

UNIVERSITÉ DE BLIDA-1

Institut des Sciences Vétérinaires

THÈSE DE DOCTORAT

En Sciences Vétérinaires

Spécialité : **Sciences Vétérinaires**

*Etude du portage des *Escherichia coli* Entérohémorragiques
(EHEC) chez les bovins et leurs impacts sur la santé humaine*

Par

Madjid SADI

Devant le Jury composé de :

ZIAM Hocine	Professeur, ISV, Université Blida 1	Président
OUMOUNA Mustapha	Professeur, Univ, Yahia farès de Médéa	Examineur
BAAZIZE-AMMI, Djamila	Professeure, ISV, Université Blida 1	Examinatrice
BENACHOUR Karine	Professeure, Univ, Yahia farès de Médéa	Examinatrice
TITOUCHE Yacine	MCA, Univ Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou	Examineur
MENOUERI M. Nabil	Professeur, ISV, Université Blida 1	Directeur de thèse
TORRES Carmen	Professeure, Universidad de la Rioja	Invitée

Blida, Juillet 2025

RESUME

La santé humaine et animale est interconnectée, car elles contribuent toutes à l'émergence et à la propagation de bactéries pathogènes ainsi qu'à la résistance aux antibiotiques. *Escherichia coli* est une bactérie commensale présente dans le tube digestif des humains et des animaux en bonne santé, mais elle peut également acquérir un pouvoir pathogène. L'objectif de cette thèse est de caractériser les souches d'*Escherichia coli*** pathogènes, notamment les souches entérohémorragiques (EHEC), isolées à partir de matières fécales de bovins asymptomatiques et d'échantillons d'enfants diarrhéiques, en mettant particulièrement l'accent sur les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques.

Sur un total de 223 souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine et 85 souches d'origine humaine, 39,9 % des souches bovines et 61,2 % des souches humaines présentaient une résistance à au moins un agent antimicrobien. Des taux de résistance élevés ont été observés pour les antibiotiques les plus utilisés en pratique vétérinaire et en santé publique. Cinq souches (2 bovines et 3 humaines) productrices de *BLSE* ont été identifiées. Le gène CTX-M-15 était présent dans 4 souches et le gène SHV-12 a été identifié dans une souche d'origine bovine. Parmi les souches résistantes au SXT, des intégrons de classe 1 et de classe 2 ont été détectés respectivement dans 82,9 % (29/35) et 12,9 % (1/35) des souches bovines et 87,5 % (21/24). 16,7% (4/24) des souches humaines.

Aucune des souches d'*E. coli* étudiées n'appartient au pathotype EHEC typique, qu'elles aient été isolées de bovins ou d'humains. Cependant, 4 aEHEC (3 souches bovines et une souche humaine) ont été identifiés. La souche humaine appartenait au sérotype O55 : H12 et les souches bovines appartenaient au sérotype O113 : H21.

Parmi les *E. coli* isolées dans cette étude, des STEC et des aEPEC ont été identifiés dans 2,24 % (n=5) et 4,5 % (n=10) des bovins respectivement, tous de sérotypes non-O157. Les gènes de virulence *stx1* et *stx2* étaient présents, associés aux autres gènes déterminants (*fimH*, *hlyA*, *subAB*, *tia* et *cnf1*).

La recherche des ExPEC a révélé la présence de 13 souches UPEC (5 souches bovines et 8 souches humaines) portant une variété de gènes de virulence (*FimH*, *hlyA*, *cnf*, *ibeA*, *Pap* et *sfa*, *sat*, *vat*, *traT*, *kpsMTII*). Ce résultat soulève la possibilité que certaines souches fécales puissent être des uropathogènes potentiels.

Cette étude apporte un éclairage sur la dynamique populationnelle de l'*Escherichia coli* ainsi que le flux des gènes de résistance et de virulence, et l'interaction de cette bactérie dans les domaines humain et animal.

Mots-clés : *Escherichia coli*, EHEC, STEC, gènes de virulence, antibiorésistance, bovins, humain, Algérie.

ABSTRACT

Human and animal health is interconnected, as both contribute to the emergence and spread of pathogenic bacteria as well as antimicrobial resistance. *Escherichia coli* is a commensal bacteria found in the digestive tract of healthy humans and animals, but it can also acquire pathogenic potential. The aim of this thesis is to characterize pathogenic *Escherichia coli* strains, particularly EHEC, originating from bovine and human feces, with a focus on virulence genes and antimicrobial resistance.

A total of 39.9% of *E. coli* strains from bovine sources and 61.2% of human strains were resistant to at least one antimicrobial agent. High resistance rates were observed for antimicrobials commonly used in veterinary practice and public health. Five extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing strains (2 bovine and 3 human) were identified. The CTX-M-15 gene was present in 4 strains, and the SHV-12 gene was found in a bovine strain. Among the strains resistant to SXT, class 1 and class 2 integrons were detected in 82.9% (29/35) and 12.9% (1/35) of bovine strains, respectively, and in 87.5% (21/24) and 16.7% (4/24) of human strains.

None of the *E. coli* strains studied in this thesis belonged to the typical EHEC pathotype, whether isolated from cattle or humans. However, four atypical EHEC (aEHEC) strains (3 bovine and 1 human) were identified. The human strain belonged to the O55:H12 serotype, while a bovine strain belonged to the O113:H21 serotype. Among the bacterial collection, STEC and aEPEC were identified in 2.24% (n=5) and 4.5% (n=10) of bovines, respectively, all of non-O157 serotypes. The virulence genes *stx1* and *stx2* were present, along with other determinant genes (*fimH*, *hlyA*, *subAB*, *tia*, and *cnf1*).

The search for EXPEC revealed the presence of 13 UPEC strains (5 bovine strains and 8 human strains) carrying a variety of virulence genes (*FimH*, *hlyA*, *cnf*, *ibeA*, *Pap*, *sfa*, *sat*, *vat*, *traT*, *kpsMTII*). This result raises the possibility that some fecal strains could be potential uropathogens.

This thesis sheds light on the population dynamics of *Escherichia coli*, the flow of resistance and virulence genes, and the interaction of this bacterium in both human and animal domains.

Keywords : *Escherichia coli*, EHEC, STEC, virulence genes, antimicrobial resistance, bovines, humans, Algeria.

الملخص

يكن الترابط بين صحة الإنسان وصحة الحيوان في مساهمة كل منهما في نشوء البكتيريا الممرضة وانتشارها، فضلا عن تطور مقاومة المضادات الحيوية.

تنتمي إشريشيا القولونية إلى فئة البكتيريا المتعايشة، حيث تتواجد بشكل طبيعي في الجهاز الهضمي عند الإنسان والحيوانات السليمة، ومع ذلك فإن بإمكانها أن تكتسب خصائص ممرضة. يهدف هذا البحث إلى توصيف سلالات *Escherichia coli* الممرضة، ولاسيما سلالات EHEC المعزولة من عينات البراز عند الأبقار وكذلك الإنسان، مع التركيز بشكل خاص على جينات الضراوة ومقاومة المضادات الحيوية.

بشكل عام، كانت 39.9% من سلالات إشريشيا القولونية المعزولة من الأبقار و61.2% من السلالات المعزولة من البشر مقاومة على الأقل لمضاد حيوي واحد. كما لوحظت معدلات مقاومة مرتفعة اتجاه المضادات الحيوية الأكثر استخدامًا في الطب البيطري وكذلك الصحة العمومية. تم تحديد خمس سلالات منتجة للبيتا-لاكتاماز واسعة الطيف (BLSE)، منها سلالتان من أصل بقري وثلاث سلالات بشرية. وجد الجين CTX-M-15 في أربع سلالات، بينما تم تحديد الجين SHV-12 في سلالة واحدة عند الأبقار. من بين السلالات المقاومة لـ SXT، تم الكشف عن الإنتجرونات من الفئة 1 والفئة 2 على التوالي في 82.9% (35/29) و 12.9% (35/1) من السلالات البقرية، و 87.5% (24/21) و 16.7% (24/4) من السلالات البشرية.

لم تنتم أي من سلالات إشريشيا القولونية التي درست في هذه الأطروحة إلى النمط الممرض النموذجي لـ EHEC، سواء كانت معزولة من الأبقار أو من البشر. ومع ذلك، تم تحديد أربع سلالات غير نمطية من EHEC (aEHEC)، ثلاث منها تم عزلها من الأبقار، تنتمي إحداها إلى النمط المصلي O113:H21 وسلالة واحدة بشرية تنتمي إلى النمط المصلي O55:H12. من بين مجموعة البكتيريا المدروسة، تم تحديد سلالات STEC و aEPEC في 2.24% (n=5) و 4.5% (n=10) من عينات الأبقار على التوالي، جميعها تنتمي إلى أنماط مصلية غير O157. كما وجدت جينات الضراوة stx1 و stx2، مقترنة بجينات بجينات أخرى محددة (fimH، hlyA، subAB، tia و cnf1).

كشفت البحث عن EXPEC عن وجود 13 سلالة من UPEC (5 سلالات بقرية و 8 سلالات بشرية) تحمل مجموعة متنوعة من الجينات الممرضة (FimH، hlyA، cnf، ibeA، Pap، sfa، sat، vat، traT، kpsMTII). تشير هذه النتائج إلى احتمال أن تكون بعض السلالات البرازية من مسببات التهابات المسالك البولية.

تقدم هذه الأطروحة رؤية معمقة حول الديناميكيات السكانية لبكتيريا إشريشيا القولونية، بالإضافة إلى انتقال جينات المقاومة والضراوة، و تفاعل هذه البكتيريا في البيئتين الصحية البشرية والحيوانية.

الكلمات المفتاحية:

EHEC، STEC، جينات الضراوة، مقاومة المضادات الحيوية، الأبقار، الإنسان، الجزائر. إشريشيا القولونية

REMERCEMENTS

Je ne saurais remercier assez le **Professeur Menoueri M N.**, directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce sujet et dirigé mon travail, pour les conseils qu'il m'a prodigués et enfin pour ses encouragements. Il m'a octroyé un privilège et un grand honneur en me confiant ce travail.

A Monsieur Ziam H.

Professeur à l'Université Saad Dahlab University – Blida1. Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury. Hommage respectueux.

A Monsieur Monsieur Oumouna M.

Professeur à l'Université Yahia farès de Médea. Pour avoir accepté de participer à notre jury de thèse. Sincères remerciements.

A Madame Baazize- Ammi D.

Professeure à l'Université Saad Dahlab University – Blida1. Qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer au jury de notre thèse. Sincères remerciements.

A Madame Benachour K.

Professeure à l'Université Yahia farès de Médea. Qui a eu l'amabilité d'accepter de prendre part au jury de notre thèse.

A Monsieur Titouche Y.

Maitre de conference A l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury. Hommage respectueux.

À Monsieur le Vice- Recteur des Relations Extérieures, la Coopération, de l'Animation et la Communication, et des Manifestations Scientifiques ainsi que pour toute son équipe qui m'ont accompagné durant la réalisation de ce travail.

À la Professeure Carmen Manrique Torres pour nous avoir accueillis dans son groupe de recherche au Laboratoire de biologie moléculaire à l'Université de La Rioja en Espagne, ce fut vraiment un grand plaisir de travailler avec vous. Un merci à tous les collègues d'Espagne, du Portugal, du Nigeria pour tout ce que j'ai appris avec eux et pour avoir rendu mon séjour à Logroño bien plus agréable. Merci à Nadia pour avoir pris le temps de m'aider dans les premiers temps.

Nous remercions Pr Akam A., Dr Akkou M. et Dr Oussadou L. pour leurs précieuses aides à la réalisation et à la conduite de notre étude. Et pour être sûr de ne manquer personne, que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué, par leurs conseils, leurs encouragements ou leur amitié, à l'aboutissement de ce modeste travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

À toutes et à tous mes ami(e)s

À mes parents, car je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous faites pour moi chaque jour. Tout ce que je suis et serai, c'est sans doute grâce à vous. Merci à toute ma famille pour son affection et son soutien inconditionnels à chaque étape de ma vie.

À ma femme, pour son amour, son aide, sa présence et sa patience.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

APEC : *Escherichia coli* pathogène aviaire

BLSE : Bêta-lactamase à spectre élargi

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DANMAP : Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme

EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ExPEC : *Escherichia coli* pathogène extra-intestinal

ITU : Infection du tractus urinaire

MAT : Microangiopathie thrombotique

MDR : Multi-Drug resistance (Multi-résistance aux antimicrobiens)

NARMS : National Antimicrobial Resistance Monitoring System

OMC : Organisation Mondiale du Commerce

PAI : Pathogénicité Island (Îlots de pathogénicité)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDR : Pandemic-drug resistance (Résistance pandémique aux antimicrobiens)

PICRA : Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens

STEC : *Escherichia coli* producteur de shigatoxine

UPEC : *Escherichia coli* uropathogène

XDR : Extreme-drug resistance (Résistance extrême aux antimicrobiens)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CCS : Concentrations critiques supérieure

CCI : Concentrations critiques inférieure

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Phénotypes de résistance associés aux enzymes modifiantes d'aminoglycosides [164].	45
Tableau 2 : Antibiotiques utilisés à but thérapeutique en élevage bovin en Algérie .	49
Tableau 3 : Concentration des disques antibiotiques et seuils utilisés pour les catégories sensibilité (S), résistance intermédiaire (I) et résistance (R) (Eucast, 2020).	55
Tableau 4 : Réactifs utilisés dans la technique PCR	57
Tableau 5 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance aux bêta -lactames (bêta-lactamases).	58
Tableau 6 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance aux quinolones.	59
Tableau 7 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance aux aminosides.	59
Tableau 8 : : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance à la tétracycline.	60
Tableau 9 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance au chloramphénicol.	60
Tableau 10 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification génique liées à la résistance aux sulfamides	61
Tableau 11 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification pour l'étude des intégrons	62
Tableau 12 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification pour la détermination du groupe phylogénétique d' <i>E. coli</i>	63
Tableau 13 : Génotypes quadruplex et étapes nécessaires à l'attribution des souches « <i>E. coli</i> » aux phylogroupes.	64
Tableau 14 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification pour la détermination du groupe phylogénétique d' <i>E. coli</i> .	65
Tableau 15 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification des gènes de virulence codant pour les Shigatoxines.	67
Tableau 16 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification des gènes de virulence codant pour l'intimine (eae).	67

Tableau 17 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes sous-types stx et eae.	68
Tableau 18 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour les andésines.....	70
Tableau 19 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour les toxines.....	71
Tableau 20 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour la capsule	72
Tableau 21 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour les capteurs de fer	72
Tableau 22 : Séquences d'amorces nucléotidiques des PCR des gènes codant pour d'autres gènes de virulence.....	73
Tableau 23 : Résistance aux antibiotiques des souches d' <i>E. coli</i> analysées dans cette étude.....	76
Tableau 24 : Différents phénotypes d'antibiorésistance des souches bovines	78
Tableau 25 : Différents phénotypes d'antibiorésistance des souches humaines.....	79
Tableau 26 : Résultats du pourcentage des gènes de résistance aux antibiotiques identifiés sur les 221 souches d' <i>E. coli</i> non productrices de BLSE d'origine bovine.	81
Tableau 27 : Résultats des fréquences de gènes de résistance aux antibiotiques obtenus sur les 82 souches d' <i>E. coli</i> non productrices de BLSE d'origine humaine.	82
Tableau 28 : La corrélation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques des souches bovines	87
Tableau 29 : La corrélation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques des souches humaines.....	89
Tableau 30 : Caractérisation des souches BLS.....	91
Tableau 31 : les caractéristiques des souches virulentes.....	95
Tableau 32 : Les caractéristiques des souches appartenant au phylogroupe B2.....	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Système de classification des AEEC/tEPEC/aEPEC/STEC/EHEC humaines à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d' <i>E. coli</i> . EPEC : enteropathogenic <i>E. coli</i> . EHEC : entérohémorragique <i>E. coli</i> . STEC : shigatoxin-producing <i>E. coli</i> . [49]	24
Figure 2: Evolution d'une infection à O157 :H7 chez un enfant [34].	26
Figure 3 : Structure de l'opéron codant les shigatoxines [63]	28
Figure 4 : Mécanisme d'action des shigatoxines. 1) Fixation, 2) Internalisation, 3) Transport rétrograde, 4) Clivage et Action d'après [65]	29
Figure 5 : Représentation schématique d'un bactériophage <i>stx</i> dans sa configuration tête-queue [73].	31
Figure 6 : Flux potentiels d' <i>E. coli</i> producteurs de shigatoxines (STEC) et d' <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC) et voies potentielles de contamination de l'environnement et de l'Homme. En gris : voie regroupant les effluents, en vert : voie végétale, en bleu : voie hydrique [63].	39
Figure 7 : Les principaux mécanismes de résistance décrits pour les différents groupes d'antibiotiques [151].	41
Figure 8 : Gélose MacConkey avec des colonies d' <i>E. coli</i> après purification	52
Figure 9 : Répartition des souches <i>E. coli</i> selon la wilaya d'étude	75
Figure 10 : Résistance globale des souches vis-à-vis des antibiotiques testés.....	77
Figure 11 : Différentes structures des integrons de classe 1 et de classe 2 des souches bovines.....	84
Figure 12: Différentes structures des integrons de classe 1 et de classe 2 des souches humaines.....	85
Figure 13: Groupes phylogénétiques.....	86

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
REMERCIEMENTS	5
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	10
TABLE DES MATIERES	11
INTRODUCTION	14
1. GÉNÉRALITÉS	16
1.1. Historique :	16
1.2. Définition :	16
1.3. Habitat :	17
2. CLASSIFICATION D' <i>E. COLI</i>	18
2.1. Notion de classification :	18
2.1.1 Classification selon le sérotype :	18
2.1.2. Classification selon les phylogroupes :	18
2.1.3. Classification selon les pathotypes :	20
3. <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATHOGENES	21
3.1. <i>Escherichia coli</i> producteurs de shigatoxines (STEC) :	21
3.2. <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC) :	21
3.3. <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques :	22
4. PATHOLOGIE ET FACTEURS DE VIRULENCE	25
4.1. Symptômes liés aux infections par des EHEC ou STEC :	25
4.2. Facteurs de virulence :	27
4.2.1. Shigatoxines :	27
4.2.2. Locus of enterocyte effacement (LEE) :	32
4.2.3. Autres gènes de virulence :	34
4.3. Réservoirs des STEC (EHEC) :	38
4.4. Mode de transmission	38
5. ANTIBIOTIQUES	40
5.1. Mécanismes d'action des antibiotiques :	40
5.2. Bactéries résistantes :	41
5.3. Mécanismes de résistances aux antibiotiques	41
5.4. Utilisation des antibiotiques en élevage :	46
5.5. Risques liés aux antibiotiques	47

5.4.1 Risques pour la santé animale et humaine :	48
5.6. Principaux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire en Algérie	48
6. PARTIE EXPERIMENTALE	50
6.1. Problématique et objectifs :	50
6.2. Matériel et méthodes :	50
6.2.1. <i>Escherichia coli</i> d'origine humaine :	50
6.2.2. Prélèvements de matières fécales d'origine bovine :	50
6.2.3. Méthode bactériologique :	51
6.2.4. Conservation des souches :	53
6.2.5. Identification par la technique de MALDI-TOF MS Spectrométrie de masse MALDI-TOF :	53
6.2.6. AntibioGramme :	53
6.2.7. Extraction d'ADN :	56
6.2.8. Amplification en chaine, Polymerase Chain Reaction (PCR) :	56
6.2.9. Sérotypage :	66
6.2.10. Caractérisation des gènes codant pour la virulence	66
6.2.11. Analyse d'amplicon par électrophorèse à courant direct :	73
6.2.12. Séquençage :	74
6.2.13. Analyse des séquences :	74
6.3. Résultats :	75
6.3.1. Souches d' <i>E. coli</i> d'origine bovine :	75
6.3.2. Souches d'origine humaine :	75
6.3.3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques :	76
6.3.4. Les groupes phylogénétiques :	85
6.3.5. Corrélation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques :	86
6.3.6. Caractéristiques des souches productrices des <i>BLSEs</i>	90
6.3.7. Caractérisation génétique des gènes de virulence :	92
6.3.8. Caractérisation des souches appartenant au phylogroupe B2 :	97
6.4. Discussion :	99
6.4.1. Échantillonnage :	99
6.4.2. Antibiorésistance :	99
8.4.3. Groupes phylogénétiques	103
8.4.4. Virulence	105
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	110

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113
-----------------------------------	-----

INTRODUCTION

La contamination de l'homme par des souches bactériennes portées par les animaux domestiques peut être à l'origine de pathologies graves. Cette contamination se fait *via* la consommation de denrées alimentaires d'origine animale souillées. Elle peut également se faire par contact avec l'environnement, souillé par des animaux vivants (*via* les fèces, le fumier, le lisier) ou morts (*via* les effluents d'abattoirs).

Certaines de ces bactéries sont pathogènes pour l'homme ou pour l'animal, citons, entre autres, *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Listeria* spp., et les colibacilles pathogènes. Ainsi, *E. coli* est une espèce au sein de laquelle on retrouve à la fois des souches hôtes normaux du tractus gastro-intestinal de l'animal et de l'homme, colonisant les individus sains, et des souches ayant acquis le pouvoir, très particulier, de causer des atteintes intestinales (EPEC, STEC) et de nombreuses affections extra-intestinales (ExPEC, UPEC ET APEC).

Ces *E. coli* dits pathogènes appartiennent à plus de 100 sérotypes différents. *Escherichia coli* O157 :H7, qui est le sérotype le plus important et le plus virulent, appartient à un sous-groupe pathogène de STEC appelés *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Au cours des trente dernières années, les STEC et en particulier le sérotype O157:H7 est devenu un problème de santé publique d'importance croissante au niveau mondial. D'autres sérogroupes non-O157, notamment les sérotypes, O26 :H11 ; O103 :H2, O111 :H8 et O145 :H28, ont été associés à des foyers occasionnels de maladie chez l'homme, les autres sérogroupes étant associés à des cas sporadiques.

Les bovins sont considérés comme le principal réservoir des infections humaines par les STEC. Malgré son pouvoir pathogène pour l'homme, *E. coli* O157 :H7 n'entraîne jamais de signes cliniques chez les animaux.

Ce travail a été initié dans le contexte où le cheptel bovin algérien est constitué d'un effectif qui dépasse 1 650 000 têtes, le fait est qu'on assiste depuis quelques années à une très forte augmentation de cet effectif dans le but d'assurer nos besoins en lait et en viande rouge. L'objectif principal était d'acquérir plus de connaissances sur la présence et la diversité des souches *E. coli* potentiellement pathogènes (en

particulier les EHEC) dans les matières fécales d'origine bovine asymptomatique et sur le risque sanitaire potentiel associé à la présence de ces microorganismes dans l'environnement. Dans le but d'avoir des réponses, nous nous sommes posés les questions suivantes

- Notre cheptel bovin est-il porteur de *E. coli* pathogènes en particulier les EHEC ?
- Quels sérotypes de EHEC sont présents dans les matières fécales bovines et sont-ils proches de ceux retrouvés en santé humaine ?
- Les *E. coli* pathogènes ont-ils développé des résistances pour les antibiotiques usuellement utilisés ?

Dans le cadre de cette étude, nous mènerons nos investigations dans trois wilayas du centre de l'Algérie : Tizi-Ouzou, Alger et Blida. Les souches d'*Escherichia coli* qui seront isolées feront l'objet d'une identification et d'un sérotypage à l'aide de méthodes culturales, biochimiques et immunologiques. Une caractérisation génétique des principaux gènes de virulence sera également effectuée. En parallèle, un antibiogramme sera réalisé pour chaque souche afin d'évaluer son profil de résistance aux antimicrobiens.

