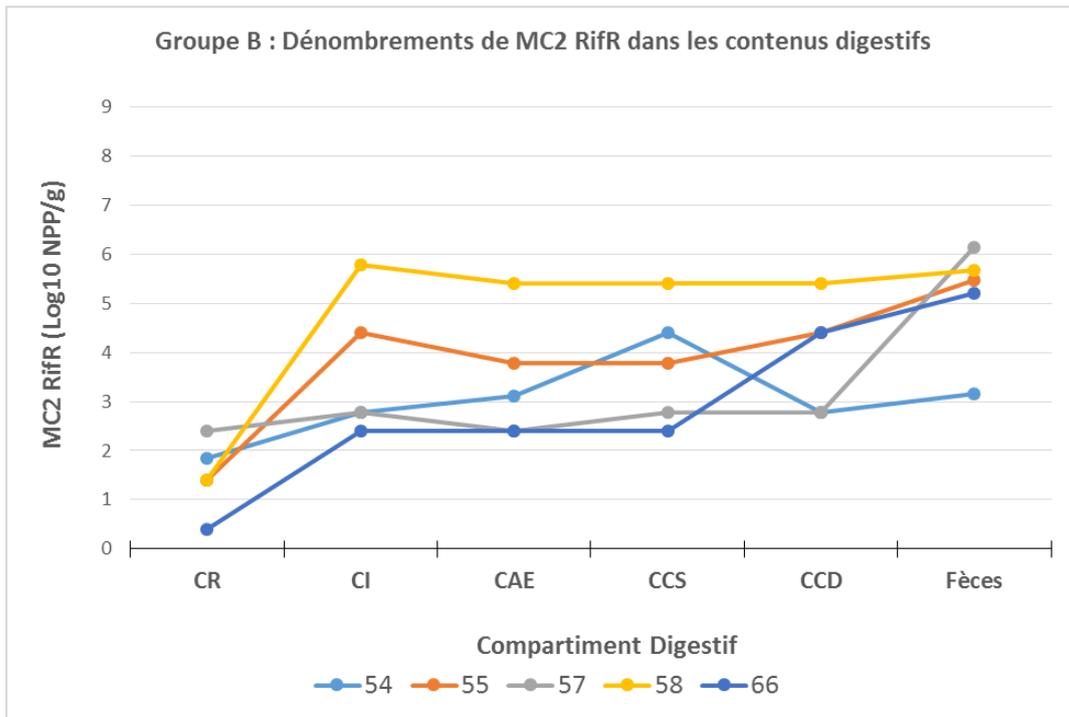


Figure 18 : Dénombrements de MC2 RifR dans les contenus digestifs des bovins 54, 55, 57, 58 et 66 (groupe B)

CR : contenu ruminal, CI : contenu de l'iléon, Ccae : contenu caecal, CCS : contenu du côlon spiral, CCD : contenu du côlon descendant. Les résultats sont exprimés en Log_{10} NPP/g de contenus digestifs.

Les résultats du groupe B sont comparables à ceux du groupe A, mais les valeurs moyennes des dénombrements de MC2 RifR sont inférieures. En effet, à la différence du groupe A où les dénombrements des contenus digestifs du bovin 44 atteignaient des valeurs de l'ordre de 10^7 NPP/g, dans le groupe B les concentrations maximales étaient de l'ordre de 10^5 NPP/g (bovin 58).

Parois digestives

La **figure 19** présente par bovin les résultats des dénombrements de MC2 RifR au niveau des parois digestives pour le groupe B. Ont été dénombrées ici aussi les colonies MC2 RifR qui étaient adhérentes aux parois digestives.

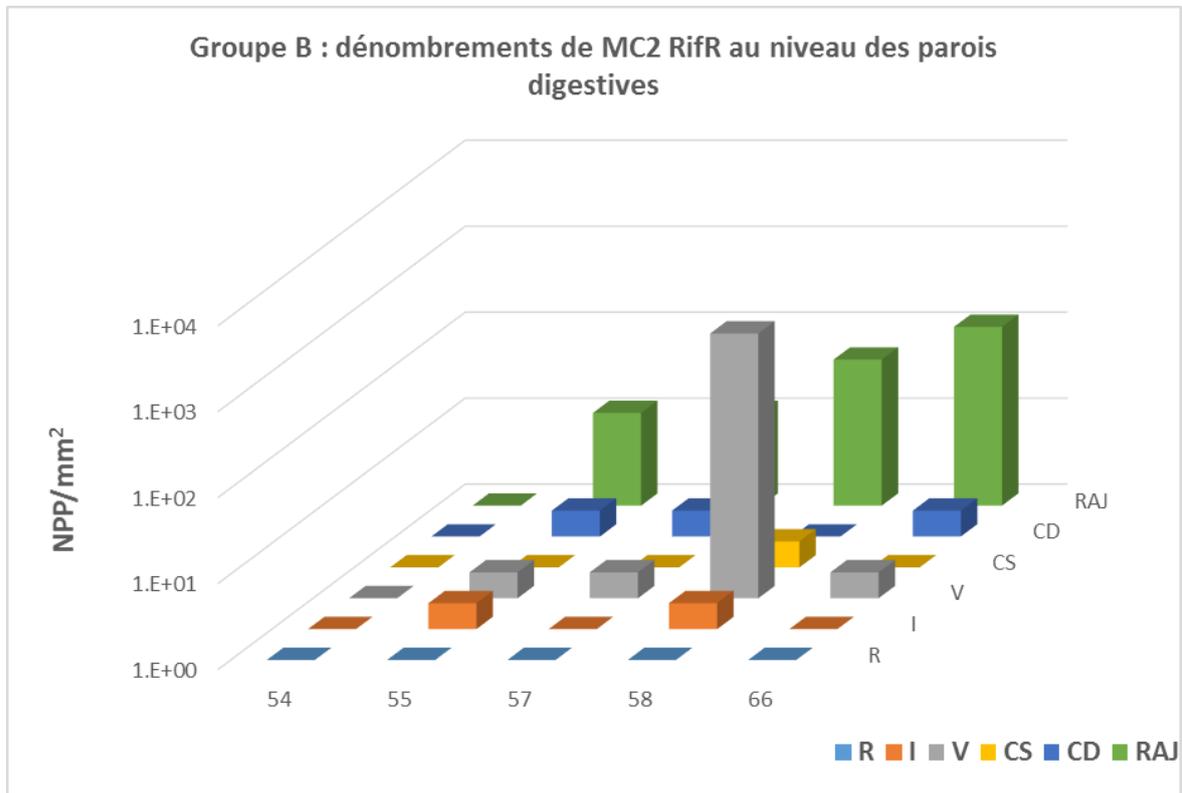


Figure 19 : Dénombrements de MC2 RifR au niveau des parois digestives des bovins 54, 55, 57, 58 et 66 (Groupe B)

R : rumen, I : iléon, V : valve iléo-caecale, CS : côlon spiralé, CD : côlon descendant, RAJ : jonction recto-anale. Les résultats sont exprimés en NPP/mm² de parois digestives.

Pour une représentation graphique, il a été attribué une valeur de 2 NPP/mm² pour les échantillons positifs et pour ceux ayant une concentration inférieure à 2 NPP/mm². Pour les échantillons négatifs, une valeur de 1 NPP/mm² a été attribuée.

Les concentrations de MC2 RifR adhérentes aux parois digestives observées pour le groupe B étaient une fois de plus moins élevées que pour le groupe A.

La jonction recto-anale reste le site le plus colonisé par MC2 RifR à l'exception du bovin 54 pour lequel la souche n'a pas pu être détectée à cet endroit. Les concentrations étaient inférieures de 2 log par rapport aux concentrations observées pour le groupe A.

Pour les autres parois digestives, MC2 RifR n'a pas été détectée ou détectée à des niveaux non quantifiables, à l'exception de la valvule iléo-caecale du bovin 58.

2.6 Détection de MC2 RifR sur le cuir et dans les oreilles

MC2 RifR a été détectée au niveau du cuir et des oreilles pour l'ensemble des 10 bovins testés.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

3.1 Le suivi clinique des bovins

Les évolutions de poids au cours de la période expérimentale furent normales. En revanche, les épisodes d'hyperthermie observés peuvent être interprétés de plusieurs manières. Dans le cas du numéro 55, nous avons constaté la présence d'un abcès au niveau de la glande parotidienne droite à son arrivée. La présence de ce foyer infectieux pourrait être à l'origine de l'hyperthermie observée pour son cas. Les autres bovins ayant été atteints par de la toux de manière transitoire, une étiologie respiratoire pourrait expliquer la variation de température observée.

La question du lien entre inoculation de MC2 RifR et hyperthermie s'est posée mais le fait que les bovins du groupe B aient présenté des températures élevées dès leur arrivée (et donc avant toute inoculation) semble écarter toute relation de cause à effet. Il est en outre courant d'observer chez les jeunes bovins des maladies respiratoires dont les facteurs étiologiques sont nombreux. Ainsi on peut penser que les bovins du groupe B ont pu développer ces symptômes à la suite d'un stress dû à leur transport jusqu'à l'ENVV.

Par ailleurs, aucune anomalie macroscopique n'a été constatée au moment de l'examen anatomopathologique réalisé au moment de l'autopsie.

En conclusion, ce suivi clinique ne permet de constater aucune modification imputable à la colonisation des bovins par les souches EHEC, comme la bibliographie le confirme (Dean-Nystrom et al., 1997).

3.2 Le suivi de l'excrétion fécale

Les niveaux d'excrétion et profil de persistance décrits ici ont également été observés dans la littérature suite à une inoculation expérimentale à la dose de 10^{10} UFC d'EHEC O157:H7. Ils ont été notamment observés dans plusieurs études suite à l'inoculation de la souche EHEC O157:H7 86-24, qui avait été isolée au cours d'une épidémie aux USA (Dean-Nystrom et al., 2008 ; Hamm et al., 2016). Un tel profil de colonisation a aussi été relevé pour deux souches isolées de bovins (9000 et 10671) (Corbishley et al., 2014). Par contre, l'inoculation d'une autre souche isolée de bovin (438/99) a conduit à des niveaux d'excrétion moins élevés, mais à une durée de persistance équivalente (Martorelli et al., 2015).

Après la deuxième inoculation, les moyennes des dénombrements sont inférieures d'un log à J2 et J3 par rapport à la première inoculation. Les valeurs sont identiques à J4. Cette tendance à la diminution du niveau d'excrétion lors d'une deuxième inoculation a également été constatée lors d'inoculations répétées d'*E. coli* O157:H7 (Naylor et al., 2007), et de STEC O157:H7 (Hoffman et al., 2006).

Les écarts types représentés indiquent une importante variabilité entre les individus, notamment à partir de 4 jours après inoculation. Cette variabilité dans l'excrétion de la souche inoculée a été également rapportée dans la littérature.

On constate que les dénombrements moyens de MC2 RifR du groupe B sont équivalents à ceux du groupe A lors de la première inoculation pour la même période de temps. Ceci indique que le modèle développé est reproductible. Cette caractéristique est très importante pour ce travail qui consiste entre autre, pour rappel, à établir un cadre propice aux expériences de modification du portage.

3.3 La présence de MC2 RifR dans les amygdales et les nœuds lymphatiques digestifs

Amygdales

La présence de MC2 RifR à cette localisation anatomique pourrait s'expliquer par le phénomène de régurgitation du contenu ruminal caractéristique des ruminants. En effet, comme nous l'avons vu, le contenu ruminal contient lui-même MC2 RifR. Il est également possible que l'on retrouve des MC2 RifR à cet endroit en raison de l'application de l'inoculum et plus précisément de la rétractation de la sonde oesophagienne après le gavage.