Afin de comprendre les approches expérimentales mises en place pour répondre aux questions posées dans ce travail, la première partie de ce travail se propose de définir ce que sont les *E. coli* non pathogènes et pathogènes. La deuxième partie décrit, d'un point de vue épidémiologique, les *E. coli* pathogènes (EHEC), la troisième partie s'emploie à définir la présence des *E. coli* pathogènes dans les matières fécales d'origine bovine, et enfin la quatrième partie s'emploie à définir antibiorésistance chez *E. coli*.

Dans le but de comparer les caractéristiques des souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine et humaine, un travail similaire serait réalisé sur des prélèvements de selles diarrhéiques d'enfants de moins de deux ans .

CHAPITRE 1

GÉNÉRALITÉS

1.1. Historique :

Escherichia coli a été découvert en 1885 par Theodor Escherich (1857-1911), à partir de selles de nourrisson, qu'il nomma tout d'abord *Bacterium coli commune*. Ce n'est qu'en 1919 que le nom de *Escherichia coli* (*E. coli*) est réellement retenu en hommage aux travaux de Theodor Escherich [1].

E. coli appartient à la flore bactérienne normale du système digestif de l'homme et de la plupart des animaux [2]. Il colonise de façon asymptomatique le tractus digestif des nouveau-nés dès les premières heures de la naissance et constitue ainsi l'espèce bactérienne dominante de la microflore aéro/anaérobie facultative de l'intestin [3]. Cependant, en 1885, *E. coli* est soupçonné, par Escherich, d'être impliqué dans l'apparition d'entérites. En 1945, Bray démontre que certaines épidémies de diarrhées chez les enfants ont pour origine des souches d'*E. coli*. En 1947, Kauffmann met au point un système de sérotypage qui permet de distinguer les différentes souches d'*E. coli*, dont les pathogènes responsables d'entérites, grâce à leurs antigènes de surface [4].

1.2. Définition :

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, appartenant à la classe des protéobactéries. En plus de l'espèce *E. coli*, il existe au sein du genre *Escherichia* cinq autres espèces : *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier [5].

Escherichia coli est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvu d'oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie mobile, ou immobile, avec une structure flagellaire pérित्रiche et non sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). *E. coli* est capable de fermenter le

lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la D-glucuronidase (D-Glu). La majorité des souches fermentent le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157:H7 qui ne fermente pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre et qui sont dépourvus de l'activité D-Glu. Ces caractéristiques particulières sont utilisées pour sa recherche et son isolement dans l'environnement et l'alimentation [6] [7].

E. coli comprend, à la fois, des souches commensales du tube digestif, des souches pathogènes et des souches adaptées à l'environnement [2].

1.3. Habitat :

Escherichia coli fait partie de la microflore commensale de l'Homme et de nombreux animaux. Il s'agit d'une bactérie qui colonise le tube digestif des animaux à sang chaud (tels que les carnivores, les omnivores, les herbivores et les oiseaux), ainsi que des reptiles. Son habitat principal est le tractus digestif. Elle se trouve principalement dans le colon et le caecum, où elle se développe plus particulièrement dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales avec des concentrations d'environ 10^6 UFC (Unité Formant Colonie) par g de contenu intestinal [8], [9].

CHAPITRE 2

CLASSIFICATION D'*E. COLI*

2.1. Notion de classification :

Malgré la diversité des génomes d'*E. coli* et les nombreuses variations dues aux événements d'acquisition et de délétion de gènes, plusieurs approches moléculaires ont permis le développement d'une signature génétique permettant la classification des espèces d'*E. coli* indépendamment des concepts d'*E. coli* commensal et pathogène.

2.1.1 Classification selon le sérotype :

E. coli possède trois antigènes majeurs. L'antigène O (Ag O) est de nature lipopolysaccharidique, thermostable, localisé au niveau de la paroi bactérienne. Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le cluster de gènes *rfb*. L'antigène flagellaire H (AgH) est un composant protéique, présent dans les formes mobiles, et entre dans la composition du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. Il est généralement codé par le gène *fliC*. L'antigène capsulaire K (Ag K) est de nature polysaccharidique, thermolabile. Il inhibe l'agglutination de O lorsqu'il est présent, il est détruit par ébullition.

La classification des *E. coli* par sérotypage repose sur la méthode décrite par Kauffmann en 1947, qui associe ces trois antigènes [10]. La méthode de typage par agglutination sur lame, à l'aide d'immuns sérums spécifiques, est un moyen rapide mais non exhaustif de typer les souches. La détection par biologie moléculaire des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AgO (*wzx* et *wzy*) et du gène *fliC* pour l'AgH est un autre moyen d'identifier le sérotype des souches. Selon ce schéma de classification, il existerait plus de 180 sérogroupes O, 80 sérogroupes K et 56 sérogroupes H [11], [12].

2.1.2. Classification selon les phylogroupes :

Le phylogroupe d'*Escherichia coli* est une classification basée sur l'analyse phylogénétique des génomes de différentes souches de cette bactérie. Cette classification permet de regrouper les souches en fonction de leur parenté génétique et de leur évolution. L'identification des phylogroupes est réalisée en analysant les

séquences de gènes marqueurs, ainsi que d'autres séquences d'ADN chromosomique.

Les premières études sur la diversité génétique d'*E. coli* se concentrent principalement sur des méthodes telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et la multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) pour différencier les souches. En 1984, les travaux d'Ochman et Selander ont permis de répartir les souches d'*E. coli* en quatre grands groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D). Cependant, ces méthodes ne permettent pas une résolution fine de la diversité génétique [13]. Clermont et al. (2000) publient leurs travaux qui proposent une nouvelle méthode, simple et rapide, basée sur l'analyse de séquences de sept gènes marqueurs (housekeeping genes) (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) pour classer les souches d'*E. coli* en quatre phylogroupes (A, B2, B1, D) [14]. Cette classification ne cesse de s'améliorer avec l'apparition de nouveaux phylogroupes (C, E, F) et des sous-phylogroupes (A0, A1, B22, B23, D1, D2) [15] et de clades ou branches (clades I à V) [14], [16], [17]. [16], [17].

La prévalence et la répartition des *E. coli* appartenant aux phylogroupes principaux A, B1, B2 et D chez les mammifères est conditionnée par les caractéristiques de l'hôte (alimentation, morphologie du tube digestif et masse corporelle) et par les facteurs environnementaux (climat et géo-localisation) [2].

Les phylogroupes A et B1 sont souvent associés à des souches commensales ou non pathogènes d'*E. coli*. Ils sont fréquemment retrouvés dans le tractus gastro-intestinal des mammifères, y compris des humains [18].

Les phylogroupes B2, D et F sont généralement associés à des souches pathogènes ou potentiellement pathogènes d'*E. coli*. Ces phylogroupes sont souvent impliqués dans des infections chez l'Homme et l'animal, telles que les infections urinaires, les infections intestinales sévères et d'autres maladies [19], [20].

Les phylogroupes C et E sont moins bien caractérisés, mais ils comprennent également des souches potentiellement pathogènes dans certains cas [21], [22].

2.1.3. Classification selon les pathotypes :

La classification pathotype (ou pathovar) est une méthode de classification des *Escherichia coli* basée sur leurs facteurs de virulence, sur les maladies qu'ils causent et leurs implications dans des épidémies ou de graves complications [23], [24].

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont divisées en deux groupes principaux regroupant les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), responsables d'infections urinaires et de méningites chez le nouveau-né, ou de septicémies, et les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies intestinales [2], [23], [25], [26]. Des *E. coli* pathogènes sont identifiés par des caractéristiques phénotypiques, des facteurs de virulence et par les maladies qu'ils causent. [23], [24].

Les *E. coli* pathogènes intestinaux sont divisés en différents types pathogènes appelés « pathotypes » : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéroagrégatifs (EAagg ou EAEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). L'acquisition, la délétion ou l'inactivation de certains éléments génétiques mobiles (transposon, phage, plasmide) peuvent être à l'origine de la pathogénicité d'*E. coli*. Par exemple, les STEC sont des *E. coli* qui ont acquis, grâce à un bactériophage, des gènes codant pour une toxine (la shigatoxine) [27].

E. coli est une espèce bactérienne avec un génome présentant une forte plasticité conduisant à l'apparition de nouveaux pathotypes. En Allemagne, une souche hybride STEC et EAEC a été isolée chez des patients en 2011 [28]. L'importante épidémie en Allemagne a touché 3816 personnes, dont 845 patients qui ont développé un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) et a causé 54 décès [28]. Cette souche a été identifiée comme étant un *E. coli* de sérotype O104 :H4, possédant les gènes caractéristiques des EAEC (gènes *aggA*, *aggR*, *pic* et *aap*) et celui codant pour la shigatoxine de type 2 typique des STEC (gène *stx2*), faisant apparaître un nouveau pathotype dénommé *E. coli* entéroagrégant-hémorragique, EAHEC [29]. D'autres souches d'*E. coli* hybrides ont été recensées ; une souche d'*E. coli* possédant à la fois des caractéristiques des *E. coli* aEPEC et des ExPEC et des aEPEC (hybride aEPEC et ExPEC) [30]. Des souches hybrides (STEC et ETEC) possédant à la fois les gènes codant la Shigatoxine des STEC et une toxine ST (*heat-stable toxin*) caractéristique des ETEC [31], [32].

CHAPITRE 3

ESCHERICHIA COLI PATHOGENES

3.1. *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) :

Les *E. coli* producteurs de shigatoxines sont des souches pathogènes d'*E. coli* qui produisent des toxines de type Shiga, *Shiga-like toxin* ou shigatoxines (Stx). IL existe deux principaux types de shigatoxines, Stx type 1 et Stx type 2, ainsi que divers sous-types et variantes : les Stx1 très proches de la shigatoxine produite par *Shigella dysenteriae* sérotype 1 et les Stx2 qui présentent moins de 60 % d'homologie avec la séquence en acides aminés des Stx1 [33], [34]. Une partie des STEC sont capables de produire des lésions A/E lorsque l'îlot de pathogénicité LEE est présent et de former un piédestal de la même façon que les EPEC [35]

3.2. *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) :

Les *E. coli* entéropathogènes sont caractérisés par une adhésion spécifique entre la cellule bactérienne et la surface de l'entérocyte. Ils sont regroupés sous le terme d'AEEC pour *Attaching and Effacing E. coli*, quels que soient les signes cliniques associés. D'un point de vue histopathologique, les symptômes liés aux infections dues aux AEEC sont associés à des lésions caractéristiques des cellules de la muqueuse intestinale. Ces lésions sont engendrées par le mécanisme d'attachement et d'effacement (A/E) caractérisé par une adhésion intime des bactéries aux entérocytes et à l'effacement des microvillosités intestinales [12].

Les *E. coli* entéropathogènes produisant des lésions histopathologiques caractéristiques au niveau des microvillosités, appelées attachement et effacement (A/E), et ne produisant pas de Shigatoxines, peuvent être appelées EPEC [12]. Le gène nécessaire pour médier l'A/E a été identifié et nommé *eae*. Le gène *eae* code pour une protéine appelée intimine. Il est nécessaire pour la pleine virulence de l'EPEC, mais n'est pas le seul facteur de virulence de l'EPEC [12]. De plus, la production du facteur d'adhérence EPEC (EAF) est souvent associée à l'EPEC, mais elle ne se produit que dans certains sérovars d'EPEC.

Au sein des EPEC, il existe deux sous-groupes ; d'une part, les EPEC dits typiques (**tEPEC**) possédant les *pili* BFP permettent l'adhésion initiale aux entérocytes, d'autre part, les EPEC dits atypiques (**aEPEC**) qui ne possèdent pas ce plasmide EAF. Les aEPEC peuvent disposer d'autres facteurs responsables de cette préadhésion tels que les facteurs LAL (*localized adherence-like*) [36], DA (*diffuse-adherence*) ou AA (*aggregative adherence*) [37].

Les EPECa peuvent provoquer à la fois des maladies aiguës et des diarrhées sanglantes persistantes. Les souches EPECt sont fortement associées à une diarrhée sécrétoire abondante avec mucus et à des pertes importantes d'eau et d'électrolytes. Bien que l'aEPEC puisse être trouvée chez les humains et les animaux, le réservoir de la EPECt est humain [38], [39].

Les EPEC sont le plus souvent associés à des épidémies de diarrhées dans les pays en voie de développement et à des cas sporadiques dans les pays développés [38]. Douze sérogroupes O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 et O158 ont été reconnus par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme étant le plus souvent associés aux EPEC responsables de diarrhées chez l'Homme [40].

3.3. *Escherichia coli* entérohémorragiques :

Toutes les souches de STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme ; un sous-groupe spécifique, connu sous le nom d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC), est associé aux infections humaines les plus sévères [41]. Les EHEC, un des pathovars intestinaux de l'espèce *E. coli*. Sur la base des signes cliniques observés chez les malades, les souches d'*E. coli* pathogènes sont regroupées en pathovars, parmi lesquels les EHEC [42].

Les souches d'*E. coli* pathogènes (EHEC) sont capables de se multiplier, de persister dans le tractus digestif en contournant les défenses immunitaires de l'hôte et d'induire des dommages cellulaires. Ces souches ont développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés, pouvant être accompagnés de complications extra-digestives [43], [44].

Le pathovar EHEC est responsable de troubles variés allant de la diarrhée aqueuse bénigne à la colite hémorragique pouvant évoluer vers un SHU chez l'enfant

ou une microangiopathie thrombotique (MAT) chez l'adulte. Il est distinct du pathovar EPEC (pour Enteropathogenic *E. coli*), qui est responsable de diarrhées sévères, principalement chez les enfants de moins de 12 mois dans les pays en voie de développement.

La plupart des souches EHEC ont la possibilité de provoquer des lésions dites « d'attachement et d'effacement » (A/E) des cellules de la muqueuse de l'iléon distal et du côlon, notamment par l'intermédiaire d'une protéine de membrane, l'intimine. Ces souches sont appelées EHEC « typiques ».

Les EHEC typiques (**tEHEC**) représentent le groupe des STEC Stx-LEE-positifs, ayant la capacité à la fois de produire des lésions A/E et d'induire des lésions au niveau de l'endothélium vasculaire intestinal, rénal et cérébral de l'Homme, sous l'action des Shiga-toxines. Le LEE joue un rôle important dans la colonisation et la destruction de la muqueuse intestinale par l'intermédiaire du gène *eae* [45].

Les souches EHEC dépourvues de LEE sont dites atypiques (**aEHEC**). Les souches aEHEC utilisent d'autres moyens d'adhérer à la membrane des entérocytes par intermédiaire de facteurs tels que : Iha (IrgA homologue adhesin) [46], Lpf (long polar fimbriae) [47], Saa (STEC autoagglutinating adhesine) [42].

Plus de 400 sérotypes différents appartenant au pathovar des EHEC ont été isolés chez l'Homme et les animaux, mais seul un petit nombre de sérotypes majeurs est réellement lié à des pathologies humaines. Les plus connus font partie des sérotypotypes A, B et C, soit les O26, O157, O111, O103, O145 [43], [44]. Le sérotype le plus incriminé dans les infections à EHEC est le sérotype O157 :H7 [48].

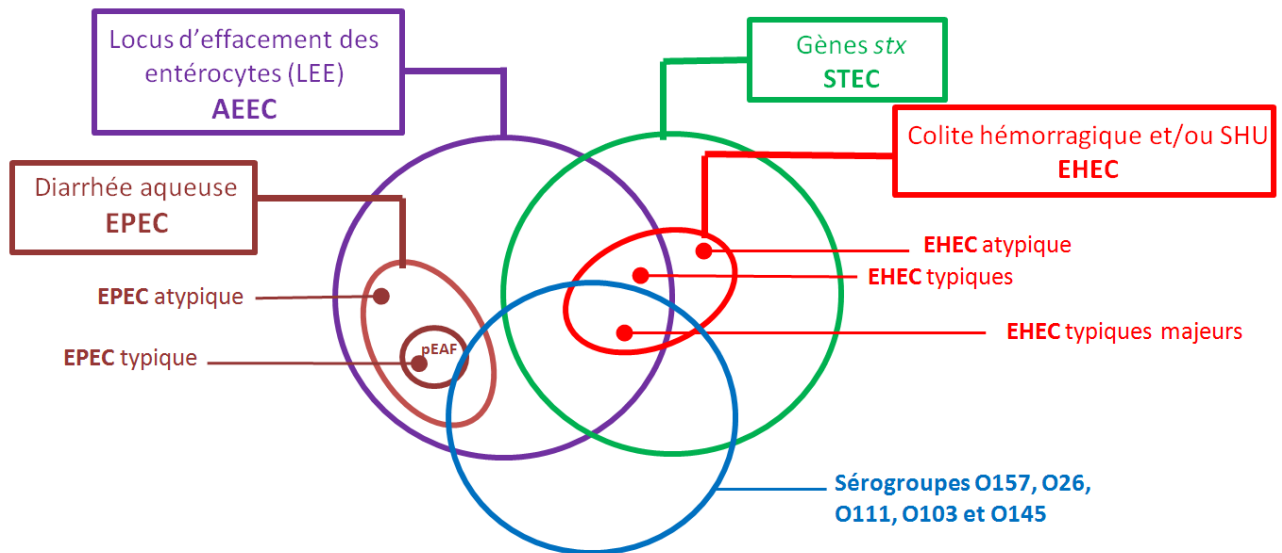


Figure 1 : Système de classification des AEEC/tEPEC/aEPEC/STEC/EHEC humaines à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d'*E. coli*. EPEC : enteropathogenic *E. coli*. EHEC : entérohémorragique *E. coli*. STEC : shigatoxin-producing *E. coli*. [49]

Pour mieux comprendre la relation existante entre les STEC et les EPEC, la figure 1 propose un système de classification où :

- toutes les souches possédant 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 ;
- Toutes les EHEC sont des STEC, mais toutes les souches STEC ne sont pas responsables de pathologies humaines.
- Les EHEC qui possèdent le LEE sont dénommés EHEC typiques et les EHEC-LEE négatifs sont dénommés EHEC atypiques.
- Les souches EHEC typiques majeures, les plus souvent associées à des signes cliniques graves et aux épidémies, appartiennent aux sérogroupe O157, O26, O103, O111 et O145.

CHAPITRE 4

PATHOLOGIE ET FACTEURS DE VIRULENCE

4.1. Symptômes liés aux infections par des EHEC ou STEC :

- **Chez l'Homme**

Les EHEC ou STEC sont associés à des colites hémorragiques et/ou à un syndrome hémolytique et urémique. Les cas sévères sont observés chez les enfants et les personnes immunodéprimées. Les sérotypes O157 et non-O157 provoquent les mêmes symptômes, mais avec des niveaux de gravité variables, rappelant la classification en séropathotype proposée par Karmali *et al.*, (2003). Le premier symptôme de la maladie est une diarrhée non sanglante qui peut être accompagnée de fièvre, de crampes abdominales ou de vomissements. Dans la majorité des cas, les diarrhées deviennent sanglantes entre un et cinq jours suivant la première diarrhée. Les complications observées peuvent se manifester sous la forme d'un SHU (syndrome hémolytique et urémique) dans environ 15 % des cas, surtout chez les enfants. Le SHU est défini par l'association d'une anémie hémolytique microangiopathique avec présence d'hématies fragmentées (schizocytes), d'une thrombopénie et d'une insuffisance rénale aiguë. Il correspond à des lésions de type microangiopathie thrombotique (MAT), touchant les reins et éventuellement d'autres viscères, caractérisées par un épaississement des parois des capillaires glomérulaires et/ou des artéioles et par la présence de micro-agrégats plaquettaires dans les capillaires et les artéioles. Le SHU est la principale cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Il peut entraîner la mort dans moins de 5 % des cas. Chez l'adulte, il se traduit par un Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) caractérisé par des lésions thrombotiques microvasculaires généralisées [50].

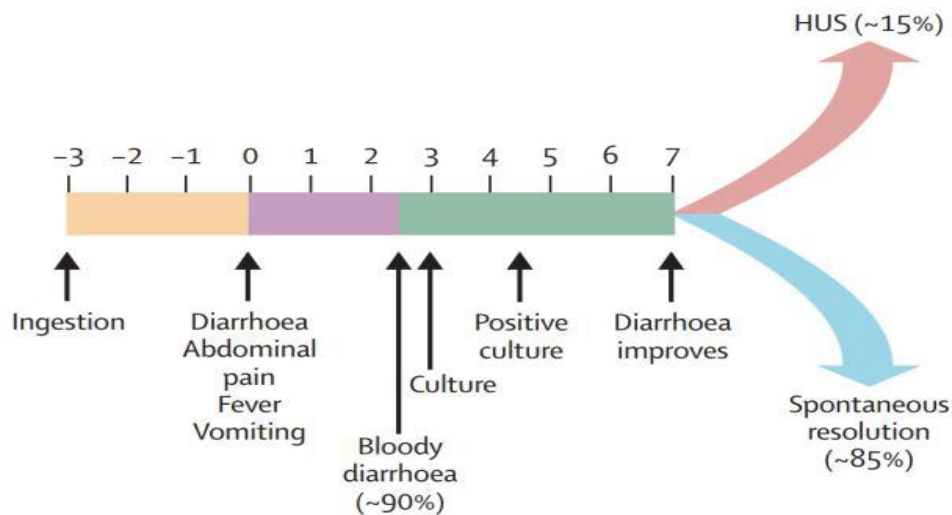


Figure 2: Evolution d'une infection à O157 :H7 chez un enfant [34].

L'essentiel des signes cliniques est lié à la production des shigatoxines. Après ingestion, les STEC doivent résister à l'acidité de l'estomac [51]. Une étape de colonisation du tube digestif est nécessaire (la plupart des souches STEC, en particulier celles de sérotype O157 :H7, sont capables de produire les lésions A/E). En dehors de la voie du LEE, d'autres mécanismes de colonisation ont été décrits, tels que Iha, Lpf et Saa [42], [46], [47]. Les toxines produites par les bactéries doivent ensuite traverser l'épithélium intestinal, avant de rejoindre le système circulatoire et d'atteindre les récepteurs spécifiques glycolipidiques localisés à la surface des cellules endothéliales, présentes principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral. Les Shiga-toxines entraînent ensuite la mort des cellules cibles par arrêt de la synthèse protéique (Figure 2).

- **Chez les animaux**

Les STEC sont responsables de diarrhées chez les veaux [52]. L'absence de récepteur pour les Shiga-toxines chez les bovins adultes pourrait expliquer que les ruminants ne développent pas de toxémie ou de dommage vasculaire systémique [53]. Chez les ovins et caprins, les STEC touchent préférentiellement les animaux jeunes en causant de fortes diarrhées chez les agneaux et les chevreaux [54], [55]. La volaille

est également touchée par des diarrhées à STEC [56]. Enfin, les animaux domestiques tels que les chiens peuvent également être sujets aux diarrhées [57].

Les STEC sont également responsables d'infection chez le porc. Ils peuvent causer la maladie de l'œdème chez les porcs en post-sevrage et les jeunes porcs par la capacité de certains STEC à se fixer sur des récepteurs glycolipidiques présents chez le porc [58].

4.2. Facteurs de virulence :

4.2.1. Shigatoxines :

4.2.1.1. Définition des shigatoxines :

Le terme shigatoxine a tout d'abord été utilisé pour identifier les toxines produites par *Shigella dysenteriae* de type 1, donnant naissance au terme *Shiga-like toxin*, ou shigatoxine, quand celles-ci ont été identifiées chez *E. coli*. Ce terme a remplacé celui de « vérotoxine » utilisé pour caractériser les toxines lysant les cellules Vero (cellules épithéliales de rein extraites de singe) chez *E. coli* [59].

Ces toxines sont principalement produites par *S. dysenteriae* sérotype 1 (Stx1), mais également par certains *E. coli* et sporadiquement par *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Shigella flexneri* [60].