D'autres auteurs ont également rapporté la présence d'EHEC O157:H7 dans les amygdales de bovins colonisés soit de manière expérimentale soit de manière naturelle (Hamm et al., 2016 ; Keen et al., 2010).

Nœuds lymphatiques digestifs

L'absence de MC2 RifR à cet endroit rejoint les observations faites par d'autres chercheurs : la colonisation des EHEC O157:H7 est cloisonnée à la sphère digestive et il n'y a pas de translocation par voie lymphatique (Hamm et al., 2016).

3.4 Le dénombrement de MC2 RiR dans les contenus et parois digestifs

La concentration relativement faible observée dans le rumen pour MC2 RifR ($2,44 \times 10^2$ UFC/g de contenu) peut s'expliquer par l'environnement biologique présent dans ce compartiment qui n'est pas favorable aux EHEC. Les EHEC qui franchissent cette barrière rencontrent des conditions plus favorables dans l'intestin grêle (Chaucheyras-Durand et al., 2006).

Peu d'études ont quantifié les concentrations en EHEC O157:H7 à tous les étages du tractus digestif. Dans des conditions naturelles, des EHEC O157:H7 ont été détectées à tous les étages du tube digestif (Keen et al., 2010). Ces données indiquaient déjà que la colonisation par des EHEC O157:H7 était possible à tous les étages du tube digestif des bovins.

Nous montrons ici que l'iléon, le caecum, le colon spiral et le colon descendant peuvent contenir une souche EHEC O157:H7 à des concentrations similaires à ce qui a été mesuré dans les fèces.

Les concentrations les plus élevées ont été observées au niveau de la jonction recto-anale. Les résultats confirment que la jonction recto-anale est le site le plus colonisé par MC2 RifR (Dean-Nystrom et al., 2008 ; Naylor et al., 2003). On constate également que les autres parois digestives (iléon, valvule iléo-caecale, côlon) peuvent être colonisées par des EHEC O157:H7 à des concentrations élevées. Ce résultat a d'ailleurs récemment été observé lors de l'inoculation de l'isolat clinique 86-24 à des jeunes bovins (Hamm et al., 2016)

3.5 Présence de MC2 RifR sur le cuir et dans les oreilles

Une contamination élevée des cuirs par des *E. coli* O157:H7 a également été observée lorsque les bovins avaient des concentrations en O157:H7 supérieures à 10⁴ UFC/g de fèces, et ce dans des conditions naturelles d'élevage (Arthur et al., 2009). D'autres auteurs ont rapporté une contamination plus faible dans un contexte expérimental (Kulow et al., 2012).

Cette contamination systématique des cuirs et des oreilles indique que l'environnement des bovins était fortement contaminé par MC2 RifR. Après excrétion fécale, la souche MC2 RifR pourrait donc survivre sur une longue période dans l'environnement et être à l'origine de la contamination des cuirs de bovins, ce qui rejoint les données fournies par la littérature. En effet, une étude menée dans un troupeau de bœufs infectés expérimentalement a permis d'isoler dans l'environnement des *E. coli* O157:H7 jusqu'à 14 semaines après l'inoculation (Davis et al., 2005). Cette étude a par ailleurs mis en évidence que les souches *E. coli* O157:H7 inoculées avaient pu être isolées de l'aire de couchage et au niveau de l'eau des abreuvoirs alors qu'elles n'étaient pas isolées de fèces de bovins. Les EHEC peuvent donc survivre dans de nombreuses « niches environnementales » qui pourront être à l'origine de la contamination des bovins.

CONCLUSION

Nous avons inoculé la souche EHEC O157:H7 MC2 RifR à deux groupes de bovins sevrés âgés de 3 mois (A et B). Cette souche avait été isolée dans un élevage de bovin où une persistance du portage d'EHEC O157:H7 avait été mise en évidence.

Les bovins du groupe A ont fait l'objet de deux inoculations, alors que les bovins du groupe B n'ont fait l'objet que d'une seule inoculation. La dose inoculée était de 10^{10} UFC. Les profils d'excrétion post-inoculation étaient similaires, indiquant la reproductibilité du modèle. Le groupe A a été suivi 23 jours post inoculation. Pendant les 7 premiers jours, l'excrétion fécale de MC2 RifR était relativement élevée, les bovins pouvant être qualifiés de super-excréteurs au cours de cette période ; puis l'excrétion fécale a progressivement diminué. A J23, la souche était encore détectée chez tous les bovins. Une grande variabilité entre bovins a été rapportée.

Les bovins du groupe A ont été euthanasiés 4 jours après la deuxième inoculation et ceux du groupes B 4 jours après l'unique inoculation. Tous les nœuds lymphatiques digestifs étaient négatifs pour MC2 RifR, indiquant un cloisonnement de MC2 RifR au niveau de la sphère digestive. Six bovins sur 10 présentaient une positivité pour MC2 RifR au niveau des amygdales. A l'exception du contenu ruminal, des concentrations élevées de MC2 RifR ont été détectées dans les contenus de l'iléon, du caecum, du côlon spiral et du côlon descendant. Une grande variabilité entre bovins a également été rapportée.

En ce qui concerne les parois digestives, la jonction recto-anale est le site de colonisation de prédilection de MC2 RifR, mais d'autres segments du tube digestif pouvaient également être colonisés à des niveaux élevés par MC2 RifR, notamment l'iléon, la valvule iléo-caecal et le côlon.

Au moment de l'autopsie, MC2 RifR a été détectée de manière systématique au niveau du cuir et des oreilles des bovins inoculés. Ceci pourrait être expliqué par une bonne survie de la souche dans l'environnement après excrétion fécale.

En conclusion, cette étude représente le premier modèle d'inoculation expérimentale de bovin par une souche EHEC décrit en France à ce jour. Ce modèle pourra être mis à profit dans le futur pour tester *in vivo* l'effet de nouveaux additifs alimentaires (probiotiques, souches compétitrices...) en vue de réduire l'excrétion fécale d'EHEC par les jeunes bovins. Il constitue ainsi une étape primordiale pour le développement de nouvelles stratégies pré-abattage de réduction du risque de contamination des produits carnés par les EHEC.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **Delphine BIBBAL**, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BELLEC Ezhvin** intitulée «*Développement d'un modèle pour comprendre et maîtriser le portage digestif des Escherichia coli entérohémorragiques chez le bovin,* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 15 novembre 2017
Docteur **Delphine BIBBAL**
Maître de Conférences
de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMPELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Eric OSWALD



Professeur Eric OSWALD
Chef de Service
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
Institut Fédératif de Biologie
330 av. de Grande Bretagne - TSA 40031
31059 TOULOUSE CEDEX 9

M. BELLEC Ezhvin
a été admis(e) sur concours en : 2012
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 17/03/2016
a validé son année d'approfondissement le : 02/11/2017
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CPEU

Jean-Pierre VINEL

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, K., Brulisauer, F., 2010. The application of food safety interventions in primary production of beef and lamb: a review. *Int J Food Microbiol* 141 Suppl 1, S43-52.
- Agger, M., Scheutz, F., Villumsen, S., Molbak, K., and Petersen, A.M. (2015). Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: a systematic review and a proposal. *J Antimicrob Chemother* 70(9), 2440-2446. doi:10.1093/jac/dkv162.
- Alam, M. J. and Zurek, L. (2006). Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle feces. *J. Food Prot.* 69, 3018–3020.
- Álvarez-Suárez, María-Elena, Otero, Andres, García-López, María-Luisa, Dahbi, Ghizlane Blanco, Miguel Mora, Azucena Blanco, Jorge Santos, Jesus 2016/07/01 International Journal of Food Microbiology Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment 236 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035
- Andreoli, S.P., Trachtman, H., Acheson, D.W., Siegler, R.L., and Obrig, T.G. (2002). Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol* 17(4), 293-298. doi:10.1007/s00467-001-0783-0.
- Arthur, T.M., Keen, J.E., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Nou, X., Koochmaraie, M., 2009. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Appl Environ Microbiol* 75, 6515-6523.
- Ayscue, P., Lanzas, C., Ivanek, R., Grohn, Y.T., 2009. Modeling on-farm *Escherichia coli* O157:H7 population dynamics. *Foodborne Pathog Dis* 6, 461-470.
- Bach, S.J., Selinger, L.J., Stanford, K., McAllister, T.A., 2005. Effect of supplementing corn- or barley-based feedlot diets with canola oil on faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. *J Appl Microbiol* 98, 464-475.
- Berry, E.D., Wells, J.E., 2010. *Escherichia coli* O157:H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. *Adv Food Nutr Res* 60, 67-117.
- Besser, T.E., Schmidt, C.E., Shah, D.H., Shringi, S., 2014. "Preharvest" Food Safety for *Escherichia coli* O157 and Other Pathogenic Shiga Toxin-Producing Strains. *Microbiol Spectr* 2.
- Betts, GD (2000). Controlling *E. coli* O157:H7. *Nutr. Food Sci.*, 30: 183-186.
- Bibbal, D., Kerouredan, M., Loukiadis, E., Scheutz, F., Oswald, E., and Brugere, H. (2014a). Slaughterhouse effluent discharges into rivers not responsible for environmental occurrence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 168(2-4), 451-454.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kerouredan, M., Ferre, F., Dilasser, F., Peytavin de Garam, C., Cartier, P., Oswald, E., Gay, E., Auvray, F., Brugere, H., 2015. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol* 81, 1397-1405.
- Bouvet, J., Livrelli, V., Mariani-Kurkdjan, P., and Oswald, E. (2003). Pathologie humaine et animale liée aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) In AFSSA (ed.), *Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC)*. AFSSA:29-39.

- Brashears, M.M., Chaves, B.D., 2017. The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. *Meat Sci*.
- Brichta-Harhay, D. M., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Kalchayanand, N., and Koochmaraie, M. (2007). Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1657–1668.
- Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., and Karch, H. (1999). The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 145 (Pt 5), 1005-1014. doi: 10.1099/13500872-145-5-1005.
- Callaway, T.R., Carr, M.A., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol*11, 67-79.
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Harvey, R.B., Genovese, K.J., Kennedy, C.N., Venn, D.W., Nisbet, D.J., 2008. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim Health Res Rev*9, 217-225.
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L., Woolhouse, M., 2008. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat Rev Microbiol*6, 904-912.
- Chaucheyras-Durand, F., Madic, J., Doudin, F., Martin, C., 2006. Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Appl Environ Microbiol*72, 4136-4142.
- Cimolai, N., Carter, J.E., Morrison, B.J., and Anderson, J.D. (1990) Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 116: 589-592.
- Corbishley, A., Ahmad, N.I., Hughes, K., Hutchings, M.R., McAteer, S.P., Connelley, T.K., Brown, H., Gally, D.L., McNeilly, T.N., 2014. Strain-dependent cellular immune responses in cattle following *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Infect Immun*82, 5117-5131.
- Cray, W. C., and H. W. Moon. 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1586–1590.
- Davis, M.A., Cloud-Hansen, K.A., Carpenter, J., Hovde, C.J., 2005. *Escherichia coli* O157:H7 in environments of culture-positive cattle. *Appl Environ Microbiol*71, 6816-6822.
- Davis, T.K., Van De Kar, N.C., and Tarr, P.I. (2014). Shiga Toxin/Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections: Practical Clinical Perspectives. *Microbiol Spectr* 2(4), EHEC-0025-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0025-2014.
- Dean-Nystrom, E.A., Bosworth, B.T., Cray, W.C., Jr., Moon, H.W., 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun*65, 1842-1848.
- Dean-Nystrom, E.A., Stoffregen, W.C., Bosworth, B.T., Moon, H.W., Pohlentz, J.F., 2008. Early attachment sites for Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated weaned calves. *Appl Environ Microbiol*74, 6378-6384.
- Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B., et al. (2000). Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. The Societe de Nephrologie Pediatrique. *Epidemiol Infect* 124(2), 215-220.