Il existe deux types de shigatoxines : la shigatoxine de type 1, codée par le gène *stx1*, et la Shigatoxine de type 2, codée par le gène *stx2*. Alors que la shigatoxine Stx1 est neutralisée par des anticorps anti-shigatoxine de *S. dysenteriae* sérotype 1, la shigatoxine Stx2 ne l'est pas [61]. Les gènes *stx1* et *stx2* possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie avec la Stx1 de *S. dysenteriae* [62]. Ceci s'explique par le fait que les deux toxines ne partagent respectivement que 55 % et 57 % d'identité pour les sous-unités protéiques A et B qui les composent. En revanche, leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires.

4.2.1.2. Structure de la shigatoxine :

Chez *E. coli*, la shigatoxine est codée par deux gènes *stx* (*stxA* et *stxB*), présents sur un prophage lambdoïde (*stx-converting bacteriophage* ou *stx-phage*) qui est un élément génétique mobile [60].

L'opéron codant la shigatoxine a une structure commune constituée d'une seule unité transcriptionnelle qui code les sous-unités A et B. Les toxines produites sont des hétéropolymères de 70 kDas composés d'une sous-unité A (Activité toxique) de 33 kDa et de 5 sous-unités B (Binding) de 7,7 kDa. La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase sur une adénosine de l'ARN ribosomique 28S et la sous-unité B a un rôle important au niveau du degré de toxicité de la toxine, car elle conditionne le niveau de compatibilité de la toxine avec le récepteur cible [59]. Figure 3.

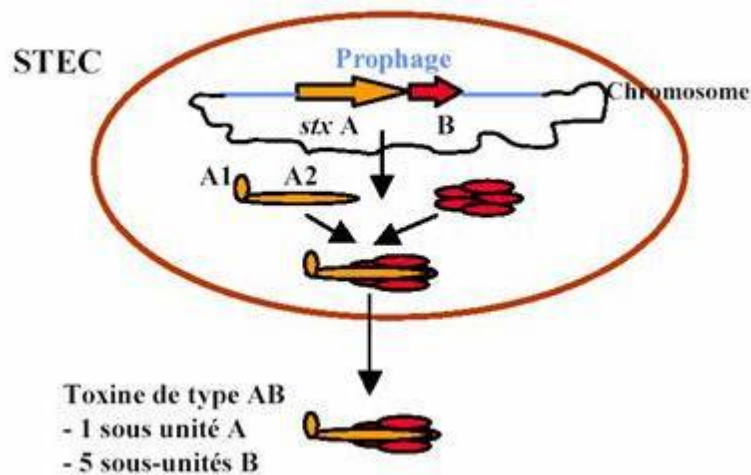


Figure 3 : Structure de l'opéron codant les shigatoxines [63]

4.2.1.3. Mécanisme d'action des shigatoxines :

Le mécanisme au niveau des cellules cibles commence tout d'abord par la fixation des shigatoxines à la membrane cytoplasmique de la cellule : les sous-unités B se lient au récepteur glycolipidique : globotriaosylcéramide (Gb3) chez l'Homme, présent au niveau du tube digestif, des reins et du système nerveux central, ou globotetraosylcéramide (Gb4) chez le porc [64].

Une fois la shigatoxine internalisée par le mécanisme classique d'endocytose, elle subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous-unité A de la shigatoxine est alors libérée des sous-unités B et clivée en deux parties A1 et A2 par réduction des ponts disulfures. La partie A1 ainsi clivée est transloquée dans le cytoplasme jusqu'à sa cible, la sous-unité 60S du ribosome, où elle exerce son activité en bloquant la synthèse protéique. Ceci conduit à l'arrêt de la synthèse protéique et à la mort de la cellule [59].

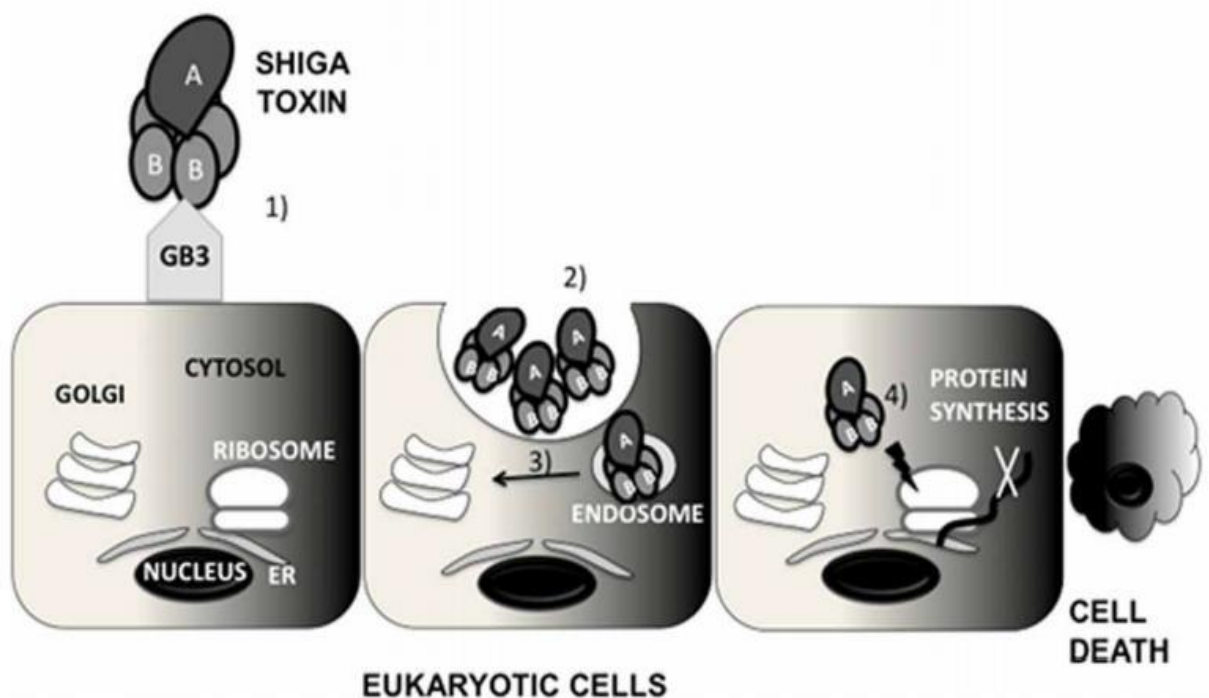


Figure 4 : Mécanisme d'action des shigatoxines. 1) Fixation, 2) Internalisation, 3) Transport rétrograde, 4) Clivage et Action d'après [65]

La toxine Stx2 est la plus répandue parmi les STEC et est considérée comme la plus toxique. On peut détecter la présence concomitante de plusieurs toxines chez une même bactérie avec la présence des gènes codant les shigatoxines 1 et 2 (*stx1*, *stx2*) ou la présence de plusieurs variants du gène *stx* [66] [67]. La présence de plusieurs toxines influence le pouvoir pathogène des souches ; une étude montre

qu'une souche exprimant une seule toxine est plus pathogène qu'une souche exprimant plusieurs toxines [68].

4.2.1.4. Variants des gènes *stx* :

De nombreux variants ont été identifiés au niveau des gènes codant pour les shigatoxines : trois variants pour le gène *stx1* (*stx1a*, *stx1c* et *stx1d*) et sept variants pour le gène *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*) [69]. Le type de variant peut refléter à la fois l'origine d'une souche, sa phylogénie, mais aussi son pouvoir pathogène [70], [71], [72].

Ainsi, chez l'Homme, les variants associés aux pathologies sévères sont les variants *stx2a*, *stx2c* et *stx2d*, tandis que les variants *stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2b*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g* sont associés à de faibles diarrhées. Les variants *stx1c*, *stx2b*, *stx2e* et *stx2f* sont plus particulièrement associés à des souches isolées chez les moutons, les bovins, les porcs et les pigeons, respectivement. Les variants ont tous été détectés dans des souches isolées de produits frais de type légumes et d'aliments d'origine animale.

4.2.1.5. Bactériophage *stx* :

Les gènes codant les shigatoxines ont la particularité d'être portés par un bactériophage (Figure 5) tempéré capable d'alterner entre une phase lysogénique et une phase lytique. Le bactériophage *stx* en phase lysogénique infecte une bactérie et intègre son génome au sein du chromosome bactérien. Ce matériel génétique ainsi intégré prend le nom de prophage et est le plus souvent « dormant » en raison d'une répression de la transcription des gènes nécessaires au cycle lytique. Sous différentes conditions, le bactériophage *stx* peut entrer en phase lytique avec une activation de la transcription des gènes correspondants, sous l'influence d'un élément déclencheur (exposition aux UV, antibiothérapie, traitement alimentaire) conduisant à la production de dizaines, voire de centaines, de phages au sein de la bactérie qui finira par littéralement exploser, libérant ainsi les nouveaux phages qui pourront infecter d'autres bactéries.

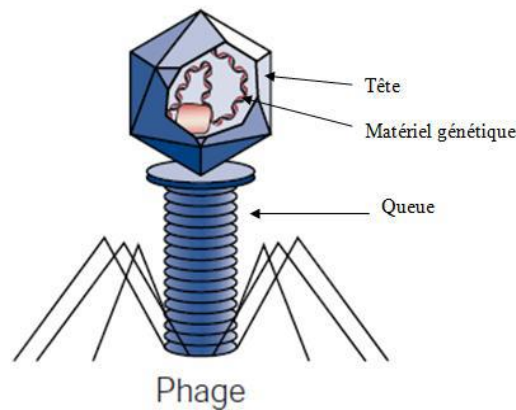


Figure 5 : Représentation schématique d'un bactériophage *stx* dans sa configuration tête-queue [73].

Les bactériophages *stx* sont impliqués dans le transfert horizontal des gènes *stx* (transfert du matériel génétique du phage dans le génome bactérien) chez *E. coli* [74], et ceci de manière aléatoire, participant ainsi à l'émergence de nouvelles souches STEC [75]. Le bactériophage est un élément instable à l'intérieur de la bactérie. Il peut être perdu au cours d'une infection ou de cultures successives comme cela a été observé chez le sérotype O157 :H7 [76] et le sérotype O26 [77].

Les bactériophages *stx* sont retrouvés libres chez l'Homme [78], et dans l'environnement ; dans les fèces animales [79], dans les effluents d'origine humaine et animale (bovin, porc, volaille) [80],[81], [79] dans les rivières [82], [82] et dans les aliments (viandes et salade) [77].

Les concentrations en bactériophages *stx* peuvent varier entre 1 et 9 log10 copies de gène/ml dans les effluents d'origine humaine et animale [80], et sont souvent plus importantes que les concentrations en *E. coli* qui peuvent varier entre 4 et 5 log10 UFC/ml dans les effluents [83].

Les bactériophages persistent plus longtemps que les bactéries ; ils sont stables à 4, 22 et 37°C et à pH 7 et 9 pendant un mois, tandis que les populations de STEC déclinent rapidement dans ces mêmes conditions [83].

Les bactériophages portant les gènes *stx2* sont plus souvent détectés que les bactériophages portant les gènes *stx1* dans l'environnement.[75], [84]

4.2.2. Locus of enterocyte effacement (LEE) :

Le *locus of enterocyte effacement* ou LEE contient les gènes codants suivants :

- 1) l'intimine (gène *eae* : *E. coli attaching and effacing*),
- 2) un système de sécrétion de type III (SSTT),
- 3) des protéines sécrétées de type Esp (*E. coli secreted protein*),
- 4) des protéines Esc (*E. coli secretion*) qui participent à la structure et au fonctionnement de la seringue moléculaire du SSTT et
- 5) un récepteur de translocation de l'intimine nommé Tir (*Tyrosine phosphorylated protein*) [85]

Il regroupe les gènes responsables des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) générées par les bactéries pour s'implanter au niveau des cellules du tube digestif. Cinq régions distinctes sont classiquement décrites : la région 5' qui regroupe les opérons LEE 1, 2 et 3 qui codent plusieurs protéines de régulation (Ler, GrIR et GrIA) et de structure du SSTT, la région centrale qui comprend le LEE5 qui code l'intimine et son récepteur Tir et la région 3' qui se compose du LEE4 et code d'autres effecteurs bactériens et d'autres protéines de structures impliquées dans la translocation (EspA, B et D) [86].

L'intimine est une protéine de la membrane externe de la bactérie nécessaire à l'adhésion intime entre la bactérie et l'entérocyte. C'est un facteur de virulence essentiel pour les souches EPEC. Dix-sept variants et huit sous-variants du gène *eae* ont été identifiés : alpha (α 1, α 2), bêta (β 1, β 2, β 3), gamma (γ 1, γ 2), delta (δ), épsilon (ϵ 1, ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4), zéta (ζ), éta (η 1, η 2), théta (θ), iota (ι 1, ι 2), kappa (κ), lambda (λ), mu (μ), nu (ν), xi (ξ), omicron ($\omicron$), pi (π) et rho (ρ) [87].

Pour les autres gènes du LEE les plus impliqués dans l'adhésion, il existe également quatre variants pour le gène *tir* (α 1, β 1, β 2 et γ 1), quatre pour le gène *espA* (α 1, β 1, β 2 et γ 1), trois pour le gène *espB* (α 1, β 1 et γ 1) et trois pour le gène *espD* (α 1, β 1 et γ 1). Plusieurs combinaisons différentes entre ces gènes ont été mises en évidence et sont utilisées pour classer les souches [85].

Des études menées *in vivo* et *in vitro* mettent en évidence une colonisation du tube digestif géographiquement différente (côlon ou intestin grêle) selon le type de

variant ; on parle de tropisme cellulaire ou de spécificité d'hôte [88], [89], [90]. Par exemple, une souche O157 :H7 exprimant l'intimine γ s'associe préférentiellement aux cellules épithéliales du côlon[89]. Le typage des variants et sous-variants *eae* permet de différencier les souches entre elles.

Les variants β et γ sont les plus rencontrés dans des souches isolées de cas cliniques, avec une association préférentielle pour les EHEC typiques majeurs [91], [92], [93], [94] :

- du sous-variant $\gamma 1$ avec les sérotypes O157 :H7 et O145 :H28
- du sous-variant $\beta 1$ avec le sérotype O26 :H11
- du sous-variant θ avec le sérotype O111 :H8
- du sous-variant ϵ avec le sérotype O103 :H2

Les variants et sous-variants $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ et θ du gène *eae* sont le plus souvent associés à des souches isolées d'animaux d'élevage (bovins, ovins et porcs) et d'effluents d'origine humaine et animale, tandis que les variants α , ι , κ , ζ , η , ϕ et ρ le semblent beaucoup moins.

La seule détection des gènes caractérisant les STEC et EHEC (*stx1*, *stx2* et *eae*) et les EPEC (*eae* et *bfpA*) ne suffit pas à définir le potentiel de virulence réel des souches du fait de l'intervention d'autres facteurs de virulence [48]. Le séquençage total du génome d'*E. coli* STEC O157 :H7 EDL933 a montré la présence d'îlots de pathogénicité composés de différents gènes de virulence. Les gènes présents sur ces îlots se composent essentiellement de gènes *nle*, de gènes codant des adhésines, des toxines ou des mécanismes impliqués dans la résistance des souches aux agressions extérieures.

Des études se sont intéressées à l'association entre la présence de certains îlots OI et le pouvoir pathogène des souches [95]. Notamment en 2006, Wickham *et al.* [96], ont associé la présence de l'OI-122 à des souches responsables de SHU et d'épidémies. Coombes *et al.*, en 2008 [97], ont mis en évidence que les gènes présents sur les OI-122, OI-57 et OI-71 étaient fortement détectés chez des souches STEC responsables de SHU et d'épidémies.

Les gènes localisés préférentiellement sur les OI-122, OI-43-47, OI-57, OI-71 sont le plus souvent associés à des cas cliniques graves [97], [98], [99]. Le développement de méthodes miniaturisées dédiées à l'évaluation rapide du pouvoir pathogène des souches (puce à ADN) est en pleine expansion. La détection combinée des gènes *stx*, *eae* et d'une série de gènes *nle* permet donc de produire une sorte de signature de virulence utilisée pour identifier les souches potentiellement hautement pathogènes pour l'Homme, pour différencier par exemple les souches EHEC des STEC et des EPEC [98], [100].

4.2.3. Autres gènes de virulence :

4.2.3.1. Gènes impliqués dans l'adhésion :

L'émergence d'infections humaines liées aux STEC LEE-négatifs montre que la présence de cet îlot de pathogénicité n'est pas le seul responsable de l'adhérence des bactéries. Cela indique la présence d'autres facteurs de virulence, portés par d'autres îlots de pathogénicité ou d'autres plasmides, en rapport avec cette étape qui est indispensable au développement de la virulence des souches [101].

Plusieurs études montrent que les souches de sérogroupes O157 et non-O157 expriment une grande variété d'éléments de type *fimbriae* et non-*fimbriae*. Ces éléments jouent un rôle important dans l'adhésion des bactéries au niveau du tube digestif et dans la persistance des souches au niveau des réservoirs que constituent les ruminants [102].

Parmi cette famille de gènes, on trouve les gènes *efa1*, *lifA* et *toxB* codant des protéines homologues impliquées dans la formation de lésions A/E qui permettent l'adhésion des EPEC et des STEC aux cellules épithéliales [103]. L'hôte est capable de produire des anticorps pour neutraliser ces adhésines qui sont exprimées pendant la phase infectieuse [104].

Les gènes des *long polar adhesin* (Lpf) sont présents chez les STEC O157 :H7 et sont situés sur deux régions chromosomiques OI-141 et OI-154 (OI : genomic O island) [47]. Les Lpf sont présents chez de nombreuses souches d'*E. coli*. Si leur rôle

dans l'adhésion des souches STEC est avéré, il n'est cependant pas clairement défini chez les EPEC [105].

Le gène *saa* (*STEC autoagglutinating adhesin*) code une adhésine non fimbriale auto-agglutinante. Elle a été mise en évidence chez des souches LEE-négatives responsables d'infections humaines et animales et isolées de l'environnement [106], [107], [92], [108]. Cette adhésine est responsable de l'adhésion semi-localisée des bactéries [109].

Le gène *iha* (*IrgA homologue adhesin*) code une protéine très proche de la protéine IrgA (*Iron-regulated gene homologue A*) produite chez *Vibrio cholerae*. Elle joue un rôle dans l'acquisition du fer par la bactérie en lien étroit avec l'adhésion des souches LEE-négatives, mais aussi LEE-positives. Cette protéine contribue à la virulence des souches en favorisant leur fixation [110]. Le gène *iha* semble être le gène de virulence en lien avec l'adhésion le plus communément détecté dans un panel de 75 souches STEC isolées à partir d'aliments et d'eaux de boisson [111].

Le gène *stcE* code une protéase qui joue un rôle de métalloprotéase et de mucinase. Cette enzyme est impliquée dans l'adhésion intime de certains O157 :H7 aux cellules de l'hôte par un clivage de glycoprotéines cellulaires [112].

D'autres gènes codant des adhésines sont responsables de l'adhésion diffuse ou intime de certains STEC pathogènes chez le porc, comme les gènes F6, F18, F41 ou les gènes *orfA/orfB* (*open reading frames*) [113], [114]. Le gène *paa* (*porcine attaching and effacing associated factor*) est également impliqué dans l'adhésion de souches STEC isolées chez le porc [115].

Comme beaucoup d'autres gènes de virulence impliqués dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte, ces facteurs sont plus ou moins détectés chez des souches EHEC, STEC et EPEC isolées de cas cliniques humains ou d'infections animales [101] [93][116]. Tous ces gènes ont également été détectés dans des souches isolées à partir d'aliments ou de l'environnement, témoignant du pouvoir effectif d'adhésion de certaines souches LEE-négatives isolées de l'habitat secondaire [117], [118].

4.2.3.2. Des gènes codant pour des toxines :

Outre la production des shigatoxines, les STEC peuvent produire des hémolysines ou d'autres toxines [101], [93]. Également rencontrés chez certaines souches EPEC [94], [119], [120]. Ces facteurs de virulence ont des effets cytotoxiques sur les cellules épithéliales. Ces toxines et ces hémolysines sont capables de lyser les cellules du système immunitaire et peuvent être responsables d'acidose et d'hypersécrétion de composants cellulaires par les entérocytes.

Les gènes *cdt* (*cytolethal distending toxin*) codent des toxines qui interviennent au niveau du cycle cellulaire eucaryote en bloquant les cellules en phase G2/M [121]. Ces toxines sont portées par une faible portion des STEC LEE-négatifs, mais ont été détectées dans des souches impliquées dans des infections humaines [122].

Les gènes *ehxA* et *hlyA* codent les hémolysines, enterohémolysine A et α -hémolysine, qui sont impliquées dans la lyse cellulaire des lignées lymphocytaires et érythrocytaires en formant des pores dans la membrane cellulaire [123]. Ces toxines sont détectées chez les souches EPEC et les STEC isolées de cas cliniques graves, d'animaux malades et de l'environnement (eaux usées d'origine humaine et animale) [92], [124].

Le gène *subA* code la cytotoxine subtilase, qui est une toxine homologue à celle produite chez *Bacillus anthracis* [125]. produite chez les STEC en général, cette toxine est responsable de thrombose et de nécrose en agissant via l'arrêt de la synthèse protéique des cellules [101], [117].

4.2.3.3. Des gènes *nle* « effecteurs non codés par le locus LEE » :

Un grand nombre de gènes effecteurs ne faisant pas partie du LEE sont appelés gènes *nle* pour *non LEE-encoded effector*. Ces gènes sont fortement liés à la virulence de souches responsables de lésions A/E [126], [127], [128]. Ces gènes sont impliqués dans diverses fonctions, telles que l'inhibition de la phagocytose, des activités antiapoptotiques, la perturbation des réponses immunitaires innées, l'augmentation de la perméabilité cellulaire, le blocage de la division cellulaire et la perturbation des microtubules du cytosquelette, entre autres [101], [129]. Ces gènes sont pour la plupart codés par des prophages au sein d'îlots de pathogénicité tels que OI-122, OI-71, OI-57 ou OI-36 chez *E. coli*.

4.2.3.4. Gènes impliqués dans la persistance :

Au sein des autres gènes participant à la virulence des souches, on retrouve des gènes impliqués dans la persistance. Le gène *katP* codant une catalase/péroxydase permet aux souches d'*E. coli* de résister au stress oxydatif. Le gène *ureD* est associé à l'expression de l'uréase, qui est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac (source d'énergie) [130]. En remarque, le rôle de l'uréase dans la virulence des souches du genre *Proteus* et *Klebsiella* a récemment été identifié ; elle agirait comme un élément protégeant la bactérie du système immunitaire de l'hôte en bloquant la phagocytose et créant des lésions cellulaires (action de l'ion ammonium) [131].

Le gène *pagC* code pour une protéine (*pagC-like membrane protein/phP-activated gene C*) homologue de celle produite par *Salmonella enterica* impliquée dans la résistance des souches à l'action des macrophages [132].

Dans ce groupe de gènes impliqués dans la persistance, on trouve également *terE*, qui code pour une enzyme capable de dégrader les tellurites en tellures, permettant ainsi à certains *E. coli* comme l'O157 :H7 de se développer sur des milieux enrichis en tellurites (exemple : le milieu MacConkey sélectif) [133].

Le gène *ecf1* (*E. coli attaching and effacing gene-positive conserved fragment 1*) fait partie d'un opéron codant une hydrolase qui améliore la structure de la membrane bactérienne par la biosynthèse de polysaccharides et qui est impliquée dans l'invasion spécifique des STEC LEE-positifs [134].

D'autres gènes impliqués dans la résistance ou la persistance de souches appartenant aux autres pathovars ont été identifiés chez les STEC. Le gène *aggR* qui code le régulateur de la transcription de nombreux gènes de virulence chez les EAEC [135], le gène *pic* qui code une sérine protéase impliquée dans la colonisation chez les EAEC [136], et les gènes *irp2* (*iron responsible protein 2*) et *fyuA* (*ferric yersiniabactin uptake*) qui codent des protéines ayant un rôle dans l'absorption du fer chez *Yersinia* [137].