- Delahay, R.M., Frankel, G., and Knutton, S. (2001). Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Curr Opin Infect Dis* 14(5), 559-565.
- Dodd, C.C., Sanderson, M.W., Sargeant, J.M., Nagaraja, T.G., Oberst, R.D., Smith, R.A., Griffin, D.D., 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feeds in Midwestern feedlots. *Appl Environ Microbiol*69, 5243-5247.
- Dodson, K., and J. LeJeune. 2005. *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* prevalence in cull dairy cows marketed in northeastern Ohio. *J. Food Prot.* 68:927–931.
- Doyle, M.P., Erickson, M.C., 2012. Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *Int J Food Microbiol*152, 54-74.
- Dunn JR, Keen JE, Thompson RA. Prevalence of Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7 in adult dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2004 Apr 1;224(7):1151-8.
- Edrington, T. S., Callaway, T. R., Ives, S. E., Engler, M. J., Loofer, M. L., Anderson, R. C., and Nisbet, D. J. (2006a). Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants: A new hypothesis. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 413–421.
- Elaine D. Berry, and James E. Wells *Escherichia coli* O157:H7: Recent Advances in Research on Occurrence, Transmission, and Control in Cattle and the Production Environment *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 60 ISSN 1043-4526, DOI: 10.1016/S1043-4526(10)60004-6
- Elder, R.O., Keen, J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher, G.A., Koohmaraie, M., Laegreid, W.W., 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl AcadSci U S A*97, 2999-3003.
- Ellis-Iversen, J., Smith, R.P., Van Winden, S., Paiba, G.A., Watson, E., Snow, L.C., Cook, A.J., 2008. Farm practices to control *E. coli* O157 in young cattle--a randomised controlled trial. *Vet Res*39, 3.
- Ezawa A, Gocho F, Kawata K, *et al.* High prevalence of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC*) O157 from cattle in selected regions of Japan. *J Vet Med Sci.* 2004 May;66(5):585-7.
- Ferens, W.A., Hovde, C.J., 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis*8, 465-487.
- Fox, J.T., Thomson, D.U., Drouillard, J.S., Thornton, A.B., Burkhardt, D.T., Emery, D.A., Nagaraja, T.G., 2009. Efficacy of *Escherichia coli* O157:H7 siderophore receptor/porin proteins-based vaccine in feedlot cattle naturally shedding *E. coli* O157. *Foodborne Pathog Dis*6, 893-899.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol*141 Suppl 1, S15-28.
- Geue L., Segura-Alvarez M., Conraths F.J., *et al.* A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC*) on four German cattle farms. *Epidemiol Infect* 2002;129:173-185.
- Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 85(13 Suppl), E45-62. doi: 10.2527/jas.2006-508.
- Hamm, K., Barth, S.A., Stalb, S., Geue, L., Liebler-Tenorio, E., Teifke, J.P., Lange, E., Tauscher, K., Kotterba, G., Bielaszewska, M., Karch, H., Menge, C., 2016. Experimental Infection of Calves with *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci Rep*6, 32812.
- Hancock D. D., Rice D. H., Thomas I. A., *et al.* Epidemiology of *E. coli* O157

- Herold, S., Karch, H., and Schmidt, H. (2004). Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 294(2-3), 115-121. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.023.
- Hoffman, M.A., Menge, C., Casey, T.A., Laegreid, W., Bosworth, B.T., Dean-Nystrom, E.A., 2006. Bovine immune response to shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Clin Vaccine Immunol* 13, 1322-1327.
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., and Muniesa, M. (2009). Phage-mediated Shigatoxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* 75(6), 1764-1768. doi:10.1128/AEM.02273-08.
- in feedlot cattle. *J. Food Prot.* 1997;61:462-465.
- Ishii, S., Ksoll, W. B., Hicks, R. E., and Sadowsky, M. J. (2006). Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 612–621.
- Islam MZ, MuzekiwaA, Islam K, Ahmed S, ChowdhuryS, et al. (2014) Regional variation in the Prevalence of *E. coli* O157 in Cattle: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *PLoS ONE* 9(4): e93299. doi:10.1371/journal.pone.0993299
- Jacob, M.E., Callaway, T.R., Nagaraja, T.G., 2009. Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli* O157 colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathog Dis* 6, 785-792.
- Jeong KC, Hiki O, Kang MY, Park D, Kaspar CW. Prevalent and persistent *Escherichia coli* O157:H7 strains on farms are selected by bovine passage. *Vet Microbiol.* 2013 Mar 23;162(2-4):912-20. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.034. Epub 2012 Nov 29.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.
- Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140, 360-370.
- Keen, J.E., Laegreid, W.W., Chitko-McKown, C.G., Durso, L.M., Bono, J.L., 2010. Distribution of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in the gastrointestinal tract of naturally O157-shedding cattle at necropsy. *Appl Environ Microbiol* 76, 5278-5281.
- Kulow, M.J., Gonzales, T.K., Pertzborn, K.M., Dahm, J., Miller, B.A., Park, D., Gautam, R., Kaspar, C.W., Ivanek, R., Dopfer, D., 2012. Differences in colonization and shedding patterns after oral challenge of cattle with three *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Appl Environ Microbiol* 78, 8045-8055.
- Lahti, E., Ruoho, O., Rantala, L., Hanninen, M.L., Honkanen-Buzalski, T., 2003. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit. *Appl Environ Microbiol* 69, 554-561.
- LeJeune, J.T., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* 67, 3053-3057.
- LeJeune, J.T., Besser, T.E., Rice, D.H., Berg, J.L., Stilborn, R.P., Hancock, D.D., 2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover. *Appl Environ Microbiol* 70, 377-384.
- Levine, M.M., Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., et al. (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 156(1), 175-182.
- Liebana E, Smith RP, Batchelor M, et al. Persistence of *E. coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *J Clin Microbiol.* 2005 Feb;43(2):898-902.