4.3. Réservoirs des STEC (EHEC) :

Les animaux d'élevage (bovins, ovins, porcs, chèvres, volaille) et tout particulièrement les bovins, sont les principaux réservoirs des STEC au niveau de leur tube digestif. Ce sont des porteurs sains et la colonisation de leur tube digestif est asymptomatique et transitoire [138]. Le portage varie d'un environnement à l'autre et peut varier entre 15 et 70 % selon les cheptels étudiés. Le portage de STEC a été également mis en évidence chez les ovins, les caprins, les porcs, les animaux sauvages et les animaux domestiques tels que les chiens et les chats, mais également chez des animaux atypiques tels que les grenouilles ou les poissons par contamination indirecte. [54], [139]. L'Homme symptomatique ou asymptomatique peut être le réservoir de STEC au niveau de son tube digestif [92]. Le taux de portage varie entre 1,4 et 3 %.

Les études mettent en évidence l'isolement de souches appartenant aux EHEC typiques majeurs identifiés en Europe chez l'Homme et les animaux, soit les sérogroupes O157, O26, O103 et O145. Le portage des EHEC typiques par les animaux domestiques et les animaux sauvages semble faible comparé au portage par l'Homme.

Au final, l'Homme et les animaux contribuent à la persistance et à la dissémination des STEC et des EPEC dans l'environnement par le portage symptomatique ou asymptomatique [138].

4.4. Mode de transmission

Les STEC se transmettent principalement par voie indirecte alimentaire, par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eaux de boisson contaminés par un environnement souillé par les matières fécales animales ou humaines. La seconde voie de transmission est directe par contact interhumain ou par contact avec des ruminants infectés porteurs et excréteurs. Les eaux récréatives comme les lacs, les rivières et également les eaux de mer peuvent être des vecteurs de contamination [140] (Figure 6).

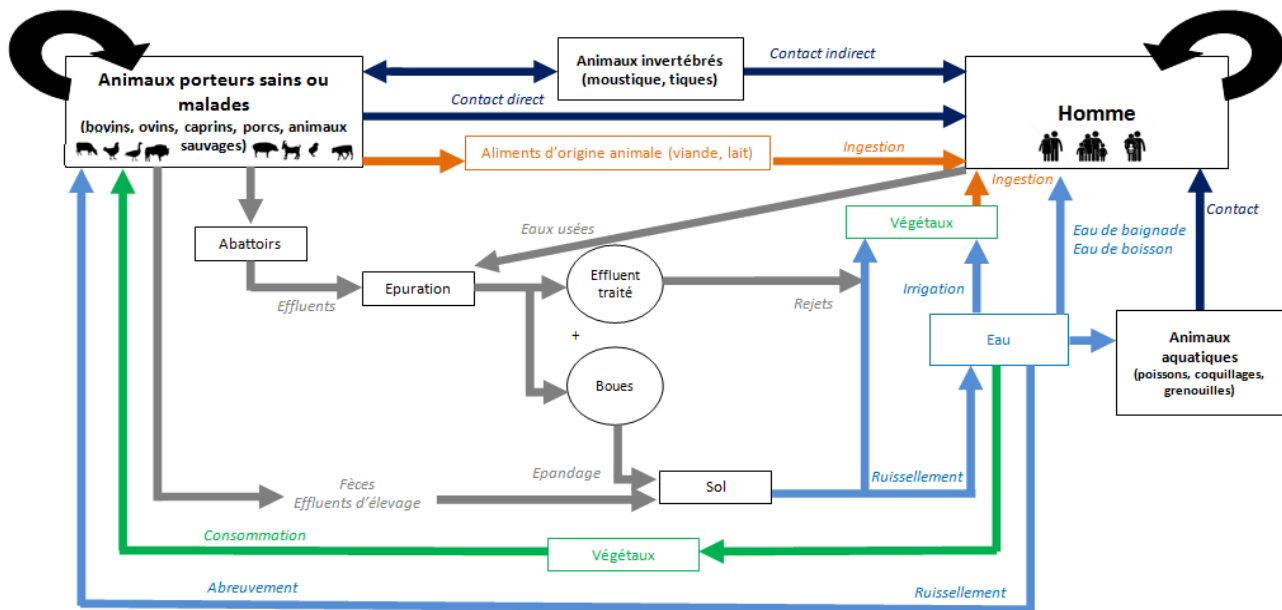


Figure 6 : Flux potentiels d'*E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) et d'*E. coli* entéropathogènes (EPEC) et voies potentielles de contamination de l'environnement et de l'Homme. En gris : voie regroupant les effluents, en vert : voie végétale, en bleu : voie hydrique [63].

Il existe un lien étroit entre toutes les voies de transmissions possibles des STEC et des EPEC. Les flux potentiels de souches pathogènes sont caractérisés dans un premier temps par la présence des STEC et des EPEC au niveau des animaux domestiques et sauvages [93], [141]. La contamination passe par le contact d'animal à animal, d'animal à l'Homme, mais aussi par la contamination des sols (prairies et champs) et des eaux superficielles à partir des déjections animales ou d'effluents contaminés (fumiers et lisiers) épandus pour fertiliser les terres agricoles [142], [143]. Les eaux usées issues des abattoirs ou des stations d'épuration véhiculent et favorisent la dissémination des bactéries d'origine fécale dans l'environnement [144], [129]. Les aliments (herbes et fourrages) et l'eau d'abreusement des animaux peuvent ainsi être également contaminés. Les végétaux consommés par l'Homme ou les animaux peuvent être contaminés, soit par les fumures, soit par l'eau contaminée utilisée pour l'irrigation [145], [146]. (Figure 6).

CHAPITRE 5

ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont définis comme des substances naturelles produites par des micro-organismes ayant une activité sélective contre d'autres micro-organismes et n'ayant pas d'activité sur les cellules eucaryotes. Actuellement, ce terme inclut souvent d'autres composés antimicrobiens de synthèse chimique développés par l'industrie pharmaceutique pour améliorer leur activité et leur disponibilité, ainsi que pour réduire, dans certains cas, la toxicité des produits naturels [147].

L'histoire des antibiotiques commence en 1928, lorsque le scientifique écossais Alexander Fleming (1881-1955) découvre accidentellement la pénicilline. Au cours de ses expériences, Fleming remarque qu'un champignon contamine l'une de ses cultures et inhibe la croissance des bactéries cultivées dedans (*Staphylococcus aureus*). C'était la découverte de la pénicilline, qui ne fut pas produite à grande échelle ni utilisée avant les années 1940. Cette découverte a révolutionné le traitement des maladies infectieuses et a changé à jamais les pratiques médicales. C'était le premier antibiotique, l'une des découvertes majeures du XXe siècle. À partir de cette découverte, l'industrie pharmaceutique a entamé une course effrénée pour rechercher de nouveaux composés, ce qui a conduit à la découverte d'une grande variété d'antibiotiques appartenant à des familles très diverses (β -lactamines, aminoglycosides, tétracyclines, macrolides, etc.) produits par des micro-organismes environnementaux, qu'ils soient d'origine bactérienne (*Streptomyces*, *Bacillus*, etc.) ou fongique (*Penicillium*) [148], [149].

5.1. Mécanismes d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques doivent pénétrer à travers la paroi bactérienne sans être intrinsèquement métabolisés et agir sur la cible. Ainsi, pour comprendre les mécanismes de résistance, il est primordial de comprendre la manière dont agit chaque classe d'antibiotiques. Pratiquement tous les agents antimicrobiens entravent des fonctions critiques au sein des bactéries. Plusieurs activités biochimiques sont particulièrement vulnérables à l'interférence par les antibiotiques, telles que la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne et la fonction de leurs membranes, la

synthèse des protéines, le métabolisme des acides nucléiques et les voies métaboliques intermédiaires [150]. (Figure 7).

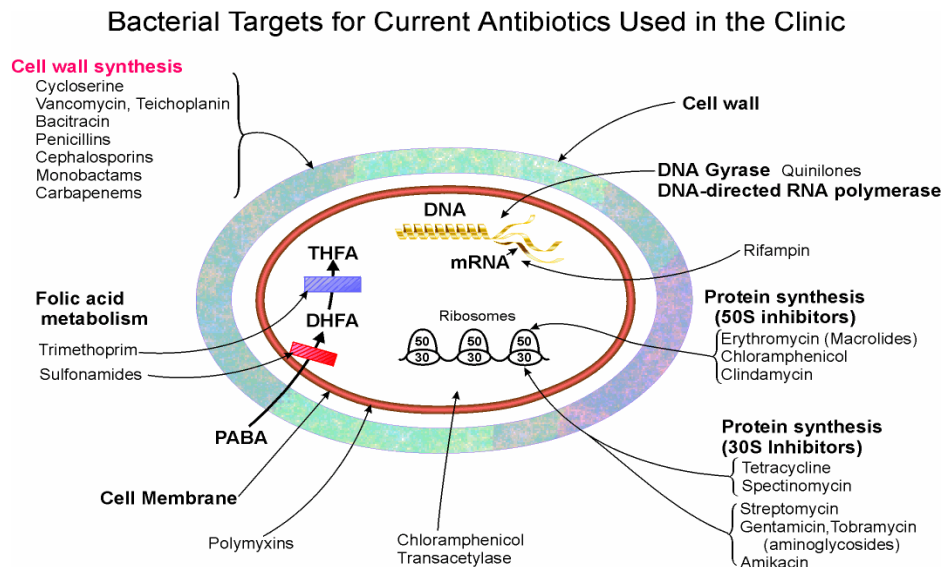


Figure 7 : Les principaux mécanismes de résistance décrits pour les différents groupes d'antibiotiques [151].

5.2. Bactéries résistantes :

La résistance n'affecte pas seulement les bactéries pathogènes d'intérêt clinique, mais elle affecte également très fréquemment les bactéries commensales, non pathogènes, qui font partie de différents écosystèmes naturels tels que le microbiote intestinal des humains et des animaux en bonne santé, ainsi que les eaux et les aliments, et qui sont exposées à l'utilisation d'antibiotiques dans différents contextes.

La bactérie *E. coli* est représentative des bactéries Gram-négatives et constitue une excellente candidate pour les études de surveillance, car elle est largement répandue dans de nombreux écosystèmes et peut agir à la fois comme un commensal et comme un agent pathogène, permettant ainsi d'analyser la pression sélective des antibiotiques dans différents environnements [151].

5.3. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

Les bactéries ont développé des mécanismes pour survivre et devenir résistantes à l'action des antibiotiques. Les mécanismes de résistance sont très variés

[152] : modification ou inhibition enzymatique de l'antibiotique, modification de la perméabilité de la paroi bactérienne, altération ou protection de la cible, expulsion active de l'antibiotique hors de la cellule, ou altération des systèmes de transport. Il existe deux types de résistances :

- **Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique supérieure des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné [150].

- **Résistance acquise**

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce. Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène par conjugaison, transformation ou transduction [150].

- **Bêtalactamines**

La production de β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus courant aux antibiotiques β -lactamiques chez les bactéries Gram-négatives. Ces enzymes hydrolysent le noyau β -lactame commun à tous les antibiotiques de ce groupe, ce qui inactive ce composé. De nouveaux antibiotiques ont été développés pour résister à l'hydrolyse par les β -lactamases. Cependant, de nouvelles β -lactamases ont rapidement émergé [153].

La première β -lactamase caractérisée, TEM-1, connue avec TEM-2 et SHV-1 comme des β -lactamases classiques, a été découverte en 1960 dans une souche d'*E. coli* chez un patient en Grèce [154]. En raison de l'utilisation massive de céphalosporines dans les années 1980, les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ont émergé, et en raison également d'une utilisation prolongée de combinaisons de β -lactamines avec des inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique, les β -lactamases TEM résistantes aux inhibiteurs β -lactamiques, appelées IRT, ont émergé.

Dans les années 90, les β -lactamases de type AmpC plasmidiques ont émergé en raison de l'utilisation des céfamycines, et enfin, les carbapénémases ont émergé à la fin des années 1990 en raison de l'utilisation des carbapénèmes [153].

Parmi les BLSEs les plus prévalentes et où la plupart de ces enzymes sont regroupées, on trouve les types TEM, SHV, CTX-M et OXA. D'autres BLEEs non liées aux précédentes sont les types PER (décrites dans *P. aeruginosa* et *Acinetobacter*) et VEB (*Enterobacterias* et *P. aeruginosa*). Il existe également d'autres enzymes avec une prévalence beaucoup plus faible, telles que GES, SFO, TLA, BES, IBC et BEL [155]

Actuellement, il existe plus de 115 variantes de SHV (www.lahey.org/studies). Les BLSEs de type TEM, dérivées de TEM-1 et TEM-2, comptent actuellement plus de 160 variantes d'enzymes de ce type, mais elles incluent également les IRT. Les enzymes de type CTX-M peuvent être classées en cinq familles (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25), regroupant un total de plus de 80 variantes [155].

Les BLSEs de type OXA ont été détectées pour la première fois dans une souche de *P. aeruginosa* en Turquie en 1991. Jusqu'à présent, onze variantes dérivées de la β -lactamase à large spectre OXA-10 ont été décrites, la grande majorité se trouvant dans *P. aeruginosa* [155].

Depuis leur première description, l'épidémiologie mondiale des BLSE a changé, car la majorité des souches d'*E. coli* sont productrices de CTX-M, principalement chez les patients présentant des infections des voies urinaires, contrairement aux enzymes de type SHV et TEM qui étaient associées à des éclosions nosocomiales, principalement en UCI, et leur prévalence était beaucoup plus élevée chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli*. Un facteur important influençant la dissémination des BLSEs est la présence de plasmides qui se transfèrent entre différents clones à la fois locaux et internationaux. Ce fait a facilité la présence de certaines enzymes telles que TEM-4, CTX-M-10, CTX-M-14 et CTX-M-9 en Espagne ou la propagation d'un même plasmide dans différents pays, comme c'est le cas d'un plasmide contenant le gène de la β -lactamase CTX-M-15. De même, l'association des gènes blaBLSE à différentes structures génétiques telles que les séquences d'insertion (ISCR1, ISEcp1, IS26), les intégrons et les transposons (Tn21) facilite leur intégration et leur persistance dans

des plasmides largement répandus parmi les *Enterobacteriaceae*, favorisant ainsi leur dispersion [156].

- **Sulfamides et triméthoprim**

La résistance aux sulfamides peut être due, entre autres mécanismes, à des altérations de leurs cibles d'action. Au laboratoire, des mutations spontanées ont été facilement détectées chez *E. coli* dans le gène chromosomique *dhps* codant pour l'enzyme DHPS [157], mais la résistance peut également être médiée par des gènes transférables (*sul1*, *sul2* et *sul3*) inclus dans des intégrons, des transposons ou des plasmides, codant pour des variantes de l'enzyme DHPS chez les bactéries Gram-négatives [157], [158]. En ce qui concerne le triméthoprim, jusqu'à présent, 19 gènes transférables codant pour l'enzyme DHFR ont été détectés, dont 15 sont des gènes-cassettes faisant partie des intégrons. Ces gènes ont été classés en deux groupes : le type A, constitué des gènes *dfrA* (*dfrA1*, *dfrA3*, *dfrA5*, *dfrA6*, *dfrA7*, *dfrA8*, *dfrA9*, *dfrA10*, *dfrA12*, *dfrA13*, *dfrA14*, *dfrA15*, *dfrA16* et *dfrA17*), et le type B, composé des gènes *dfrB* (*dfrB1*, *dfrB2* et *dfrB3*) [159].

- **Aminosides**

Le principal mécanisme de résistance aux aminoglycosides chez les souches cliniques d'*E. coli* est la production d'enzymes modifiantes qui altèrent la structure du composé pour le rendre inactif. Les gènes codant pour ces enzymes font souvent partie d'intégrons et de transposons, mobilisés par des plasmides. Il existe trois grands groupes d'enzymes, selon le type de réaction chimique provoquant la modification de l'aminoglycoside : N-acétylation, O-nucléotidylation et O-phosphorylation, appelées respectivement N-acétyltransférase, O-adényltransférases et O-phosphotransférases [160], [161], [162].

La dénomination des différentes enzymes modifiantes est complexe, les initiales APH font référence à la modification par phosphorylation, ANT correspond à la nucléotidylation et AAC à l'acétylation. D'autre part, les sous-titres ultérieurs, tels que (3'), indiquent la position de l'aminoglycoside avec un groupe fonctionnel affecté, et "II", le profil de résistance. Les principaux phénotypes associés à des enzymes modifiantes d'aminoglycosides spécifiques chez les entérobactéries, applicables à *E. coli*, sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1: Phénotypes de résistance associés aux enzymes modifiantes d'aminoglycosides [163].

Phénotype de résistance	Enzyme correspondante
STR	APH(3'')
GEN	AAC(3)-I
KAN, AMK	APH(3')-IV
STR, SPT	ANT(3'')
KAN, NEO	APH(3')-I ó APH(3')II
KAN, TOB, AMK	ANT(4')-II
KAN, GEN, TOB	ANT(2'')-I
KAN, GEN, TOB, NET	AAC(3)-II ou AAC(3)-IV
KAN, TOB, AMK, NET	AAC(6')-I
GEN, TOB, NET, NEO	AAC(2')

STR: streptomycine, GEN: gentamicine, KAN: kanamicine, AMK: amikacine, SPT:spectinomycine, TOB: tobramicine, NET: netilmicine, NEO: neomicine.

• Tétracyclines

Leur utilisation généralisée en médecine, en médecine vétérinaire et en agriculture a conduit à leur résistance, qui peut être due à plusieurs mécanismes : des pompes actives d'expulsion des tétracyclines et des protéines de protection du ribosome.

Les pompes d'expulsion sont composées d'une protéine membranaire formée de douze domaines transmembranaires [152]. Ces pompes actives sont codées par divers gènes : tet(A-E) et tet(G-I), principalement [164]. Le gène tet(B) semble être plus répandu et a été trouvé dans divers genres de bactéries Gram-négatives [165]. Les gènes tet(A), tet(B), tet(D) et tet(H) se trouvent dans des transposons et tet(C), tet(E) et tet(G) se trouvent dans de longs plasmides conjugués avec d'autres gènes de résistance [166]. Chaque gène structural est régulé par un gène répresseur de la réponse à la tétracycline, tetR, qui est orienté en sens inverse [164].

Un autre mécanisme de résistance est constitué par les protéines de protection du ribosome, codées par les gènes *tet(M)* et *tet(O)*, qui sont plus courantes chez les bactéries Gram-positives, mais qui ont également été décrites chez les Gram-négatives [167].

- **Chloramphénicol**

La résistance au chloramphénicol est généralement due à une enzyme inactive de cet antibiotique, appelée chloramphénicol acétyltransférase (CAT), qui est normalement codée par des gènes plasmidiques. Un autre mécanisme de résistance est dû à des modifications de la sous-unité 50S ribosomale qui entraînent une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Des résistances peuvent également survenir par imperméabilité ou par expulsion de l'antibiotique, par altération des protéines membranaires ou la présence de pompes d'expulsion actives, respectivement. La protéine codée par le gène *cmlA* confère une résistance non enzymatique au chloramphénicol chez *E. coli*, agissant comme une protéine de transport dans un système d'expulsion active. Le gène *floR*, dont le produit partage une identité de 57 % avec la séquence d'acides aminés du produit de *cmlA*, code également une pompe d'expulsion qui confère une résistance à la fois au chloramphénicol et au florfénicol (analogique fluoré du chloramphénicol) [168], [169].

- **Quinolones**

Les mécanismes de résistance aux quinolones comprennent des modifications de leurs cibles ; une réduction de la perméabilité membranaire due à des défauts dans les porines ; et une surexpression des pompes d'expulsion actives. Cependant, depuis 1998, une prévalence croissante de la résistance aux quinolones médiée par des plasmides a été décrite, impliquant la protéine Qnr, une aminoglycoside N-acétyltransférase AAC(6')-Ib-cr, et la pompe d'expulsion active QepA [170].

5.4. Utilisation des antibiotiques en élevage :

Avec la découverte et l'application médicale de ces antibiotiques pendant les années 1940 et 1950, on pensait avoir remporté la bataille contre les maladies infectieuses chez l'homme et les animaux. Leur utilisation s'est généralisée et a permis de réduire drastiquement la mortalité associée à de nombreuses maladies infectieuses.

L'utilisation d'antibiotiques en élevage de rente a deux objectifs. Les antibiotiques ont tout d'abord une utilisation thérapeutique visant à l'éradication d'une infection présente (but curatif) ou à la prévention d'une infection possible, à l'occasion d'un transport, d'une vaccination ou d'un stress (but prophylactique). Ceci vise à éviter que les infections présentes dans l'élevage ne se déclarent et se propagent à une vitesse vertigineuse, compte tenu de la densité des animaux dans des locaux dans la grande majorité des cas entièrement clos. Elle est utilisée à des étapes clés de la vie des animaux, ces derniers étant plus fragiles et donc plus sensibles aux infections [171]. Elle est très fréquente en élevage laitier, avec l'application de pommades intramammaires contenant un ou plusieurs antibiotiques lors du tarissement des vaches. L'utilisation des antibiotiques thérapeutiques est sous le contrôle des vétérinaires. La voie d'administration la plus rapide pour traiter un grand nombre d'animaux est l'eau de boisson ou l'incorporation dans l'aliment. Cet aliment de traitement est considéré comme un médicament. Les principales familles d'antibiotiques sont représentées, mais le nombre de molécules est très restreint si on le compare avec celui des molécules à usage humain [172]. A côté de cette utilisation thérapeutique, on trouve une utilisation propre à l'élevage de rente : l'usage zootechnique, c'est-à-dire comme facteurs de croissance sous forme d'additifs alimentaires (officiellement interdite en Algérie).

5.5. Risques liés aux antibiotiques

Toute utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire ou en médecine humaine accroît les risques d'apparition de bactéries résistantes. Les risques les plus grands sont associés à certaines pratiques d'administration des antibiotiques, comme celles qui consistent à administrer simultanément le produit à tout un troupeau, à administrer le produit de façon prolongée ou à surutiliser un même antimicrobien. Aucun lien direct n'a été établi entre l'usage d'antibiotiques comme stimulateurs de croissance dans les élevages et les antibiorésistances apparues chez les humains. Des chercheurs étudient cependant la possibilité qu'un tel lien puisse exister [172].

Mais l'usage intensif et non thérapeutique d'antibiotiques en agriculture conduit à l'apparition de résistances aux antibiotiques, surtout chez les bactéries du tube digestif, comme le groupe de bactéries appelé entérocoques. Ces bactéries résistantes peuvent infecter les humains. Il peut aussi arriver que leurs gènes

résistants se propagent à d'autres bactéries qui infectent les humains. La résistance aux antibiotiques limite les possibilités de traitement, retarde la guérison et s'accompagne d'une augmentation des coûts. Ce qu'il y a de plus troublant, c'est que cette résistance aux antibiotiques peut s'accroître avec l'usage continu et généralisé des antibiotiques comme stimulateurs de croissance [173].

5.4.1 Risques pour la santé animale et humaine :

La conséquence immédiate de la résistance aux antibiotiques en élevage est l'échec thérapeutique. Pour la santé humaine, le risque peut être de deux ordres : risques posés par les résidus dans la viande de consommation et risques dus à la contamination de l'homme par des bactéries zoonotiques résistantes à des antibiotiques utilisés chez l'homme. Ces bactéries résistantes se propagent ensuite au sein des basses-cours, des troupeaux ou des fermes marines et viennent polluer l'environnement, notamment suite à l'épandage du fumier [174]. Les microorganismes résistants peuvent survivre pendant des périodes prolongées et transmettre leur résistance à d'autres bactéries présentes dans l'environnement [175]. A titre d'exemple, des études menées aux Pays-Bas ont montré que la proportion de bactéries résistantes présentes dans des prélèvements de sol avait considérablement augmenté depuis 1940 [147]. Les bactéries résistantes peuvent également se transmettre directement aux humains en contact avec les animaux.

5.6. Principaux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire en Algérie

Des études ont été menées pour déterminer pour quelles espèces et indications le manque de médicament était le plus important. Il en ressort que les bovins font partie des espèces dites majeures, peu touchées par le manque de spécialités. Il est possible de dresser la liste des antibiotiques utilisables chez les bovins dans le tableau 2

Tableau 2 : Antibiotiques utilisés à but thérapeutique en élevage bovin en Algérie

Famille	Antibiotique
Bêta-lactamines	Ampicilline Amoxicilline Amoxicilline+ acide clavulanique Oxacilline Penicilline Cefalexine Ceftiofur
Aminosides	Streptomycine Neomycine Kanamycine Apramycine spectinomycine
Tétracyclines	Tetracycline Doxycycline Oxytétracycline
Sulfamides	Sulfonamides Trimethoprime + Sulfamethoxazole
Quinolones	Acide Nalidixique Acide Oxolinique Flumequine Enrofloxacin Marbofloxacin
Polypeptides	Colistine Bacitracine
Phénicoles	Chloramphenicol Florfenicol
Macrolides	Tylosine Tilmicosine Erythromycine Spiramycine Tulathromycine

CHAPITRE 6

PARTIE EXPERIMENTALE

6.1. Problématique et objectifs :

Tout en s'interrogeant sur les risques liés aux *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), notamment leur présence et leur ampleur, nous avons souhaité apporter notre contribution à travers une étude menée dans le centre de l'Algérie. Cette enquête porte sur le portage des souches pathogènes d'EHEC chez les bovins, dans le but de mieux documenter leur circulation et d'évaluer la situation épidémiologique sur le terrain algérien. Et pour cela, nous avons fixé comme objectif de :

1. Rechercher et caractériser les souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de matières fécales d'origine bovine et d'enfants de moins de deux ans présentant des diarrhées;
 - Étudier la présence de gènes codant pour des facteurs de virulence dans des souches d'*Escherichia coli* ;
 - Déterminer les lignées génétiques associées d'*Escherichia coli* ;
2. Étudier le profil d'antibiorésistance des *E. coli* isolées ;
 - Déterminer les mécanismes de résistance aux antibiotiques.

6.2. Matériel et méthodes :

La présente étude a été conduite du mois de Mars 2017 au mois de Décembre 2020 et s'est déroulée en plusieurs étapes :

6.2.1. *Escherichia coli* d'origine humaine :

Une collection de 85 souches d'*E. coli* a été analysée, obtenue à partir de 85 enfants âgés moins de deux ans présentant des diarrhées, provenant de l'hôpital de Birtraria El biar Alger, pendant la période de septembre 2018 à octobre 2019. Ces souches provenaient de selles diarrhéiques.

6.2.2. Prélèvements de matières fécales d'origine bovine :

Notre étude a porté sur trois wilayas du centre algérien, la wilaya de Tizi-Ouzou, la wilaya d'Alger et la wilaya de Blida.

Nous avons réalisé nos prélèvements lors de plusieurs visites dans les zones concernées par l'étude, avec une sortie prévue en moyenne tous les 10 jours.

Une fois à l'intérieur des élevages, les animaux prélevés sont les animaux accessibles (attachés) et ceux dont l'éleveur nous permettait de prélever.

Au minimum 50g de matière fécale sont prélevés directement du rectum et par animal, dans un pot stérile.

Les prélèvements sont acheminés au Laboratoire des Biotechnologies liées à Reproduction Animale (ISV-Blida) sous froid et analysés dans un délai maximal de 48 h après leur récolte.

6.2.3. Méthode bactériologique :

Après l'acheminement des prélèvements, sous froid, au laboratoire LBRA de l'Institut Science Vétérinaires de Blida. Au niveau de ce dernier, nous avons effectué l'isolement et l'identification des *E. coli*.

Les prélèvements de matières fécales sont analysés après un délai de 24 h à 48 h après leur récolte. Durant cette période, ils sont conservés sous froid à 4°C.

- **Enrichissement dans un milieu liquide non sélectif :**

Cette phase correspond à la préparation de la suspension en utilisant de l'eau péptonée tamponnée qui contient essentiellement des peptones tryptiques source d'azote destinée à revivifier les cellules bactériennes.

En milieu aseptisé et sous un bec Bunsen, nous procédons à la préparation de la solution en ajoutant à environ 10g de matières fécales dans de l'eau péptonée tamponnée.

Les milieuxensemencés sont incubés durant 18-24 h dans une étuve réglée à 37°C.

6.2.3.1. Ensemencement sur gélose :

Après 24 h d'incubation, à l'aide d'une anse de platine stérilisée à la flamme, nous avons prélevé à partir de chaque tube d'enrichissement une goutte de la suspension bactérienne que nous avons ensemencée sur gélose MacConkey.

Les différentes boîtes ensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

6.2.3.2. Purification :

La purification a été faite sur la gélose MacConkey (Conda®). Après 24 h d'incubation à 37° C, une seule colonie caractéristique d'*E. coli* est prélevée de chaque boîte, précédemment ensemencée, puis réensemencée sur une nouvelle gélose.

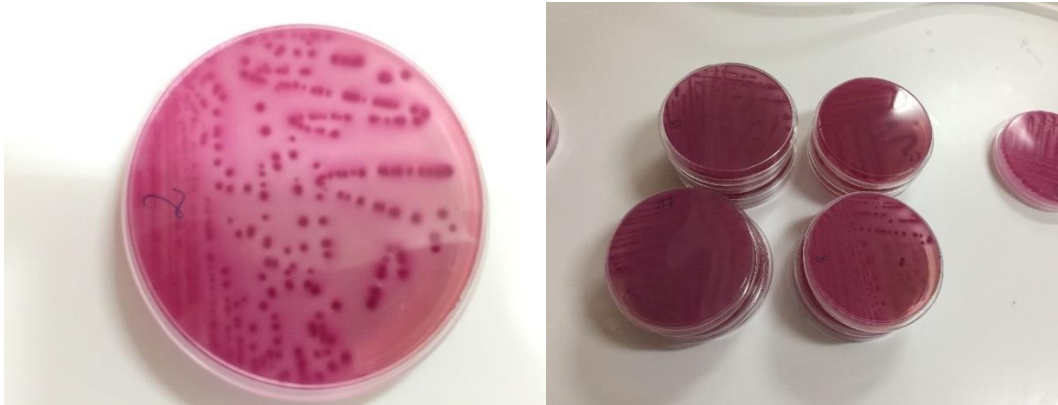


Figure 8 : Gélose MacConkey avec des colonies d'*E coli* après purification

6.2.3.3. Identification biochimique :

Chaque culture pure a fait l'objet d'une observation de la mobilité selon la méthode (état frais), d'une coloration de Gram et, par la suite, d'une identification biochimique.

a) Galerie biochimique

Les caractéristiques biochimiques nous permettent de distinguer les bactéries de genres et d'espèces différentes en détectant les différences entre leurs métabolismes.

Ces caractéristiques biochimiques sont étudiées au niveau du laboratoire par des tests biochimiques différents. Chaque test biochimique fournit des informations qui nous permettent de limiter le champ de recherche (caractère de famille, de genre, d'espèce).

Les cultures bactériennes sont soumises à une mini-galerie biochimique d'orientation (TSI, oxydase, urée indole, mannitol mobilité), puis elles sont soumises à une confirmation avec une galerie miniaturisée API 20^E.

6.2.4. Conservation des souches :

Toutes les souches identifiées ont été conservées à -18°C dans des tubes contenant le BHIB avec 10% de glycérol (cryoconservateur). Par la suite les souches ont été repiquées sur gélose nutritive et envoyées au Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de La Rioja, Espagne, où nous avons réalisé les étapes suivantes.

6.2.5. Identification par la technique de MALDI-TOF MS Spectrométrie de masse MALDI-TOF :

Afin de confirmer notre identification, la technique MALDI-TOF a été utilisée.

Une colonie bactérienne issue d'une culture d'*E. coli* de 24 h sur une gélose BHI (Brain Heart Infusion Agar) (Conda®) est directement déposée sous forme d'un fin frottis sur la surface de la cible de la plaque métallique, puis recouverte par une matrice appropriée. La plaque métallique contient 96 cibles (96 souches par série peuvent être étudiées pour le système Bruker utilisé). La cible est ensuite introduite dans le système MALDI-TOF et, en moins de 2 minutes, le premier spectre de masse est produit et analysé. Par comparaison avec la base de données, le logiciel informatique propose l'identification la plus probable.

Une fois identifiées, toutes les souches d'*E. coli* isolées ont été conservées dans un milieu liquide en tube à -80°C.

6.2.6. Antibiogramme :

a. Principe

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Le principe consiste à placer la culture bactérienne en présence des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

1. Milieu

La gélose de Mueller Hinton (Conda®) est un milieu de base qui permet la réalisation de l'antibiogramme standard. Elle est coulée dans les boîtes de Pétri.

2. Inoculum

L'inoculum est préparé à l'aide de 3 à 5 colonies pures isolées et prélevées, puis mis dans un tube qui contient du bouillon nutritif. Ce dernier est étuvé pendant 30 min, puis une goutte d'inoculum est homogénéisée dans un tube contenant de l'eau physiologique.

3. Ensemencement

L'ensemencement se fait par écouvillonnage. Le milieu est ensemencé par stries très serrées en 3 passages en faisant pivoter la boîte de 60°.

4. Application des disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose avec une pince métallique stérile. Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les boîtes sont incubées 24 h à 37°C.

5. Lecture

La lecture a été faite dans les délais recommandés (18 à 24 heures). Le diamètre de la zone d'inhibition circulaire est mesuré en millimètres à l'aide d'une règle graduée.

La lecture des diamètres des zones d'inhibition a été faite selon les critères établis par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [176] et Clinical and Laboratory Standards Institute [177].

La bactérie est dite sensible à l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la CCI : sa croissance est inhibée par la concentration sérique obtenue au cours d'un traitement à dose habituelle par voie générale. La bactérie est dite résistante à l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la CCS. La concentration sérique ne pouvant pas atteindre la CMI dans les conditions du traitement, sauf à utiliser des posologies toxiques. La bactérie est dite intermédiaire à l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques. En pratique, cela correspond à une situation où la concentration est tantôt suffisante pour tuer les bactéries, tantôt insuffisante, dans ce cas le succès thérapeutique est imprévisible.

b. Choix des antibiotiques :

Au total, 12 antibiotiques ont été testés, parmi les plus utilisés en pratique, et selon les listes d'antibiotiques recommandées pour la surveillance des pathogènes vétérinaires, ce sont : ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, ciprofloxacine, gentamicine, streptomycine, céfotaxime, céfoxitine, ceftazidime, imipénème, sulfamide, triméthoprim-sulfaméthoxazole, tétracycline et chloramphénicol.

La méthode utilisée pour déterminer la sensibilité est la méthode de diffusion au disque sur gélose.

Dans cette technique, des disques en papier imprégnés d'antibiotiques à une concentration déterminée ont été déposés sur une gélose MH ensemencée en nappe avec une suspension bactérienne (concentrée à 0,5 McFarland dans du sérum physiologique, équivalent à $1,5 \times 10^8$ UFC /ml). Tableau 3.

Tableau 3 : Concentration des disques antibiotiques et seuils utilisés pour les catégories sensibilité (S), résistance intermédiaire (I) et résistance (R) (Eucast, 2020).

Antibiotiques	Concentration (µg/disque)	Zones d'inhibition (mm)		
		S	I	R
Ampicilline	10	≥14	-	< 14
Amoxicilline-acide clavulanique	20/10	≥19	-	< 19
Céfotaxime	30	≥20		< 17
Ceftazidime	30	≥22		< 19
Céfoxitine	30	≥19	-	< 19
Imipénème	10	≥22		< 17
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	25	≥14		< 11
Tétracycline	30	≥15*		≤ 11*
Gentamicine	10	≥17	-	< 17
Streptomycine	10	≥15*		≤ 11*
Ciprofloxacine	05	≥25		< 22
Chloramphénicol	30	≥17	-	< 17

***valeur CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute [177]

c. Détection phénotypique des bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) :

La production de BLSE est déterminée par le test du double disque, basé sur la capacité d'inhiber les BLSE possédées par les inhibiteurs de bêta-lactamases.

Dans ce travail, la détection des BLSE est effectuée en plaçant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique entre deux disques de céfotaxime et ceftazidime (environ 1,5 cm).

Si la souche est productrice de BLSE, une synergie est observée entre les disques, c'est-à-dire l'élargissement et la déformation de la zone d'inhibition de croissance au voisinage du disque contenant un inhibiteur de bêta-lactamase, en raison de son inhibition [178].

6.2.7. Extraction d'ADN :

La méthode utilisée était la méthode par chauffage. C'est une technique basée sur la perturbation cellulaire causée par l'ébullition de l'eau, ce qui permet la libération d'ADN bactérien vers l'extérieur de la cellule bactérienne. Cette méthode a été utilisée pour extraire l'ADN de toutes les souches étudiées pour son utilisation ultérieure dans la réalisation de la PCR.

La procédure effectuée consistait à réaliser une suspension de culture bactérienne pure, cultivée sur un milieu BHIA (Conda®) pendant 24 heures, dans de l'eau stérile. Ladite suspension a été soumise à 100 ° C dans un bain-marie pendant 8 min, puis elle a été mixée par le vortex et centrifugée à 12 000 tr/min pendant 2 min. Le surnageant a été collecté et conservé à 4 ° C pour une utilisation ultérieure.

6.2.8. Amplification en chaine, Polymerase Chain Reaction (PCR) :

La technique PCR est un système d'amplification qui permet la synthèse in vitro d'une séquence d'ADN spécifique. À partir de cette dernière, on obtient des milliers de copies de séquences originales. Dans ce travail, cette technique (PCR Classique) a été utilisée pour la détection des gènes de résistance aux antibiotiques, des intégrons, le typage moléculaire et la détection des facteurs de virulence.

Les réactions PCR ont été réalisées dans les thermocycleurs Thermocycler T3 et T3000 (Biometra). Le tableau 4 montre les réactifs utilisés pour cette technique.

Tableau 4 : Réactifs utilisés dans la technique PCR pour un échantillon.

Composants (distributeur)	Concentration	Volume par tube	Concentration à la fin de la réaction
Amorce Forward ^a	25 µM	1 µl	0,5 µM
Amorce Reverse ^a	25 µM	1 µl	0,5 µM
BIOTAQTM DNA polymérase (Bioline)	5 U / µl	0,3 µlb	1,5 U
Tampon de réaction NH4 (Bioline)	10X	5 µl	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1,5 µl	1,5 mM
Mélange de dNTP (Promega)	2,5 mM	1 µl	0,05 mM
ADN	---	10 µl / 2 µlc	---
Eau milliQ stérile	---	Jusqu'à 50 µl	---

^a Les amorces utilisées ont été synthétisées par Sigma Aldrich.

Des contrôles positifs et négatifs (en remplaçant l'ADN par le volume correspondant d'eau milliQ stérile) ont été inclus dans toutes les réactions.

6.2.8.1. Caractérisation des gènes de résistance :

6.2.8.1.1. Résistance aux bêta-lactames (bêta-lactamases) :

Dans les souches qui présentaient une résistance aux bêtalactamines (ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique), la présence des gènes *blaSHV*, *blaTEM*, *bla_{oxa1}* et *blaOXA48* a été recherchée.

Pour les souches qui présentaient un phénotype BLSE, en plus des gènes précédemment cités (*blaSHV*, *blaTEM*, *blaOXA1* et *blaOXA48*), les gènes *blaCTX-M-Universal*, *blaCTX-M-3G* et *blaCTX-M-9G* ont été analysés par la PCR et le séquençage ultérieur.

Les séquences d'amorces, les conditions d'amplification et la taille après amplification génique de la résistance aux bêta-lactames sont décrites dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance aux bêta -lactames (bêta-lactamases).

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions d'amplification	Référence et Taille
Gene blaCTX-M-UNIVERSAL blaCTX-M-UNI F : CGATGTGCAGTACCAGTAA blaCTX-M-UNI R : TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94°C 5 min. 1 cycle 94°C 30 sec. 60°C 30 sec. 35 cycles 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 cycle	[179] (585 pb)
Gene blaCTX-M-3G (Groupe 1) blaCTX-M-3G F : GTTACAATGTGTGAGAAGCAG blaCTX-M-3G R : CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94 ° C 7 min. 1 cycle 94 ° C 50 sec. 50 ° C 40 sec. 35 cycles 68 ° C 1 min. 68 ° C 5 min. 1 cycle	[179] (1017 pb)
Gene blaCTX-M-9 (Grupe 9) blaCTX-M-9 F : GTGACAAAGAGAGTGCAACGG blaCTX-M-9 R : ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	94°C 3 min. 1 cycle 94°C 45 sec. 62°C 45 sec. 35 cycles 72°C 45 sec. 72°C 10 min. 1 cycle	[180] (857 pb)
Gène blaTEM blaTEM F : ATTCTTGAAGACGAAAGGGC blaTEM R : ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	94 ° C 3 min. 1 cycle 94 ° C 1 min. 60 ° C 1 min. 30 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 10 min. 1 cycle	[181] (1150 pb)
Gène BlaSHV SHV-F : CACTCAAGGATGTATTGTG SHV-R : TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96 ° C 5 min. 1 cycle 96 ° C 15 sec. 52 ° C 15 sec. 24 cycles 72 ° C 2 min. 72 ° C 5 min. 1 cycle	[182] (885 pb)

6.2.8.1.2. Résistance aux quinolones :

Les gènes qnrA, qnrB, qnrS et aac(6')-ib ont été amplifiés dans toutes les *E. coli* présentant une résistance aux quinolones, par PCR, et les amplicons aac(6')-ib ont été séquencés pour identifier le variant aac(6')-ib-cr. Le tableau 6 montre les séquences d'amorces, les conditions d'amplification et la taille après amplification génique de la résistance aux quinolones.

Tableau 6 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance aux quinolones

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions d'amplification	Référence (Taille de l'amplicon)
Gene qnrA qnr-F : GGGTATGGATATTATTGATAAA qnr-R : CTAATCCGGCAGCACTATTA	95°C 5 min. 1 cycle 95°C 1 min. 55°C 1 min. 40 cycles 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 cycle	[183] (580 pb)
Gen qnrB qnrB-F : GGMATHGAAATTCGCCACTG qnrB-R : TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	95°C 5min 1 cycle 95°C 1min 56°C 1min 35 cycles 72°C 1min 72°C 7min 1cycle	[184] (264 pb)
Gen qnrS qnr-F : AGTGATCTCACCTTCACCGC qnr-R : CAGGCTGCAATTTTGATACC	95°C 5 min. 1 cycle 95°C 1 min. 55°C 1 min. 35 cycles 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 cycle	[184] (550pb)
Gen aac (6')-Ib aac (6')-Ib -F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac(6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT Séquençage avec : aac(6')-Ib-seq: CGTCACTCCATACATTGCAA	94°C 5min. 1 cycle 94°C 45sec. 55°C 45sec. 34 cycles 72°C 45sec. 72°C 8min. 1 cycle	[185] (482 pb)

6.2.8.1.3. Résistance aux aminosides :

Le tableau 7 montre les gènes de résistance qui ont été étudiés dans les souches qui présentaient une résistance aux aminosides.

Tableau 7 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance aux aminosides.

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions d'amplification	Référence Taille
Gene aac (3) -II (confère une résistance à la gentamicine) AACC2-1 : ACTGTGATGGGATACGCGTC AACC2-2 : CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 30 sec. 60 ° C 45 sec. 32 cycles 72 ° C 2 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[186] (237 pb)
Gene aadA(1ou 2) (confère une résistance à la streptomycine) aadA(1ou 2)-F : GCAGCGCAATGACATTCTTG aadA(1ou 2)-R : ATCCTTCGGCGCGATTTTG	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 1 min. 60 ° C 1 min. 35 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[187](282 pb)
Gene aadA5 (confère une résistance à la streptomycine) aadA5 -F : CTTCAAGTTCGGTGAGTGGC aadA5 -R : CAATCGTTGCTTTGGCATAT	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 1 min. 54 ° C 1 min. 35 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 10 min. 1 cycle	[188] (453 pb)

6.2.8.1.4. Résistance à la tétracycline :

La présence des gènes de résistance à la tétracycline *tet(A)* et *tet(B)* a été analysée dans les souches d'*E. coli* avec une résistance à cet antibiotique (tableau 8).

Tableau 8 : : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance à la tétracycline.

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions de amplification	Référence Taille
Gén tet (A) TetA-F : GTAATTCTGAGCACTGTCGC TetA-R : CTGCCTGGACAACATTGCTT	95 ° C 5 min. 1 cycle 95 ° C 30 sec. 62 ° C 30 sec. 23 cycles 72 ° C 45 sec. 72 ° C 7 min. 1 cycle	[189] (937 pb)
Gén tet (B) TetB-F : CTCAGTATTCCAAGCCTTTG TetB-R : CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	95 ° C 5 min. 1 cycle 95 ° C 30 sec. 57 ° C 30 sec. 25 cycles 72 ° C 20 sec. 72 ° C 7 min. 1 cycle	[189] (416 pb)

6.2.8.1.5. Résistance au chloramphénicol :

Le tableau 9 montre les gènes responsables de la résistance aux quinolones (*cmlA* et *flor*).

Tableau 9 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification génique de la résistance au chloramphénicol.

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions d'amplification	Référence Taille
Gen cmlA Cmla-F : TGTCATTTACGGCATACTCG Cmla-R : ATCAGGCATCCCATTCCCAT	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 1 min. 55 ° C 1 min. 30 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 7 min. 1 cycle	[186] (455 pb)
Gen flor flor- F : CACGTTGAGCCTCTATAT flor- R : ATGCAGAAGTAGAACGCG	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 30 sec. 55 ° C 30 sec. 30 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 5 min. 1 cycle	[190] (868pb)

6.2.8.1.6. Résistance aux sulfamides :

La présence des gènes responsables de la résistance aux sulfamides (*sul1*, *sul2* et *sul3*) et des gènes responsables de la résistance à la triméthoprine (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16*, *dfrA16b*, *dfrA7*, *dfrA17*, *dfrA12* et *dfrA13*) a été analysée dans les souches d'*E. coli* avec une résistance à cette association d'antibiotiques. (Tableau 10).

Tableau 10 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification génique liées à la résistance aux sulfamides

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions de l'amplification	Référence Taille
Gen <i>sul1</i> Sul1-F : TGGTGACGGTGTTTCGGCATTCT Sul1-R : GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 30 sec. 63 ° C 30 sec. 30 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[191] (789 pb)
Gen <i>sul2</i> Sul2- F: CGGCATCGTCAACATAACC Sul2- R: GTGTGCGGATGAAGTCAG	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 30 sec. 50 ° C 30 sec. 30 cycles 72 ° C 1,5 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[192] (722 pb)
Gen <i>sul3</i> Sul3- F: CGGCATCGTCAACATAACC Sul3- R: GTGTGCGGATGAAGTCAG	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 1 min. 51 ° C 1 min. 30 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 5 min. 1 cycle	[193](792 pb)
<i>dfrA1</i>, <i>dfrA5</i>, <i>dfrA15</i>, <i>dfrA15b</i>, <i>dfrA16</i>, <i>dfrA16b</i> DfrIa F : GTGAAACTATCACTAATGG DfrIa R : TTAACCCTTTTGCCAGATTT	94°C 5 min. 1 cycle 94°C 1 min. 55°C 1 min. 30 cycles 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 cycle	[194] (474 pb)
<i>dfrA7</i>, <i>dfrA17</i> DfrVII F: TTGAAAATTTTCATTGATT DfrVII R: TTAGCCTTTTTTCCAAATCT	94°C 5 min. 1 cycle 94°C 1 min. 55°C 1 min. 30 cycles 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 cycle	[194] (474 pb)
<i>dfrA12</i>, <i>dfrA13</i> DfrXII F : GGTGSGCAGAAGATTTTTCGC ^a DfrXII R : TGGGAAGAAGGCGTCACCCTC	94°C 5 min. 1 cycle 94°C 1 min. 60°C 1 min. 30 cycles 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 cycle	[194] (319 pb)

^a S=G ou C.