- Lopez, E.L., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B.E., et al. (1989). Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis* 160(3), 469-475.
- Low, J. C., McKendrick, I. J., McKechnie, C., Fenlon, D., Naylor, S. W., Currie, C., Martorelli, L., Hovde, C.J., Vilte, D.A., Albanese, A., Zotta, E., Ibarra, C., Cantet, R.J., Mercado, E.C., Cataldi, A., 2015. Impact of Infection Dose and Previous Serum Antibodies against the Locus of Enterocyte Effacement Proteins on *Escherichia coli* O157:H7 Shedding in Calves following Experimental Infection. *Biomed Res Int* 2015, 290679.
- Matthews, L., Low, J.C., Gally, D.L., Pearce, M.C., Mellor, D.J., Heesterbeek, J.A., Chase-Topping, M., Naylor, S.W., Shaw, D.J., Reid, S.W., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E., 2006. Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 547-552.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5), 1664-1668.
- Moxley, R.A., Acuff, G.R., 2014. Peri- and Postharvest Factors in the Control of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Beef. *Microbiol Spectr* 2.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1), 142-201.
- Nathanson, S., Kwon, T., Elmaleh, M., Charbit, M., Launay, E.A., Harambat, J., et al. (2010). Acute neurological involvement in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 5(7), 1218-1228. doi: 10.2215/CJN.08921209.
- Naylor, S.W., Flockhart, A., Nart, P., Smith, D.G., Huntley, J., Gally, D.L., Low, J.C., 2007. Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves is reduced by prior colonization with the homologous strain. *Appl Environ Microbiol* 73, 3765-3767.
- Naylor, S.W., Gally, D.L., and Low, J.C. (2005). Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295 (6-7), 419-441.
- Naylor, S.W., Low, J.C., Besser, T.E., Mahajan, A., Gunn, G.J., Pearce, M.C., McKendrick, I.J., Smith, D.G., Gally, D.L., 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun* 71, 1505-1512.
- Nicholls, L., Grant, T.H., and Robins-Browne, R.M. (2000). Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* 35(2), 275-288.
- Nitschke, M., Sayk, F., Hartel, C., Roseland, R.T., Hauswaldt, S., Steinhoff, J., et al. (2012). Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA* 307(10), 1046-1052. doi: 10.1001/jama.2012.264.
- Niu, Y.D., Johnson, R.P., Xu, Y., McAllister, T.A., Sharma, R., Louie, M., Stanford, K., 2009. Host range and lytic capability of four bacteriophages against bovine and clinical human isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* 107, 646-656.
- Obrig, T.G., Moran, T.P., and Brown, J.E. (1987). The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem J* 244(2), 287-294.

- Ogden, I. D., MacRae, M., and Strachan, N. J. C. (2004). Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal? *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 297–300.
- O'Loughlin, E.V., and Robins-Browne, R.M. (2001). Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect* 3(6), 493-507.
- Omisakin, F., MacRae, M., Ogden, I. D., and Strachan, N. J. C. (2003). Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2444–2447.
- Persad, A.K., and LeJeune, J.T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2(4), EHEC-0027-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014.
- Pruimboom-Brees, I.M., Morgan, T.W., Ackermann, M.R., Nystrom, E.D., Samuel, J.E., Cornick, N.A., et al. (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19), 10325-10329. doi: 10.1073/pnas.190329997.
- Remuzzi, G. (1987). HUS and TTP: variable expression of a single entity. *Kidney Int* 32(2), 292-308.
- Repetto, H.A. (1997) Epidemic hemolytic-uremic syndrome in children. *Kidney Int* 52: 1708-1719.
- Robinson, S. E., Wright, E. J., Hart, C. A., Bennett, M., and French, N. P. (2004). Intermittent and persistence shedding of *Escherichia coli* O157 in cohorts of naturally infected calves. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1045–1053.
- Ryan, E.M., Gorman, S.P., Donnelly, R.F., Gilmore, B.F., 2011. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol* 63, 1253-1264.
- Sabouri, S., Sepehrizadeh, Z., Amirpour-Rostami, S., Skurnik, M., 2017. A minireview on the in vitro and in vivo experiments with anti-*Escherichia coli* O157:H7 phages as potential biocontrol and phage therapy agents. *Int J Food Microbiol* 243, 52-57.
- Sargeant, J. M., Gillespie, J. R., Oberst, R. D., Phebus, R. K., Hyatt, D. R., Bohra, L. K., and Galland, J. C. (2000). Results of a longitudinal study of the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on cow-calf farms. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1375–1379.
- Schmidt, H., Karch, H., and Beutin, L. (1994). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 117(2), 189-196.
- Schmidt, H., Kernbach, C., and Karch, H. (1996). Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:h7. *Microbiology* 142 (Pt 4), 907-914. doi: 10.1099/00221287-142-4-907.
- Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Nou, X., and Koohmaraie, M. (2009). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6515–6523.
- Shere, J.A., Bartlett, K.J., Kaspar, C.W., 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 64, 1390-1399.