6.2.8.2. Etude des intégrons :

Les souches présentant une résistance au SXT (SXT R) ont été testées pour détecter la présence de l'intégrase des intégrons de classe 1, de classe 2 et de classe 3 (intl1, intl2 et intl3, respectivement).

À cette fin, outre de nombreuses amorces qui amplifient les gènes de la résistance aux différentes familles d'antibiotiques pouvant entrer dans la composition structurale de l'intégron qui sont décrites dans cette étude, une amorce conçue pour la caractérisation des intégrons a été utilisée dans ce travail, qui est la suivante :

aad-rév : CAAGAATGTCATTGCGCTGC ;

Cette amorce se lie au gène aadA qui confère une résistance à la streptomycine.

Tableau 11 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification pour l'étude des intégrons

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions d'amplification	Référence Taille
Gen <i>intl1</i> (intégron classe 1) Intl1-F : GGGTCAAGGATCTGGATTTCG Intl1-R : ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 30 sec. 62 ° C 30 sec. 30 cycles 72 ° C 1 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[191] (483 pb)
Région variable de l'intégron classe 1 Rv-int-1 F : GGCATCCAAGCAGCAAG Rv-int-1 R : AAGCAGACTTGACCTGA	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 1 min. 55° C 1 min 35 cycles 65 ° C 8 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[195] (Variable)
Gen <i>intl2</i> (integron classe 2) Intl2-F : CACGGATATGCGACAAAAAGGT Intl2-R : GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C 5 min. 1 cycle 94°C 30 sec. 62°C 30 sec. 30 cycles 72°C 1 min. 72°C 8 min. 1 cycle	[191] (788 pb)
Region variable de l'integron classe 2 Rv-int-2 F : CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA Rv-int-2 R : RGATGCCATCGCAAGTACGAG	94°C 5 min. 1 cycle 94°C 1 min. 60°C 1 min. 35 cycles 72°C 6 min. 72°C 8 min. 1 cycle	[191] (Variable)
Gen <i>intl3</i> (integron classe 3) Intl3-F : GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG Intl3-R : ACGGATCTGCCAAACCTGACT	94°C 5 min. 1 cycle 94°C 30 sec. 62°C 30 sec. 30 cycles 72°C 1 min. 72°C 8 min. 1 cycle	[191] (979 pb)

6.2.8.3. Typage moléculaire :

6.2.8.3.1. Groupe phylogénétique :

La classification des souches d'*E. coli* dans les différents groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, D, E et F) est réalisée en utilisant la technique décrite par Clermont et collaborateurs en 2013,[16], qui consiste en détection multiplex PCR en utilisant les amorces indiquées dans le tableau 12 et suivant l'arborescence des décisions illustrées dans le tableau 13.

Tableau 12 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification pour la détermination du groupe phylogénétique d'*E. coli*

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions de amplification	Référence Taille
Quadruplex : <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , TspE4.C2, <i>arpA</i> Gène <i>chuA</i> : ChuA.1b : ATGGTACCGGACGAACCAAC ChuA.2 : TGCCGCCAGTACCAAAGACA Gène <i>yjaA</i> : yjaA.1b : CAAACGTGAAGTGTCAGGAG yjaA.2b : AATGCGTTCCTCAACCTGTG Gène TspE4.C2 : TspE4C2.1b CACTATTCGTAAGGTCATCC TspE4C2.2b AGTTTATCGCTGCGGGTCGC Gène <i>arpA</i> : AceK.f : arpA AACGCTATTCGCCAGCTTGC ArpA1.r : TCTCCCCATACCGTACGCTA	94 ° C 4 min. 1 cycle 94 ° C 5 sec. 59 ° C 20 sec. 30 cycles 72 ° C 5 min. 72 ° C 3 min. 1 cycle	[16] (288 pb) (211 pb) (152 pb) (400 pb)
Group E : <i>arpA</i> Gène <i>arpA</i> : ArpAgpE.f GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC ArpAgpE.r GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	94 ° C 4 min. 1 cycle 94 ° C 5 sec. 57 ° C 20 sec. 30 cycles 72 ° C 5 min. 72 ° C 3 min. 1 cycle	[16] (301 pb)
Group C : <i>trpA</i> Gène <i>trpA</i> : trpAgpC.1 AGTTTTATGCCAGTGCGAG trpAgpC.2 TCTGCGCCGGTCACGCCC	94 ° C 4 min. 1 cycle 94 ° C 5 sec. 59 ° C 20 sec. 30 cycles 72 ° C 5 min. 72 ° C 3 min. 1 cycle	[16] (<i>trpA</i> 219 pb)

Tableau 13 : Génotypes quadruplex et étapes nécessaires à l'attribution des souches « *E. coli* » aux phylogroupes

Genotype quadruplex				Phylogroupe	Etape suivante
<i>arpA</i> (400bp)	<i>chuA</i> (288bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2(152 bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	
+	-	+	-	A ou C	pourrait être confirmé par le test du gène <i>ibeA</i> .
+	+	-	-	D ou E	Testez en utilisant des amorces spécifiques à C. Si C+, alors C, sinon A.
+	+	-	+	D ou E	Testez en utilisant des amorces spécifiques à E. Si E+, alors E, sinon D.
+	+	+	-	E ou clade1	Testez en utilisant des amorces spécifiques à E. Si E-, alors. clade I, confirmer en utilisant des amorces spécifiques au clade.

6.2.8.3.2. Typage de séquences multilocus (mlst)

La technique MLST, conçue pour le typage moléculaire des souches, est basée sur l'amplification et le séquençage des gènes constitutifs ("housekeeping") qui présentent une plus grande similitude ou égalité avec une plus grande proximité évolutive des souches. Le séquençage de ces gènes permet l'attribution d'un numéro d'allèle pour chacun. Donc, la combinaison d'allèles de tous les gènes permet l'attribution d'un nombre type de séquence (ST) en utilisant les sites web suivants :

https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ : pour la comparaison de nos séquences avec les séquences références

https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=sequenceQuery : pour la détermination de l'allèle correspondant pour chacun des 7 gènes.

https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=profiles&scheme_id=4 : pour la détermination de ST.

Les gènes constitutifs à analyser ainsi que les amorces PCR utilisées varient en fonction du microorganisme à étudier. Les espèces bactériennes et les protocoles de typage MLST développés jusqu'à présent peuvent être consultés sur le site web : [http://pubmlst.org] (http://pubmlst.org).

Dans le cadre de cette étude, seules les souches *BLSE*, les souches virulentes et les souches appartenant au phylogroupe B2 ont été analysées à l'aide de cette technique.

Le typage MLST d'*E. coli* a été effectué à l'aide du système trouvé disponible sur <http://mlst.ucc.ie> et consistant en l'analyse de la séquence de 7 gènes constitutifs : *adk* (adénylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (ADN gyrase), *icd* (isocytate / isopropyl malate déshydrogénase), *mdh* (malate déshydrogénase), *purA* (adénylosuccinate déshydrogénase) et *recA* (motif de liaison de l'ATP / GTP). Les amorces utilisées pour leur amplification et les conditions de la PCR sont présentées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification pour la détermination du groupe phylogénétique d'*E. coli* (<http://pubmlst.org>).

Gène	Amorces (séquence 5 '3')	T ^a hybridation	Taille
Adk	Adk-F : ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG Adk-R : CCGTCAACTTTCGCGTATTT	54	583 pb
fumC	FumC-F : TCACAGGTCGCCAGCGCTTC FumC-R : GTACGCAGCGAAAAAGATTC	54	806 pb
icd	Icd-F : ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA Icd-R : GGACGCAGCAGGATCTGTT	54	878 pb
purA	PurA-F : CGCGCTGATGAAAGAGATGA PurA-R : CATACGGTAAGCCACGCAGA	54	816 pb
gyrB	GyrB-F : TCGGCGACACGGATGACGGC GyrB-R : ATCAGGCCTTCACGCGCATC	60	880 pb
recA	RecA-F : CGCATTCGCTTTACCCTGACC RecA-R : TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	60	734 pb
mdh	Mdh-F : ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG Mdh-R : TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	60	932 pb

^aConditions d'amplification : dénaturation initiale (95 ° C, 3 min.); 30 cycles (95 ° C, 1 min.; X, 1 min. et 72 ° C, 2 min.) et allongement final (72 ° C, 5 min.).

6.2.9. Sérotypage :

Dans notre étude, seules les souches *BLSE*, les souches virulentes et les souches appartenant au phylogroupe B2 ont été analysées par cette technique.

Les souches d'*Escherichia coli* ont été caractérisées en ce qui concerne leur sérotype O:H selon la méthode décrite par Guinée et al. (1981), en utilisant l'ensemble des antisérums disponibles dirigés contre les antigènes somatiques O (O1 à O181) et flagellaires H (H1 à H56) [197]. L'identification des antigènes O et H a été réalisée par la technique de microagglutination en plaques et en tubes. Les agglutinines non spécifiques ont été éliminées par adsorption à l'aide d'antigènes présentant des réactions croisées.

Les souches qui ne présentaient aucune réaction avec les antisérums O ont été désignées comme non typables (ONT : O non typable). Celles qui ne réagissaient avec aucun antisérum H ont été désignées comme HNT (H non typable), et les souches non mobiles ont été notées HNM (H non mobile). Les souches HNM et HNT ont par ailleurs été soumises à une PCR ciblant les gènes flagellaires, et les résultats positifs ont été indiqués entre crochets [H].

6.2.10. Caractérisation des gènes codant pour la virulence :

6.2.10.1. Shigatoxines (stx) :

Les *stx1* et *stx2*, gènes codants pour les Shigatoxines, ont été recherchés. Les sous-types de *stx1* ont également été déterminés par PCR (tableau 15).

Tableau 15 : Séquence nucléotidique des amorces PCR et conditions d'amplification des gènes de virulence codant pour les Shigatoxines.

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions d'amplification	Référence Taille
Gen stx1 stx1-F : CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG stx1-R : CACCAGACAATGTAACCGCTG	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 1,5 min. 62 ° C 1,5 min 34cycles 72 ° C 1,5 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[198] (348pb)
Gen stx2 Stx2-F : ATC CTA TTC CCG GGA GTTTACG Stx2-R : GCGTCATCGTATACACAGGAGC	94 ° C 5 min. 1 cycle 94 ° C 1,5 min. 64 ° C 1,5 min 34cycles 72 ° C 1,5 min. 72 ° C 8 min. 1 cycle	[198] (584pb)

6.2.10.2. Intimine (eae) :

La recherche du gène *eae* codant pour les intimines a également été effectuée dans toutes les souches d'*E. coli* isolées. Les variantes du gène *eae* ont été déterminées par PCR et séquençage (Tableau 16).

Tableau 16 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR et conditions d'amplification des gènes de virulence codant pour l'intimine (*eae*).

Amorces (séquence 5 '3')	Conditions d'amplification	Référence Taille
Gen eae eae-F : CATTATGGAACGGCAGGT eae-R : ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA	94°C 3min. 1 cycle 94°C 1min. 55°C 1min. 30 cycles 72°C 2min. 72°C 7min. 1 cycle	[199] (482 pb)

La présence de différents gènes codant pour des facteurs de virulence a été étudiée, par la PCR, dans toutes les souches d'*E. coli* isolées : la shigatoxine (gènes *stx1*, *stx2*) et l'intimine (*eae*).

Les sous-types de *stx1* ont été déterminés par PCR multiplex, tandis que les variantes *stx2* et *eae* ont été déterminées par PCR et séquençage. Tableau 17

Tableau 17 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes sous-types *stx* et *eae*.

Cibles	Amorces	Sequence (5'-3')	taille (bp)	Reference
<i>stx1</i>, <i>stx2</i>, <i>eae</i> and <i>subAB</i> subtyping				
<i>stx1a</i>	<i>stx1a</i> -F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478	[69]
	<i>stx1a</i> -R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		
<i>stx1c</i>	<i>stx1c</i> -F1	CCTTTCCTGGTACAACTGCGGTT	252	[69]
	<i>stx1c</i> -R1	CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA		
	<i>stx1d</i> -R2	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA		
<i>stx2a</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2g</i>	<i>stx2b</i> , <i>stx2d</i>	F4 R1	GGCACTGTC TGAAACTGCTCCTGT ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC	627 [200]
<i>stx2e</i> , <i>stx2f</i>	F4-f	CGCTGTCTGAGGCATC TCCGCT	625	[200]
	R1-e/f	TAACTTCACCTG GGCAAAGCC		
<i>eae</i>	EAE-R11	TCTTCGGAGGGTTTTTTATT	1125	[201]
	EAE-FBN	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAAAC		
<i>eae</i>	EAE-R12	CCAGACGAATATATACATATTC	1181	[201]
	EAE-FBN	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAAAC		
<i>subAB</i>	<i>subA_start</i> F	CCCTGTAACATATTGACCAGCA		[202]
	SubAF	GTACGGACTAACAGGGAAGCTG		[125]

- Les souches positives pour les gènes *stx* (*stx1* et/ou *sxt2*) et *eae* ont été considérées comme des *EHEC* typiques.
- Les souches positives pour les gènes *stx1* et/ou *sxt2* ont été considérées des STEC.
- Les souches *stx*-négatives mais *eae*-positives ont été considérées comme EPEC. Le gène *bfp* (bundle-forming pilus) a été également recherché dans des souches *eae*-positives pour déterminer les souches EPEC (EPEC typique ou EPEC atypique).

Toutes les souches portant les gènes de virulence *stx* et/ou *eae*, les souches BLSE et les souches appartenant au phylogroupe B2 ont été criblées pour d'autres facteurs de virulence (Tableau 18), pour permettre leur classification comme ExPEC (APEC et UPEC) ou non. ExPEC, à savoir :

- Les adhésines : (*fimH*, *fimAV*, *papAH*, *papC*, *papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*),
- Les protectines : *K1*, *K2*, *K5*, *kpsM II*, *KpsM II*, *traT*, *malX*, outer membrane protein T (*ompT*) ; heme binding protein *chuA*,

- Les systèmes d'acquisition de fer : (aérobactine (*iucD*), *iutA*, *iroN*), *fyuA* yersiniabactin receptor,
- Les toxines : facteurs cytotoxiques nécrosants (*cnf1*), enterohémolysine (*ehx*), Hémolysine A (*hlyA*), *hlyF*, Protéine autoagglutinate (*saa*), invasine (*tia*), *ibeA* subtilase (*subAB*), Secreted autotransporter toxin (*sat*), vacuolating autotransporter (*vat*), Cytolethal Distending Toxin Locus (*cdtB*), l'hémagglutinine sensible à la chaleur (*tsh*) ; *usp* uropathogenic-specific, *cvaC* colicin manufacturing, *yfcV* putative chaperoneusher fimbria.

La classification est établie comme suit :

- **EHEC atypique : toutes souches qui possèdent le gène *stx* (*stx1* et/ou *sxt2*) et un autre mécanisme d'adhésion à la muqueuse colique autre que *eae* ont été considérées des *EHEC atypiques*. Exemple le gène *saa*. [203]**
- *ExPEC* : toutes souches qui possèdent deux des gènes de virulence ou plus parmi les cinq suivants : *papA/papC/papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iutA* et *kpsM II* [204].
- *UPEC* : toute souche qui possède trois gènes ou plus parmi les quatre gènes : *yfcV*, *tva*, *chuA* ainsi que *fyuA* [205].
- *APEC* : toute souche qui possède les gènes de virulence suivants : *hlyF*, *iroN*, *iss*, *ompT*, *iutA* [204].

Les amorces que nous avons utilisées pour la recherche des gènes de virulence codant pour les adhésines se trouvent dans le tableau 18.

Tableau 18 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour les andésines.

Cible	Amorce	Sequence (5'-3')	Taille (bp)	Reference
Adhesines				
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> -F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	[206]
	<i>FimH</i> -R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
<i>fimAv</i>	<i>fimA</i> 215	ACTTTAGGATGAGTACTG	226	[207]
	<i>fimA</i> 201	TCTGGCTGATACTACACC		
<i>papAH</i>	<i>PapAH</i> -F	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	720	[206]
	<i>PapAH</i> -R	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC		
<i>papC</i>	<i>papC</i> -F	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200	[206]
	<i>papC</i> -R	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
<i>papEF</i>	<i>papEF</i> -F	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	[208]
	<i>papEF</i> -R	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
<i>sfa/focDE</i>	<i>sfa</i> 1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	[209]
	<i>Sfa</i> 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
<i>afa/draBC</i>	<i>Afa</i> 1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750	[209]
	<i>Afa</i> 2	CATCAAGCTGTTTGTTTCGTCCGCCG		
<i>bfp</i>	<i>Bfp-f</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	[210]
	<i>Bfp-r</i>	GCCGCTTTACCAACCTGGTA		
	<i>tia</i> -up	GAAATGAAAAAGATTATTGCGG		
<i>yfcV</i>	<i>YfcV</i> -F	ACATGGAGACCACGTTACACC	292	[211]
	<i>YfcV</i> -R	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG		
	<i>usp-r</i>	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC		

Les amorces utilisées pour la recherche des gènes de virulence codant pour les toxines sont présentées dans le tableau 19.

Tableau 19 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour les toxines.

Cible	Amorce	Sequence (5'-3')	Taille (bp)	Reference
Toxines				
Sat	Sat-F	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT	937	[212]
	Sat-R	CATTCAGAGTACCGGGGCCTA		
<i>cnf1</i>	<i>cnf1-f2</i>	CAGGAGGTACTTAGCAGCGT	468	[213]
	<i>cnf1-rc</i>	TAATTTTGGGTTTGTATC		
<i>hlyA</i>	<i>hlyA-F</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1117	[208]
	<i>hlyA-R</i>	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
<i>hlyF</i>	<i>hlyF f</i>	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAAC		[214]
	<i>hlyF r</i>	TTTGCGGTTTAGGCATTCC		
<i>cdtB</i>	<i>cdt-s1</i>	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	[215]
	<i>cdt-as1</i>	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
	<i>cdt-s2</i>	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG		
	<i>cdt-as2</i>	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA		
<i>tsh</i>	<i>tsh03</i>	GGTGGTGCACTGGAGTGG	640	[216]
	<i>tsh15</i>	AGTCCAGCGTGATAGTGG		
<i>Vat</i>	<i>Vat-f</i>	TCAGGACACGTTTCAGGCATTCACT	1100	[217]
	<i>Vat-r</i>	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGT		
<i>ehx</i>	<i>HlyA1</i>	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	1551	[218]
	<i>HlyA4</i>	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA		
<i>subAB</i>	<i>RTsubABF</i>	GCAGATAAATACCCTTCACTTG	231	[125]
	<i>RTsubABR</i>	ATCACCAGTCCACTCAGCC		
<i>saa</i>	<i>Saa-df</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	[125]
	<i>Saa-dr</i>	ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
	<i>SAA-DR</i>	ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
<i>tia</i>	<i>tia-lo</i>	TCCATGCGAAGTTGTTATCA	1800	[219]
	<i>tia-up</i>	GAAATGAAAAAGATTATTGCGG		
	<i>usp-r</i>	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC		

Le tableau 20 répertorie les amorces employées pour la détection des gènes de virulence impliqués dans la formation de la capsule.

Tableau 20 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour la capsule

Cible	Amorce	Sequence (5'-3')	Taille (bp)	Reference
Capsule				
<i>kpsM II</i>	KpsII f	GCGCATTGCTGATACTGTTG	272	[206]
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
<i>kpsM II-K2</i>	kpsII f	GCGCATTGCTGATACTGTTG	570	[220]
	KpsII-K2r	AGGTAGTTCAGACTCACACCT		
<i>kpsM II-K5</i>	K5 f	CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA	159	[206]
	kpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
<i>neuC-K1</i>	neu1	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	[221]
	neu2	GGTGGTACATCCCGGGATGTC		
<i>kpsM III</i>	kps III f	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT	392	[206]
	kps III r	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC		
	chuA-ITU-R	TTGTAGTAACGCACTAAACC		

Le tableau 21 montre les amorces que nous avons utilisées pour la recherche des gènes de virulence codant pour les capteurs de fer se trouvent dans le tableau 21.

Tableau 21 : Séquences nucléotidiques des amorces PCR des gènes codant pour les capteurs de fer

Cible	Amorce	Sequence (5'-3')	Taille (bp)	Reference
Capteur de fer				
<i>iucD</i>	Aer f	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	[208]
	Aer r	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG		
<i>iutA</i>	aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	301	[206]
	aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
<i>iroN</i>	Ironec-f	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	665	[222]
	Ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
<i>fyuA</i>	fyuA forward	GTAAACAATCTTCCCGCTCGGCAT	850	[205]
	fyuA reverse	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA		
<i>chuA</i>	chuA-ITU-F	CTGAAACCATGACCGTTACG	652	[205]
	chuA-ITU-R	TTGTAGTAACGCACTAAACC		
	usp-r	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC		

Le tableau 22 montre les amorces utilisées pour la recherche des gènes de virulence codant pour les gènes suivants : *cvaC*, *traT*, *ompT*, *iss*, *ibeA*, *malX*.

Tableau 22 : Séquences d'amorces nucléotidiques des PCR des gènes codant pour d'autres gènes de virulence

Cible	Amorce	Sequence (5'-3')	Taille (bp)	Reference
Autres				
<i>cvaC</i>	ColV-Cf	CACACACAAACGGGAGCTGTT	680	[206]
	ColV-Cr	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		
<i>traT</i>	TraT f	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	[206]
	TraT r	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG		
<i>ompT</i>	ompT-F	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	559	[223]
	ompT-R	CCCGGGTCATAGTGTTTCATC		
<i>iss</i>	is-f	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	[224]
	is-r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA		
<i>ibeA</i>	ibe10 f	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	171	[224]
	ibe10 r	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC		
<i>malX</i> (PAI)	MALX-F	GCATGAGCAGTGCGATACATCGC	828	[213]
	MALX-R	AGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCC		
<i>usp</i>	usp-f	ACATTACGGCAAGCCTCAG	440	[225]
	usp-r	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC		

Dans notre étude, tous les fragments amplifiés par PCR sont visualisés en utilisant la technique d'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose.

6.2.11. Analyse d'amplicon par électrophorèse à courant direct :

L'agarose D-1 (Pronadisa, Conda) est utilisé, dans la préparation des gels, selon un gradient de concentration allant de 0,8 à 3 % (selon la taille des bandes attendues). Le tampon TBE 1 X est composé de (TBE 5 X : 54 g/L Tris-base (Panreac) ; 27,5 g/L d'acide borique (Panreac) ; 20 ml d'EDTA (0,5 M, pH 8) (Panreac). Du bromure d'éthidium (BioRad) a été ajouté à la solution de l'agarose à une concentration finale de 0,1-0,5 mg/ml. Les puits de gel ont été chargés avec le mélange de 10 µl d'échantillon d'ADN et 2 µl de tampon de chargement (10 % (m/v) saccharose, 0,0025 % (m/v) de bleu de bromophénol, 0,0025 % (m/v) de xylène cyanol). Deux témoins (un positif et l'autre négatif) ont été utilisés pour chaque opération. Après l'immersion du gel dans la cellule d'électrophorèse chargée en tampon TBE 1X, l'ADN migre en courant continu à 70-100 V/cm pendant le temps nécessaire pour la séparation

correcte des fragments d'intérêt. Ensuite, le gel est visualisé sur un transilluminateur ultraviolet et photographié avec un imageur Biorad (ChemiGenius (GenSnap de SynGene)).