- Shere, J.A., Kaspar, C.W., Bartlett, K.J., Linden, S.E., Norell, B., Francey, S., Schaefer, D.M., 2002. Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle housed in a confined environment following waterborne inoculation. *Appl Environ Microbiol* 68, 1947-1954.
- Smith, D. G. E., Allison, L., and Galley, D. L. (2005). Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 93–97.
- Smith, D., Blackford, M., Younts, S., Moxley, R., Gray, J., Hungerford, L., Milton, T., Klopfenstein, T., 2001. Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *J Food Prot* 64, 1899-1903.
- Smith, D.R., 2014. Vaccination of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol Spectr* 2.
- Snedeker, K.G., Campbell, M., Sargeant, J.M., 2012. A systematic review of vaccinations to reduce the shedding of *Escherichia coli* O157 in the faeces of domestic ruminants. *Zoonoses Public Health* 59, 126-138.
- Soon, J.M., Chadd, S.A., Baines, R.N., 2011. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle: on farm contamination and pre-slaughter control methods. *Anim Health Res Rev* 12, 197-211.
- Steinborn, M., Leiz, S., Rudisser, K., Griebel, M., Harder, T., and Hahn, H. (2004). CT and MRI in haemolytic uraemic syndrome with central nervous system involvement: distribution of lesions and prognostic value of imaging findings. *Pediatr Radiol* 34(10), 805-810. doi:10.1007/s00247-004-1289-2.
- Stevens, M.P., and Frankel, G.M. (2014). The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2(4), EHEC-0007-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013.
- Tarr, P.I. (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20: 1-8; quiz 9-10.
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., et al. (2001). *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69(11), 6660-6669. doi: 10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001.
- Thran B.H., Hussein H.S., Hall M.R., et al. Shiga toxin-producing *E. coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J Food Prot* 2001;64:1613-1616.
- Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., LeJeune, J., Klashinsky, S., 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can Vet J* 42, 714-720.
- Varela, N.P., Dick, P., Wilson, J., 2013. Assessing the existing information on the efficacy of bovine vaccination against *Escherichia coli* O157:H7--a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health* 60, 253-268.
- Vidovic, S., and D. R. Korber. 2006. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Saskatchewan cattle: Characterization of isolates by using random amplified polymorphic DNA PCR, antibiotic resistance profiles, and pathogenicity determinants. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4347–4355.
- Widiasih DA, Ido N, Omoe K, Sugii S, et al. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *E. coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect.* 2004 Jan;132(1):67-75.
- Widiasih DA, Ido N, Omoe K, Sugii S, et al. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *E. coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect.* 2004 Jan;132(1):67-75.

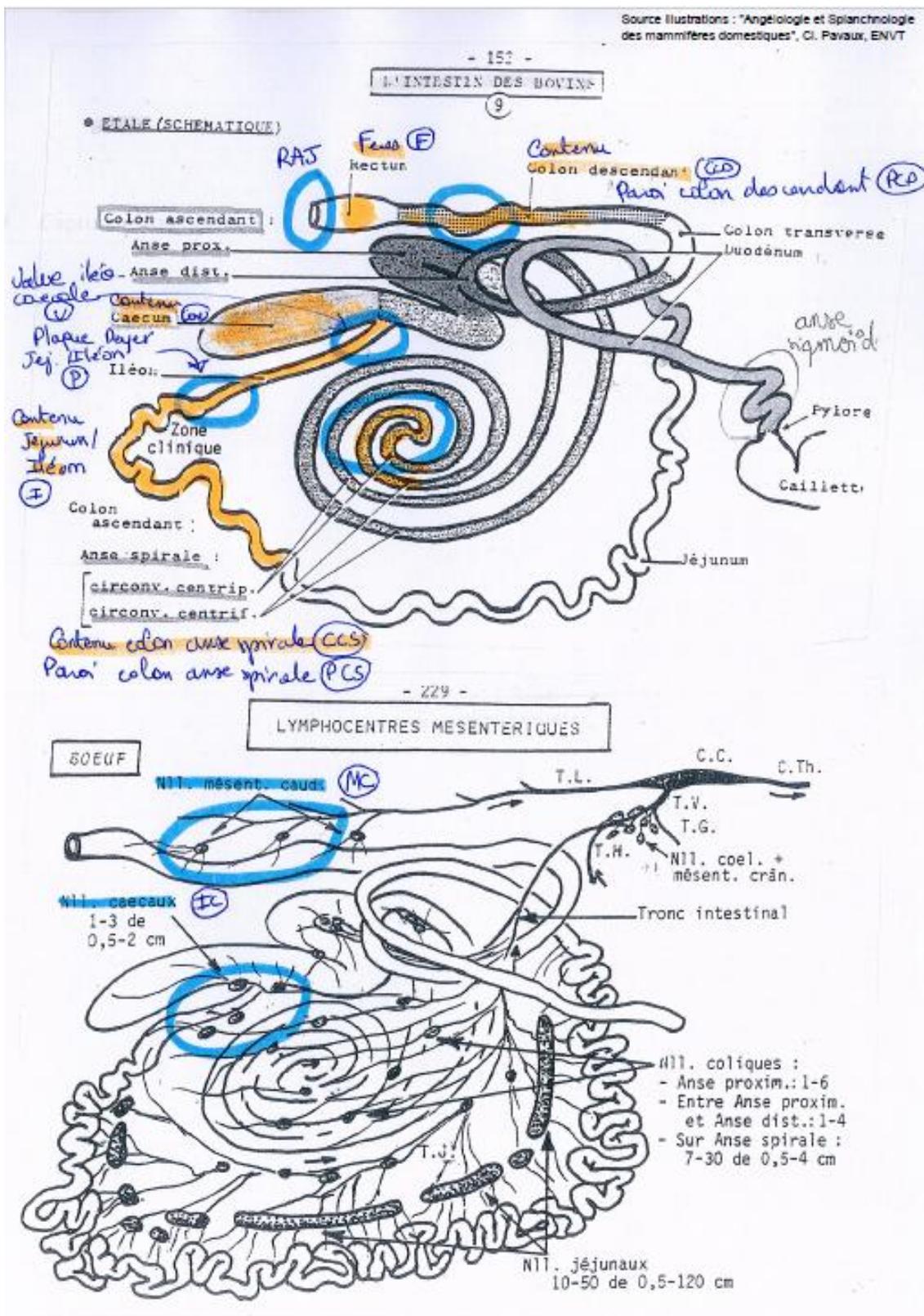
- Wisener, L.V., Sargeant, J.M., O'Connor, A.M., Faires, M.C., Glass-Kaastra, S.K., 2015. The use of direct-fed microbials to reduce shedding of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health* 62, 75-89.
- Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., and Tarr, P.I. (2000). The risk of the hemolyticuremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 342(26), 1930-1936. doi: 10.1056/NEJM200006293422601.