6.2.12. Séquençage :

La technique de séquençage des produits PCR a été utilisée pour le typage MLST, pour confirmer la présence de certains gènes de résistance et de virulence et pour étudier les environnements génétiques des gènes de résistance.

Le séquençage a été réalisé par la société de séquençage GENEWIZ (Leipzig, Allemagne), qui utilise la méthode Sanger avec le système automatique ABI 3730xl DNA Analysers.

6.2.13. Analyse des séquences :

Pour l'analyse des séquences obtenues, une série de programmes bio-informatiques est nécessaire :

a. Le formatage des séquences a été réalisé à l'aide des outils systèmes informatiques pour le traitement de séquences de pages Web.

<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>.

b. L'alignement et le regroupement des séquences ont été réalisés à l'aide des outils fournis par le site web de la biologie moléculaire européenne. Laboratoire de l'Institut Européen de Bioinformatique (EMBL-EBI).

(http://www.ebi.ac.uk/Information/tools_sitemap.html).

c. L'analyse des séquences a été réalisée par comparaison avec la base de données GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ;

d. La détermination des différentes variables des gènes alléliques des bêta-lactamases par la base GenBank ;

e. L'étude des séquences types (ST) des souches d'*E. coli* a été réalisée à partir de l'extrait de la base de données MLST de l'Université College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

f. Après avoir les 7 allèles, le ST a été déterminé sur ce site : (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=profiles&scheme_id=4).

6.3. Résultats :

6.3.1. Souches d'*E. coli* d'origine bovine :

Un total de 223 souches d'*E. coli* d'origine bovine ont été analysées. Les souches d'origine bovine ont été isolées à partir de 223 échantillons de matière fécale de bovins asymptomatiques prélevées dans 03 wilayas d'Algérie (Alger, Blida, Tizi-Ouzou) soit une souche par échantillon, issus de 30 élevages différents. (Figure 9).

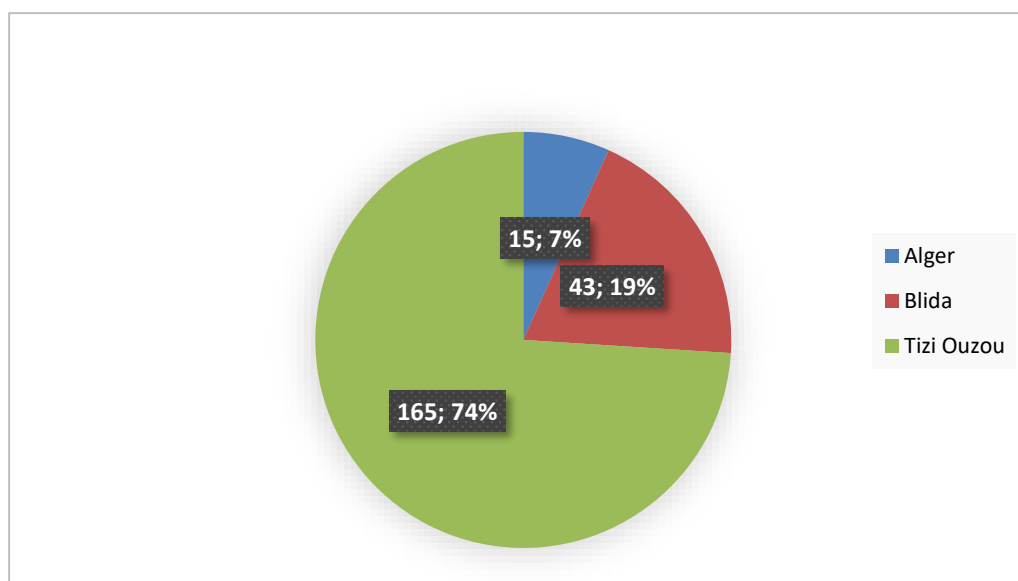


Figure 9 : Répartition des souches *E. coli* selon la wilaya d'étude

La figure 9 résume la distribution géographique des prélèvements. Les échantillons ont été collectés dans trois wilaya. La majorité des souches sont issues de la wilaya de Tizi-Ouzou (74%, n=165), suivi de la wilaya de blida (19,3%, n=43) et 15 (6,7%) souches ont été isolées des élevages issus de la wilaya d'Alger.

6.3.2. Souches d'origine humaine :

Une collection de 85 souches d'*E. coli* a été analysée, obtenue de 85 enfants présentant des diarrhées, provenant de l'hôpital de Birtraria, El Biar, Alger, durant la période de septembre 2017 à novembre 2019.

6.3.3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques :

Les niveaux de résistance aux 12 antibiotiques utilisés ont été déterminés, sur les 223 souches d'*E. coli* d'origine bovine et les 85 souches d'*E. coli* d'origine humaine, par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton (MH). Les antibiotiques testés étaient : ampicilline, céfotaxime, amoxicilline-acide clavulanique, ceftazidime, céfoxitine, imipenème, ciprofloxacine, gentamicine, streptomycine, tétracycline, triméthoprine-sulfaméthoxazole et chloramphénicol.

Sur les 223 souches d'*E. coli* isolées chez les bovins, la majorité, soit 134 souches (60,08 %), étaient sensibles à tous les antibiotiques testés. En revanche, parmi les 85 souches humaines, 52 souches (c %) ont montré une résistance à certains antibiotiques.

Les taux d'antibiorésistance de cette collection de souche sont représentés dans le tableau 23 et la figure 10.

Tableau 23 : Résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* analysées dans cette étude

Antibiotiques	Souches résistantes			
	Souches bovines		Souches humaines	
	Nombre	%	Nombre	%
Ampicilline	34	15,5	35	41,2
Amoxicilline/clavulanique acide	24	10,8	21	24,7
Cefotaxime + ceftazidime	1	0,4	3	3,5
Ciprofloxacine	7	3,1	15	17,6
Sulphamethoxazole/Trimethoprine	35	15,7	24	28,2
Tétracycline	72	32,3	40	47,1
Gentamicine	15	6,7	18	21,2
Streptomycine	41	18,4	22	25,9
Chloramphenicol	12	5,4	12	14,1
Imipenem	0	0,0	0	00
Céfoxitine	0	0,0	0	00

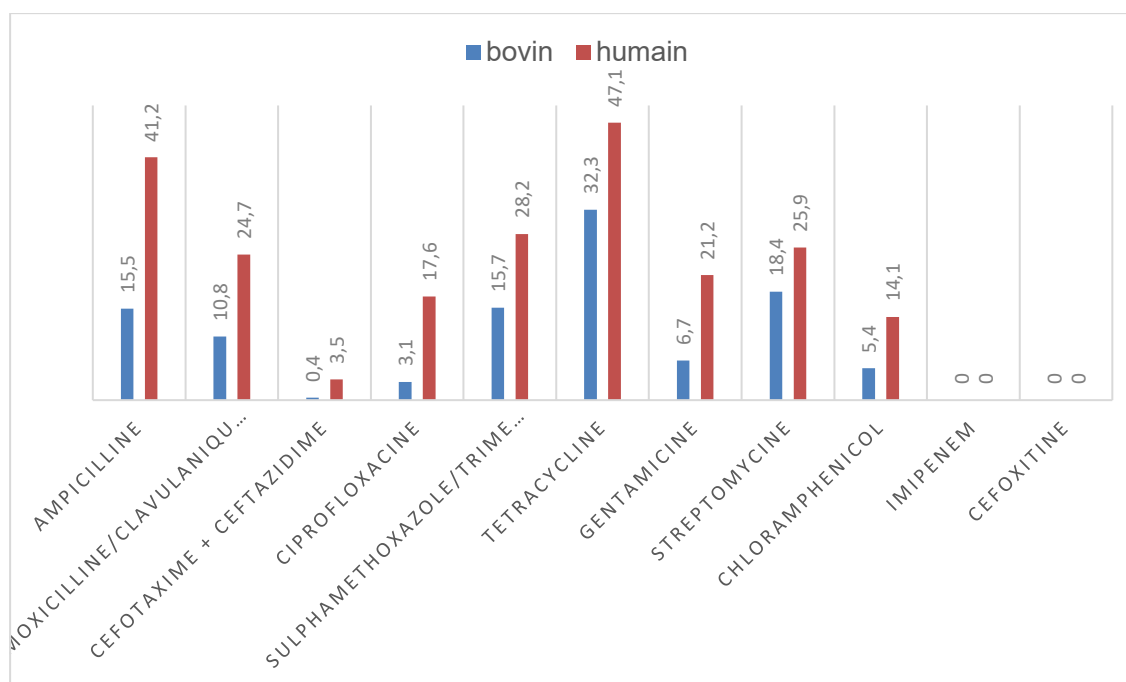


Figure 10 : Résistance globale des souches vis-à-vis des antibiotiques testés

Nous remarquons que les pourcentages de résistances chez les souches d'*E. coli* humaines sont importants par rapport aux souches d'*E. coli* bovines pour tous les antibiotiques utilisés.

Des pourcentages relativement élevés de résistance ont été observés à la tétracycline (47,1 % et 32,3 %), à l'ampicilline (41,2 % et 15,5 %), à triméthoprim-sulfaméthoxazole (28,2 % et 15,7 %) et à la streptomycine (25,9 % et 18,4 %) chez les souches d'*E. coli* humaines et les souches d'*E. coli* bovines respectivement. Et, par contre, toutes les souches ont montré une sensibilité à l'imipénème et à la céfoxitine.

6.3.3.1. Différents profils d'antibiorésistance :

a- souche bovine

Les résultats montrent des profils de résistance variés, avec la présence de souches multirésistantes (MDR) et de profils BLSE, tableau 24 et tableau 25.

Tableau 24 : Différents phénotypes d'antibiorésistance des souches bovines

Phénotype d'antibiorésistance ^{a, b}	Nbr de souches	Pourcentages
Sensible	134	60.1
TET	28	12.5
AMP-AMC-TET ¹⁷ -SXT ¹³ -STR ¹⁴ -GEN ⁴ -CHL ⁸ -CIP ³	19	8.5
AMP-TET ⁵ -SXT ⁷ -STR ⁷ -CHL ¹ -CIP ¹	8	3.6
AMP-AMC	4	1.8
AMP	1	0.4
AMP-AMC-CTX-CAZ-TET-SXT-CIP-GEN	1	0.4
AMP-TET-SXT	1	0.4
TET-SXT-STR-GEN ² -CHL ¹	13	5.8
TET-STR	4	1.8
TET-GEN-STR ² -CIP ¹	3	1.3
GEN	3	1.3
GEN-CIP	1	0.4
GEN-STR	1	0.4
CHL	2	0.9

^aAMP, ampicilline; AMC, amoxicilline/acide clavulanique, CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FOX, cefoxitine; CIP, ciprofloxacine; SXT, sulfamethoxazole/triméthoprimine; TET, tétracycline; GEN, gentamicine; STR, streptomycine; CHL, chloramphénicol. BLSE+: phenotype BLSE

^b le nombre de souches qui ont montré la résistance spécifique à l'antibiotique indiqué, au cas où toutes les souches du groupe n'étaient pas résistantes.

Le tableau 24 montre les différents phénotypes d'antibiorésistance des souches bovines. La majorité des souches bovines (n=136 ; 60,1 %) ne montrent pas de résistance aux antibiotiques utilisés. Les souches résistantes présentaient des résistances simples (tétracycline (n=28 ; 12,6 %), ampicilline-acide clavulanique (n=4 ; 1,8 %), gentamicine (n=3 ; 1,3 %), chloramphénicol (n=2 ; 0,9 %) et ampicilline (n=1 ; 0,4 %)). Mais aussi des résistances multiples.

Les résultats montrent la présence de profils de souches multirésistantes (MDR). Parmi eux, on note le profil AMP-AMC-TET¹⁷-SXT¹³-STR¹⁴-GEN⁴-CHL⁸-CIP³ qui indique une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques, notamment les bêta-lactamines, les tétracyclines, les sulfonamides et les aminosides.

Un autre profil, AMP-TET⁵-SXT⁷-STR⁷-CHL¹-CIP¹, montre une résistance à la fois aux bêta-lactamines, aux tétracyclines, aux aminosides et aux quinolones,

La présence d'une souche avec le profil AMP-AMC-CTX-CAZ-TET-SXT-CIP-GEN indique une résistance aux céphalosporines de troisième génération.

Enfin, le profil TET-SXT-STR-GEN²-CHL¹, comprenant 13 souches, rend également les traitements plus complexes, nécessitant des antibiotiques de dernier recours.

b- souches humaines :

Tableau 25 : Différents phénotypes d'antibiorésistance des souches humaines

Phénotype d'antibiorésistance a, b	Nombre de souches	% de souches
sensible	33	38.8
TET	6	7.1
AMP-AMC-CIP-SXT⁴-TET-STR⁴-CHL³ GEN⁴	5	5.9
AMP-AMC-TET-CHL²-STR²-GEN¹	6	7.1
AMP-AMC³	7	8.2
AMP-AMC-SXT-TET²-STR³-CHL²	4	4.7
AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-SXT-TET-GEN-STR¹-ESBL	3	3.5
AMP-CIP-SXT-TET-STR⁵-CHL⁵-GEN⁴	6	7.1
AMP-SXT²-TET³-STR³	4	4.7
GEN	2	2.3
SXT-TET-GEN²-STR²	4	4.7
CIP-SXT-TET	1	1.2
TET-GEN²-STR²	4	4.7

^aAMP, ampicilline; AMC, amoxicilline/acide clavulanique; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FOX, cefoxitine; CIP, ciprofloxacine; SXT, sulfamethoxazole/triméthoprim; TET, tétracycline; GEN, gentamicine; STR, streptomycine; CHL, chloramphénicol. BLSE+: *phenotype BLSE*

^b le nombre de souches qui ont montré la résistance spécifique à l'antibiotique indiqué, au cas où toutes les souches du groupe n'étaient pas résistantes.

Le tableau 25, qui présente les phénotypes d'antibiorésistance des souches d'*E. coli* humaines, montre une diversité de profils. Parmi les 85 souches étudiées, 61,2 % se sont révélées résistantes aux antibiotiques testés.

La résistance à la tétracycline (TET) seule et à la gentamicine (GEN) seule est observée chez 7.1 % et 2,3 % des souches, respectivement. Les combinaisons AMP-AMC³ et TET-GEN²-STR² représentant respectivement 8.2 % et 4.7 % des souches.

Plus complexes sont les phénotypes montrant une multirésistance, comme les profils CIP-SXT-TET (n=1 ; 1,2 %), SXT-TET-GEN²-STR² (n=4 ; 4,7 %), AMP-SXT²-

TET³-STR³ (n=4 ; 4,7 %). Des profils de résistance élevés, impliquant plus de trois familles d'antibiotiques, ont été identifiés. Parmi ceux-ci, on trouve les combinaisons AMP-AMC-CIP-SXT⁴-TET-STR⁴-CHL³-GEN⁴ (n=5 ; 5,4 %) et AMP-AMC-TET-CHL²-STR²-GEN¹ (n=6 ; 7,1 %). De plus, 4,7 % (n=4) des souches présentent une résistance aux combinaisons AMP-AMC-SXT-TET²-STR³-CHL² et AMP-AMC-SXT-TET²-STR³-CHL².

La présence de trois souches avec le profil AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-SXT-TET-GEN-STR¹ indique une résistance aux céphalosporines de troisième génération grâce à la production d'ESBL (bêta-lactamases à spectre élargi).

De plus, ces souches montrent également une résistance à d'autres familles d'antibiotiques telles que les fluoroquinolones (CIP), les sulfamides (SXT) et les aminoglycosides (GEN).

6.3.3.2. Caractérisation des gènes de résistance aux antimicrobiens des souches d'origine bovine :

La recherche des gènes de résistance a été réalisée par la PCR et le séquençage. La fréquence des gènes de résistance détectés dans 221 souches d'origine bovine et dans 82 souches d'origine humaine (non productrices de *BLSE*) est représentée dans le tableau 26 et le tableau 27 respectivement. Les 5 souches (2 d'origine bovine et 3 d'origine humaine) présentant des profils de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) seront discutées séparément.

Tableau 26 : Résultats du pourcentage des gènes de résistance aux antibiotiques identifiés sur les 221 souches d'*E. coli* non productrices de BLSE d'origine bovine

Antibiotiques	Nbr de souches résistante	Taux de résistance (%)	Gènes de résistance (Nbr. De souches / %)
Ampicilline	32	14.5	<i>bla</i> _{TEM} (24/75%) <i>bla</i> _{OXA1} (1/3.1%)
Amoxicilline/acide clavulanique	23	10.4	<i>bla</i> _{TEM} (15/65.2%)
Ciprofloxacine	6	2.7	<i>qnrS</i> (1/22.8%)
Sulphamethoxazole/Triméthopri me	33	14.9	<i>sul2</i> (18 / 54.5%) <i>sul3</i> (1/3%) <i>sul1+sul2</i> (8/24.2%) <i>sul2+sul3</i> (5/15.1%) <i>dfrA1</i> (10/30.3%) <i>dfrA12</i> (2/6%)
Tetracycline	70	31.7	<i>tetA</i> (16/22.8 %) <i>tetB</i> (16/22.8%) <i>tetA+tetB</i> (3/4.3%)
Gentamicine	14	6.3	<i>aac3-II</i> (4/28.6%)
Streptomycine	41	18.5	<i>aadA1</i> (11/26.8%) <i>aadA2</i> (2/4.9%) <i>aadA1/2</i> (5/12.2%)
Chloramphenicol	12	5.4	<i>cmlA</i> (7/58.3%)

Parmi les 221 souches d'*E. coli* bovines négatives aux BLSE, 32 (14,5 %) souches étaient résistantes à l'ampicilline (avec/sans résistance à l'AMC) et 24 d'entre elles portaient un gène *bla*_{TEM} (75 %) et 1 souche portait un gène *bla*_{OXA-1} (3,1 %). Et aucune souche ne portait les gènes *bla*_{SHV} et *bla*_{OXA-48}.

Concernant l'amoxicilline/acide clavulanique, 23 souches (10,4 %) ont présenté une résistance, dont 15 (65,2 %) portaient le gène *bla*_{TEM}.

La résistance à la tétracycline a été détectée dans 70 souches et elle était associée à la présence des gènes *tet(A)* (n= 16 ; 22,8 %), *tet(B)* (n=16 ; 22,8 %) ou *tet(A)+tet(B)* (n= 3 ; 4,3 %). Les gènes *sul2*, *sul3*, *sul1+sul2*, *sul2+sul3*, *dfrA1* et *dfrA12* ont été détectés respectivement dans 54,5 %, 3 %, 24,2 %, 15,1 %, 30,3 % et 6 % des souches

résistantes au *SXT*. Le gène *cmIA* a été détecté dans 7 des 12 souches résistantes au chloramphénicol (58,3 %), et le gène *floR* n'a pas été identifié parmi ces souches.

Le gène *aac(3)-II*, associé à la résistance à la gentamicine, a été détecté dans 4 souches (28,6 %). La résistance à la streptomycine a été détectée dans 41 souches et elle était associée à la présence des gènes *aadA1* (26,8 %), *aadA2* (4,9 %), *aadA1/2* (12,2 %). Enfin, le gène *qnrS* (22,8 %), associé à la résistance à la ciprofloxacine, a été détecté dans 1 souche (22,8 %).

Tableau 27 : Résultats des fréquences de gènes de résistance aux antibiotiques obtenus sur les 82 souches d'*E. coli* non productrices de BLSE d'origine humaine

Antibiotiques	Nbr de souches résistantes	Taux de résistance (%)	Genes de Resistance (Nbr. De souches / %)
Ampicilline	32	39	<i>bla_{TEM}</i> (24/75%) <i>bla_{OXA1}</i> (2/6,2%)
Amoxicilline/acide clavulanique	17	20,7	<i>bla_{TEM}</i> (14/82,3%) <i>bla_{OXA1}</i> (2/11,8%)
Ciprofloxacine	12	14,6	<i>qnrS</i> (6/50%) <i>qnrB</i> (1/8,3) <i>aac (6')</i> lb-cr (2/16,6)
Sulphamethoxazole/Trimethopri me	21	25,6	<i>Sul1</i> (1/4,8) <i>sul2</i> (4 / 19%) <i>sul3</i> (1/4,8%) <i>sul1+sul2</i> (3/14,3%) <i>sul2+sul3</i> (9/42,8%) <i>sul1+sul2+sul3</i> (1/4,8) <i>dfrA1</i> (2/9,5%) <i>dfrA12</i> (8/38,1%)
Tetracycline	37	45,1	<i>tetA</i> (13/35,1%) <i>tetB</i> (9/24,3%)
Gentamicine	15	18,3	<i>aac3-II</i> (9/60%)
Streptomycine	20	24,4	<i>aadA1</i> (2/10%) <i>aadA2</i> (8/40%) <i>aadA1/2</i> (2/10%)
Chloramphenicol	12	14,6	<i>cmIA</i> (4/33,3%) <i>cmIA+FloR</i> (7/58.3%)

Parmi les 82 souches d'*E. coli* humaines négatives aux *BLSE*, 32 étaient résistantes à l'ampicilline (qu'elles soient résistantes ou non à l'AMC), et 24 d'entre elles portaient le gène *bla_{TEM}* (soit 75 %), tandis que 2 (11,8 %) souches présentaient le gène *bla_{OXA-1}*. Concernant l'amoxicilline/acide clavulanique, 17 souches (20,7 %) ont montré une résistance, dont 14 (82,3 %) portaient le gène *bla_{TEM}* et 2 (11,8 %) portaient le gène *bla_{OXA-1}*.

La résistance à la tétracycline a été observée chez 37 souches, et cette résistance était associée à la présence des gènes *tet(A)* (13 souches, soit 35,1 %) et *tet(B)* (9 souches, soit 24,3 %).

Les résultats montrent une résistance significative des souches bactériennes à la combinaison sulfaméthoxazole/triméthoprim (SXT), avec 21 souches résistantes, soit une prévalence de 25,6 %. Les gènes de résistance détectés varient, avec *Sul2* (n= 4 ; 19 %) étant le plus fréquent. D'autres gènes de résistance, tels que *Sul1* (n= 1 ; 4,8 %), *Sul3* (n=1 ; 4,8 %), ainsi que des combinaisons de gènes comme *Sul2* + *Sul3* (n=9 ; 42,8 %), *Sul1* + *Sul2* (n= 3 ; 14,3 %) et *Sul1* + *Sul2* + *Sul3* (n=1 ; 4,8 %), sont également observés. Par ailleurs, les gènes *dfrA1* et *dfrA12* associés à la résistance au triméthoprim ont été détectés respectivement dans (n=2 ; 9,5 %) et (n= 8 ; 38,1 %) des souches résistantes.

La résistance à la ciprofloxacine est de (n=12 ; 14,6 %) des souches, est principalement associée aux gènes *qnrS* (n=6 ; 50 %), *qnrB* (n=1 ; 8,3 %) et *aac(6')Ib-cr* (n=2 ; 16,6 %). Pour la gentamicine, 15 souches (18,3 %) sont résistantes, avec une forte prévalence du gène *aac(3)-II* (60 % des souches résistantes). En ce qui concerne la streptomycine, 21 souches (25,6 %) sont résistantes, et cette résistance est principalement liée aux gènes *aadA1* (n= 2 ; 9,5 %), *aadA2* (n= 8 ; 38,1 %) et à la combinaison des gènes *aadA1/2* (n= 2 ; 9,5 %). Enfin, la résistance au chloramphénicol a été observée chez 12 souches (14,6 %), avec la présence du gène *cmlA* dans 4 souches (33,3 %) et à la combinaison des gènes *cmlA* et *FloR* dans 7 souches (58,3 %).