ANNEXES

Annexe 1

Localisation anatomique des prélèvements digestifs

Source illustration : "Angéiologie et Splanchnologie des mammifères domestiques", Cl. Pavau, ENVT



Annexe 2

Valeurs moyennes des paramètres de la numération formule sanguine des bovins des groupes A, B et T

Leucocytes	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
10³/μL	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	9.3	1.5	16.0	4.2	9.6	1.4
J4			10.6	1.5		
J7	9.6	1.8			8.7	0.9
J14	9.1	1.8			8.5	0.6
J21	9.9	2.1			8.4	1.0
J27	9.3	2.2				
Neutrophiles	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
10³/μL	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	2.1	1.0	7.1	4.5	2.2	0.4
J4			3.3	1.6		
J7	2.5	0.6			1.9	0.2
J14	2.0	0.8			2.1	0.5
J21	2.3	1.0			1.8	0.2
J27	2.3	0.9				
Lymphocytes	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
10³/μL	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	5.3	1.3	7.2	1.5	6.2	1.2
J4			5.7	1.4		
J7	6.1	1.0			6.0	0.8
J14	5.9	1.0			5.5	0.6
J21	6.3	1.0			5.8	1.0
J27	5.8	1.2				
Monocytes	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
10³/μL	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	1.0	0.2	1.4	0.3	1.0	0.3
J4			1.3	0.6		
J7	0.8	0.2			0.7	0.2
J14	1.0	0.4			0.7	0.1
J21	0.8	0.2			0.6	0.1
J27	0.8	0.2				
Eosinophiles	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
10³/μL	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	0.07	0.05	0.10	0.06	0.07	0.02
J4			0.10	0.10		
J7	0.10	0.05			0.07	0.02
J14	0.14	0.14			0.09	0.03
J21	0.32	0.21			0.12	0.04
J27	0.19	0.10				
Basophiles	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
10³/μL	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	0.21	0.08	0.18	0.01	0.16	0.08
J4			0.23	0.06		
J7	0.16	0.09			0.10	0.05
J14	0.14	0.06			0.08	0.03
J21	0.16	0.05			0.10	0.04
J27	0.15	0.05				

Annexe 3

Moyennes des valeurs des paramètres biochimiques pour les bovins des groupes A, B et T

Urée	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
mmol/L	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	3.6	0.8	4.0	1.1	2.5	0.7
J4			3.6	0.7		
J7	3.9	0.8			3.4	0.5
J14	3.7	0.7			3.0	0.7
J21	4.1	0.9				
J27	3.0	0.9			2.4	0.4
Créatinine	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
µmol/L	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	104.7	9.3	87.7	14.3	105.3	8.4
J4			86.8	7.8		
J7	96.0	14.8			109.6	8.8
J14	84.2	8.1			95.7	10.3
J21	83.4	6.1				
J27	81.8	6.4			95.3	5.6
AST	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
U/L	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	83.2	8.1	91.0	12.0	90.0	12.3
J4			91.8	9.3		
J7	82.6	10.2			80.2	10.1
J14	95.4	29.8			76.4	11.4
J21	80.4	8.8				
J27	95.2	14.7			86.4	9.4
Créatine kinase	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
U/L	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	119.4	26.7	144.3*	9.2	103.2	8.8
J4			148.0	42.9		
J7	100*	12.5			126.8	34.7
J14	129.2	51.9			112.2	17.3
J21	127.0	50.7				
J27	145.8	47.1			138.6	4.2
* Retrait donnée aberrante						
γGT	Groupe A		Groupe B		Groupe T	
U/L	Moy.	ET	Moy.	ET	Moy	ET
J-4	18.6	4.561	25.2	6.0	20.0	3.2
J4			24.8	5.0		
J7	18.4	2.9			19.6	2.7
J14	17.0	0.7			18.6	1.8
J21	17.8	1.3				
J27	18.2	1.3			20.2	2.4

Toulouse 2017

Nom : BELLEC

Prénom : Ezhvin

TITRE : Développement d'un modèle pour comprendre et maîtriser le portage des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) chez le bovin

RESUME :

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) O157:H7 sont responsables du syndrome hémolytique et urémique chez les jeunes enfants. L'étude a eu pour objectif de développer un modèle expérimental d'infection par les EHEC O157:H7 afin de caractériser le portage par le bovin pour une meilleure maîtrise dans ce réservoir animal. L'inoculation de la souche EHEC O157:H7 MC2 n'a pas eu d'impact sur l'état clinique des bovins. Pendant les 7 premiers jours, l'excrétion fécale de MC2 était relativement élevée ; puis elle a progressivement diminué. A J23, la souche était encore détectée chez tous les bovins. Après autopsie, des concentrations élevées de MC2 ont été détectées dans les contenus de l'iléon, du caecum, du côlon spiral et du côlon descendant. La jonction recto-anale était le site de colonisation de prédilection de MC2, mais d'autres segments du tube digestif pouvaient également être colonisés à des niveaux élevés par MC2, notamment l'iléon, la valvule iléo-caecal et le côlon.

MOTS CLEFS : *Escherichia coli*, EHEC, O157:H7, portage, bovins

TITLE: Development of a model to understand and control the shedding of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in cattle

ABSTRACT:

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are responsible for the hemolytic-uremic syndrome in young children. The objective of this study was to develop a model of experimental infection by EHEC O157:H7 to characterize the shedding and excretion by cattle in order to achieve a better control of this animal reservoir. EHEC O157:H7 MC2 inoculation did not affect the clinical status of cattle. During the first 7 days, fecal excretion of MC2 was relatively high, then it gradually declined. MC2 strain was still detected in all cattle 23 days post inoculation. At necropsy, high concentrations of MC2 were detected in contents of ileum, cecum, spiral colon and descending colon. The recto-anal junction was MC2 predilection site of colonization, but other tissues could be colonized at high concentrations, notably tissues of the ileon, the ileo-cecal valve and the colon.

KEYWORDS: *Escherichia coli*, EHEC, O157:H7, shedding, cattle