6.3.3.3. Caractérisation génétique des intégrons :

a- Souches bovines

Les intégrases des intégrons de classe 1 (*intI1*), des intégrons de classe 2 et des intégrons de classe 3 ont été analysées dans les 35 souches bovines résistantes au sulfaméthoxazole/triméthoprim. Parmi ces souches, 29 portaient l'*intI1* (82,8 %), une souche portait l'*intI2* (2,8 %) et l'*intI3* n'a pas été détecté. La région variable de l'intégron de classe 1 et de l'intégron de classe 2 a été amplifiée par PCR dans toutes les souches *intI1*-positives et *intI2*-positives. Un total de 18 amplicons a été séquencé pour obtenir les réseaux de gènes-cassettes associés. Plusieurs profils de gènes-cassettes ont été observés : *aadA1/2* (5 souches), *dfrA1-aadA1* (10 souches), *dfrA17-aadA5* (1 souche), *dfrA12-aadA2* (1 souche), *dfrA12-OrfF-aadA2-cmlA/aadA1* (1 souche) et *dfrA1-sat2-aadA1* (1 souche). Ces résultats illustrent la diversité des réseaux de gènes cassettes associés aux intégrons de classe 1 et 2 dans les souches résistantes. Figure 11

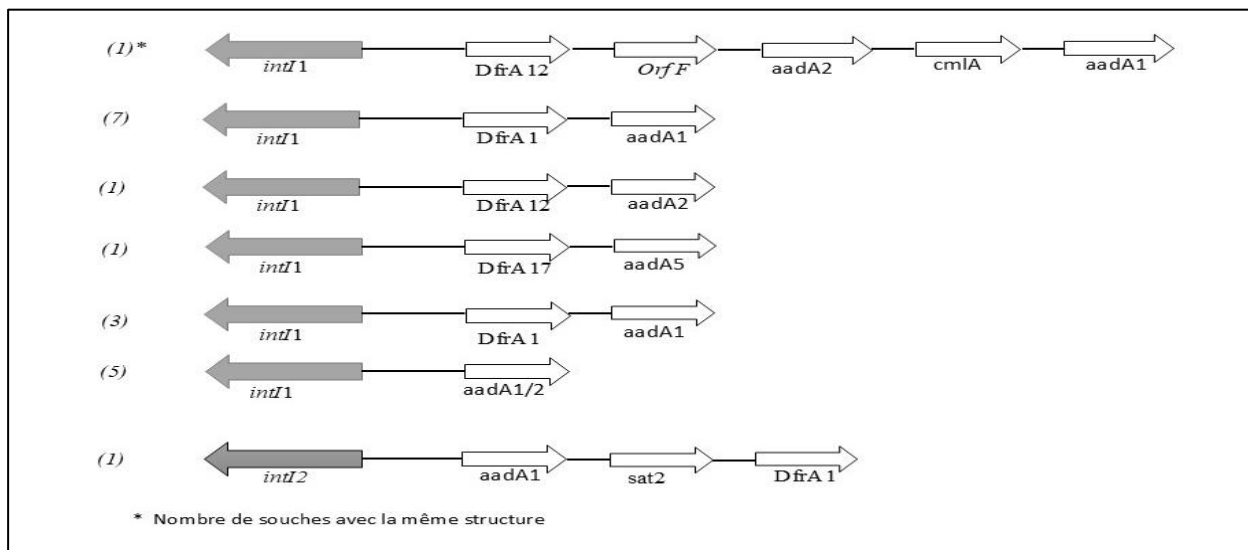


Figure 11 : Différentes structures des intégrons de classe 1 et de classe 2 des souches bovines

b- Souches humaines :

Les intégrases des intégrons de classe 1 (*intI1*), de classe 2 (*intI2*) et de classe 3 (*intI3*) ont été examinées dans un ensemble de 24 souches humaines résistantes au

sulfaméthoxazole/triméthoprine. Parmi ces souches, 21 (soit 87,5 %) contenaient l'intégrase *intI1*, tandis que 4 (16,7 %) présentaient *intI2*. En revanche, l'*intI3* n'a pas été détecté. La région variable des intégrons de classe 1 et 2 a été amplifiée par PCR dans toutes les souches positives pour l'*intI1* et l'*intI2*. Un total de 16 amplicons a ensuite été séquencé, permettant l'identification de divers réseaux de gènes-cassettes. Les profils observés incluent : *aadA1/2* (dans 2 souches), *dfrA1-aadA1* (dans 2 souches), *dfrA17-aadA5* (dans 3 souches), *dfrA12-OrfF-aadA2* (dans 1 souche), *dfrA12-OrfF-aadA2-cmlA* (dans 7 souches) et *dfrA1-sat2-aadA1* (dans 1 souche). Ces résultats révèlent une grande diversité dans les réseaux de gènes-cassettes associés aux intégrons de classe 1 et 2, suggérant des mécanismes complexes de résistance dans les souches résistantes au sulfaméthoxazole/triméthoprine. Figure 12

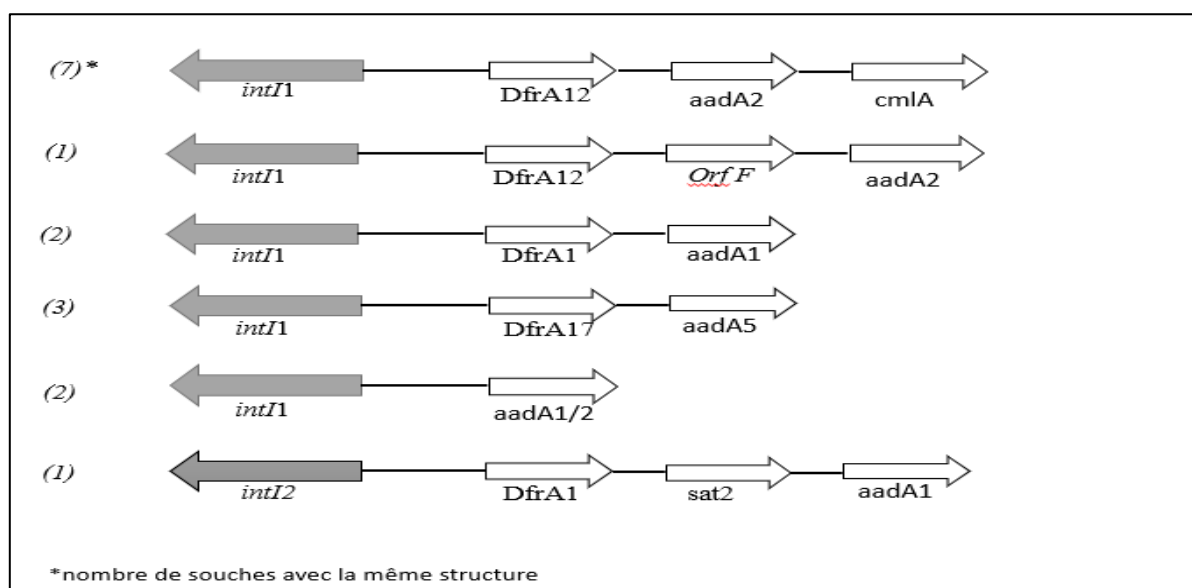


Figure 12: Différentes structures des intégrons de classe 1 et de classe 2 des souches humaines

6.3.4. Les groupes phylogénétiques :

Le regroupement phylogénétique des 223 souches d'origine bovine et des 85 souches d'origine humaine était conforme à la méthode de Clermont et collaborateurs, 2013, et les résultats sont présentés dans la Figure 13.

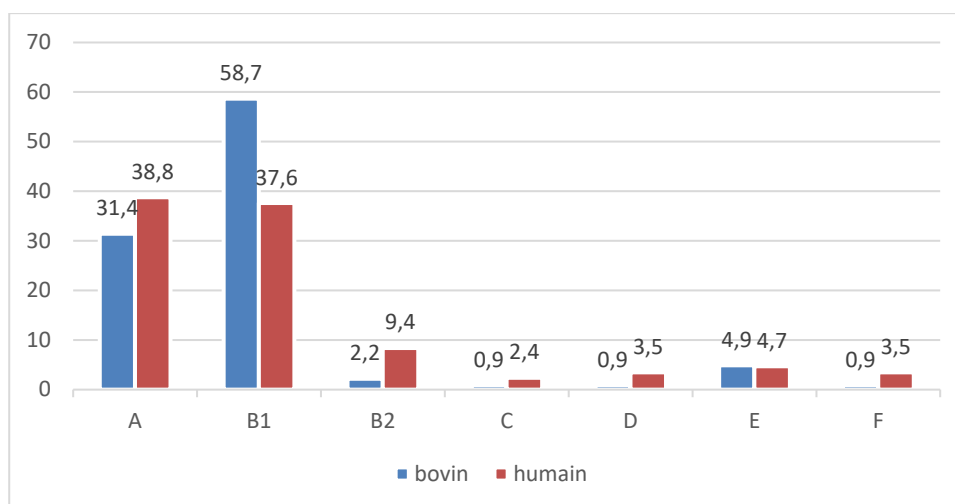


Figure 13: Groupes phylogénétiques

Dans le cadre de cette étude, les souches d'*E. coli* ont été classées en sept phylogroupes distincts afin de mieux comprendre leur répartition. Les phylogroupes A et B1 se sont révélés les plus prévalents, représentant respectivement 31,4 % et 58,7 % des souches d'origine bovine, et 38,8 % et 37,6 % des souches humaines. Notamment, 5 souches bovines (2,2 %) et 8 souches humaines (9,4 %) ont été assignées au phylogroupe B2, un groupe moins fréquent. Les autres phylogroupes, tels que C, D et F, étaient beaucoup moins fréquents, avec seulement 0,9 % de souches bovines dans chaque groupe, tandis que les souches humaines réparties dans ces phylogroupes représentaient respectivement 2,3 %, 3,5 % et 3,5 %. Ces résultats soulignent des différences intéressantes dans la répartition phylogénétique des souches humaines et bovines.

6.3.5. Corrélation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques :

Dans cette étude, nous avons analysé la résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* bovines en fonction de leur phylogroupe. Cette analyse explore la relation entre le phylogroupe et la résistance aux antibiotiques, afin de mieux comprendre comment les différents groupes génétiques d'*E. coli* se comportent face à la pression des antibiotiques. Tableau 28 et tableau 29.

Tableau 28 : La corrélation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques des souches bovines

Phylogroupe ^a	Nombre de souches (%)	Nombre de souches (%) résistantes à au moins un antibiotique	OR (95% CI)	P value	Nombre de souches résistantes par nombre de familles d'antibiotiques						Nombre et (%) de souches MDR	OR (95% CI) ^a	P value
					1	2	3	4	5	6			
A	70 (31.4)	22 (31.4)	1 (Réfèrent) ^b	-	9	2	4	3	3	1	11(15.7)	Réfèrent	Réfèrent
B1	131 (58.7)	59 (45)	1.79 (0.97-1.29)	0.06	27	11	12	4	4	1	21(16)	1.02 (0.4624 - 2.27)	0.9534
B2	5 (2.2)	3(60)	3.27 (0.51-21.0)	0.211	2	-	-	1	-	-	1(20)	309.7(32.7-2930.6)	< 0.0001
C	2 (0.9)	2(100)	10.78 (0.49-233.9)	0.130	-	-	-	2	-	-	2(100)	1023.4(47.2 -22183.4)	< 0.0001
D	2(0.9)	1(50)	2.18 (0.13-36.90)	0.587	-	1	-	-	-	-	0(0)	1023.4 (47.2 -22183.4)	< 0.0001
E	11 (4.9)	0 (0)	0.09 (0.01-1.66)	0.107	-	-	-	-	-	-	0(0)	222.5 (12.6-3940.0)	0.0002
F	2 (0.9)	2(100)	10.78	0.130	-	-	1	-	1	-	1(50)	1239(74.1-20708.6)	< 0.0001
Total	223(100)	89 (39.9)	(0.49-233.9)		38	14	17	10	8	2	36(16.1)	NA	NA

a : OR = Odds Ratio ; IC = intervalle de confiance

Les résultats montrent que le phylogroupe A, utilisé comme groupe de référence, présente une résistance modérée (31,4 %) et une proportion de souches multirésistantes (15,7 %). Les phylogroupes B1 et B2 montrent des taux de résistance plus élevés (respectivement 45 % et 60 %), mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

Les phylogroupes C et F se distinguent par une résistance totale (100 %), et notamment une forte proportion de souches multirésistantes dans F (50 %). Cependant, bien que l'OR soit élevé pour ces groupes, les p-values indiquent que ces associations ne sont pas statistiquement significatives.

Le phylogroupe D présente une résistance plus faible (50 %) et aucune souche multirésistante, ce qui suggère un impact moins marqué des antibiotiques dans ce groupe. En revanche, le phylogroupe E se distingue par une absence totale de résistance, indiquant qu'il est probablement plus sensible aux antibiotiques.

Tableau 29 : La corrélation entre les groupes phylogénétiques et la résistance aux antibiotiques des souches humaines

Phylogro upe	Nombre de souches (%)	Nombre de souches (%) résistantes à au moins un antibiotique	OR (95% CI)		Nombre de souches résistantes par nombre de familles d'antibiotiques						Nombr e et (%) de souche s MDR	OR (95% CI)	P value
					1	2	3	4	5	6			
A	33 (38.8)	21 (63.3)	1 (Réfèrent)	-	1	4	5	1	4	6	16 (76.2)	1 (Réfèrent)	(Réfèrent)
B1	32 (37.6)	14 (43.8)	0.44 (0.16-1.24)	0.1103	5	3	4	0	1	1	6 (42.9)	0.24 (0.08-0.75)	0.013*
B2	8 (9.4)	7 (87.5)	4.00 (0.44-36.5)	0.219	5	0	1	1	0	0	2 (28.6)	0.35 (0.06-2.02)	0.2423
C	2 (2.4)	1 (50.0)	0.57 (0.03-9.99)	0.7015	0	0	0	1	0	0	1 (100)	1.06 (0.06-18.4)	0.967
D	3(3.5)	2 (66.7)	1.14 (0.09-13.9)	0.917	1	0	0	1	0	0	1 (50.0)	0.53 (0.04-6.44)	0.619
E	4 (4.7)	4 (100)	5.2 (0.26-105.5)	0.280	2	0	1	1	0	0	2 (50.0)	1.06 (0.13-8.46)	0.9543
F	3 (3.5)	3 (100)	4.06 (0.19-85.4)	0.3661	1	0	1	0	1	0	2 (66.7)	2.12 (0.17-25.8)	0.5539
Total	85 (100%)	52 (61.2)	-	-	15 (17,6%)	7 (8,23%)	12 (14,%)	5 (5,88%)	6 (7,05%)	7 (8,2%)	30 (57.7)	-	-

Le tableau 29 montre la répartition de la résistance aux antimicrobiens selon les groupes phylogénétiques d'*E. coli* humaines. Le phylogroupe A (référence) est statistiquement significatif. Le phylogroupe B1 a une résistance plus faible (43,8 %) et un taux de multirésistance réduite (42,9 %), avec une association significative (OR = 0,24, $p = 0,013$). Les phylogroupes B2, C, E et F montrent des résistances élevées (jusqu'à 100 %), mais les résultats sont souvent non significatifs en raison de petites tailles d'échantillons.

6.3.6. Caractéristiques des souches productrices des BLSEs

Dans notre étude, 5 souches d'*E. coli* (2 souches bovines et 3 souches humaines) parmi les souches isolées ont présenté un profil de β -lactamases à spectre élargi (BLSE). Le tableau 30 représente leur profil de résistance aux antibiotiques, les gènes de résistance identifiés, ainsi que leur typage phylogénétique et les gènes de virulence associés.

Tableau 30 : Caractérisation des souches BLS

Code de la souche	Origine	teste BLSE	Phenotype ^a d'antibiorésistance	Gènes de résistance	Integron (Gene-cassette)	MLST	Groupe Phylogénétique	Serotype ^b	Genes de virulence associés
X2525	Bovin (Tizi-Ouzou)	+	AMP-SXT-TE	blaSHV12, tetA, sul3	Int1	ST48	A	O11:H16	<i>fimH</i> ,
X2535	Bovin (Blida)	+	AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-SXT-TE-GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>tetB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aac3-II</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Int1 (<i>dfrA17-aadA5</i>)	ST617	A	O101:H10	<i>lucD</i> , <i>traT</i> , <i>malX</i> , <i>iutA</i>
X2708	Humain	+	AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-SXT-TE-GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA1} , <i>tetB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aac3-II</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> ,	Int1 (<i>dfrA17-aadA5</i>)	ST1845	A	O101:H10	<i>lucD</i> , <i>traT</i> , <i>malX</i> , <i>iutA</i>
X2709	Humain	+	AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-SXT-TE-GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA1} , <i>tetB</i> , <i>tetA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aac3-II</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> ,	Int1 (<i>dfrA17-aadA5</i>)	ST1845	A	O101:H10	<i>lucD</i> , <i>traT</i> , <i>malX</i> , <i>iutA</i>
X2784	Humain	+	AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-SXT-TE-S-GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aac3-II</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> ,	Int1 (<i>dfrA17-aadA5</i>) Int2 (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)	ST1845	A	ONT:H10	<i>lucD</i> , <i>traT</i> ,

^aAMP, ampicilline; AMC, amoxicilline/acide clavulanique, CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacine; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; TET, tetracycline; GEN, gentamicine; CHL, chloramphenicol

^b ONT, l'antigène O non typable

Les résultats représentés dans le tableau 30 concernent 5 souches d'*E. coli* BLSE, 2 souches d'origine bovine et 3 souches humaines. Ces souches ont toutes été testées positives pour la production de β -lactamases à spectre étendu (ESBL), ce qui les rend résistantes à un large éventail d'antibiotiques, en particulier les céphalosporines. En plus de la résistance aux bêta-lactamines, ces souches montrent également une résistance à de nombreuses autres classes d'antibiotiques, y compris les fluoroquinolones (ciprofloxacine), les aminoglycosides (gentamicine), les tétracyclines et les sulfamides. Les gènes de résistance identifiés incluent des blaCTX-M-15, blaOXA-1, tetA, tetB, sul1, sul2, aac3-II et aac (6')-Ib-cr, qui confèrent une résistance étendue à ces classes d'antibiotiques. Ces gènes sont souvent portés par des intégrons, notamment IntI1 et IntI2, qui facilitent l'acquisition et la diffusion de nouveaux gènes de résistance, ce qui constitue un mécanisme d'adaptation rapide pour ces bactéries.

En plus de leur profil de résistance, ces souches portent des gènes de virulence, tels que lucD, lutA, TraT et MalX, qui favorisent la colonisation et la survie de la bactérie dans l'hôte. Ces gènes sont impliqués dans l'absorption du fer (lucD, lutA), la résistance au système immunitaire de l'hôte (TraT) et l'adhésion bactérienne (MalX), renforçant ainsi leur potentiel pathogène, notamment dans les infections urinaires et gastro-intestinales.

Le typage moléculaire par MLST révèle des types de séquence (ST) comme ST617, ST1845 et ST48 qui sont associés à des souches particulièrement virulentes et multirésistantes. Toutes les souches appartiennent au groupe phylogénétique A, qui regroupe des souches d'*E. coli* commensales, mais certaines d'entre elles peuvent devenir pathogènes lorsqu'elles acquièrent des gènes de virulence et de résistance.

Les sérotypes identifiés, notamment O11 :H16 et O101 :H10, sont fréquemment associés à des souches pathogènes.

6.3.7. Caractérisation génétique des gènes de virulence :

Les 223 souches d'*E. coli* bovines et 85 souches d'*E. coli* humaines ont été testées pour la présence des gènes de virulence connus comme spécifiques des EHEC (Stx1, stx2 et le gène eae). Tableau 31

Sur les 223 souches d'*E. coli* bovines examinées, 18 d'entre elles portant des gènes de virulence ont été détectées, ce qui représente un taux de 8,07 %. Sur les 18 souches, 8 (soit 3,6 %) sont attribuées au pathotype STEC, dont 3 sont classées comme EHEC atypiques. De plus, 10 souches (ce qui représente 4,5 %) appartiennent au pathotype EPEC.

Les 8 souches STEC appartenait au phylogroupe B1 et présentaient 6 sérotypes différents : O8 :H8 (n=2), O138 :H8 (n=2), O23 :H8 N (n = 1), O55 :H12 (n=1), O113 :H21 (n=1) et O150 :H8 (n=1).

La recherche par PCR/séquençage des gènes de virulence a indiqué que 4 souches STEC hébergeaient le gène *stx1* avec deux sous-types *stx1* (*stx1a*, *stx1b*) et 4 autres souches portaient *stx2* avec deux sous-types *stx2* (*stx2a* et *stx2b*).

Concernant les gènes de la virulence associés aux souches STEC, toutes les souches étaient *eae* négatives. Cependant, la détection du gène *saa* dans 3 (1,3 %) souches spécifiques les distingue comme des *EHEC atypiques*. Les *fimbriae* de type 1 (*fimH*) et les hémolysines *HlyA* et/ou *HlyF* étaient présents dans toutes ces souches et aucune ne portait le gène *ehx*. La présence de cytotoxine subtilase (*subAB*), de *cnf1*, de *tra*, de *iucD* a été identifiée 4 fois. Le déterminant *tia* a été détecté dans 3 souches. 6 gènes de virulence, *cdtB*, *iutA*, *fuyF*, *iroN*, *iss* et *ompt*, ont été détectés 2 fois pour chacun d'entre eux.

Pour ce qui est des souches EPEC, aucune souche ne portait le gène *bfp*. Elles étaient toutes des EPEC atypiques (aEPEC) et elles appartenait aux séropathotypes B1 (O157 : HNM (n=4), O76 :H7, O85 :H18, ONT : HNM) et A (O10 : HNM, O7 :H4, O138 :H8).

Le screening par la PCR/séquençage des gènes de virulence indiquait que :

- 5 souches portaient le gène *eae* avec un sous-type *eae beta 1*, dont 4 étaient associés aux *ehx*, *fimH*, *malX*, *fyuA* et *hlyF* et un était associé aux *fimH*, *malX* ;
- 2 souches portaient le gène *eae* avec un sous-type *eae iota-1-C*, associé aux *tia*, *fimH*, *iucD*, *hlyF*, et *tia* et *fimH* successivement ;
- 1 souche portait le gène *eae* avec un sous-type *eae gamma* associé aux *subAB*, *fimH*, *KpsM II*, *K5*, *traT* et *hlyF* ;

- 1 souche portait le gène *eae* avec deux sous-types *eae gamma* et *eae theta* associés aux *ehx*, *fimH* et *hlyF* ;
- 1 souche portait le gène *eae* avec un sous-type *eae-omicron*, associé aux *subAB*, *fimH*.

Le gène *fimH* codant pour les fimbriae était le gène le plus fréquent, détecté chez toutes les souches, suivi de l'hémolysine (*hlyF*) et une seule souche appartenait au *K5*.

Le résultat d'association des gènes de virulence montre que deux souches sont classées STEC et APEC en même temps (STEC/APEC). Tableau 31

Parmi les 85 souches humaines, une (1,17 %) souche (X2557) virulente a été identifiée. Elle appartenait au pathotype aEHEC. Cette souche portait les gènes de virulence suivants : *stx1* (*stx1a*, *stx1c*), *saa*, *FimH*, *cnf1*, *cdtB*, *iucD*, *traT*, *hlyF* et *iutA*.
Tableau 31

Tableau 31 : les caractéristiques des souches virulentes

Numéro et origine des souches	Gènes de virulence				Phylogroupe	Serotype	Pathotype	Pathotype hybride
	Stx1	Stx2	eae	Autres gènes				
X2321 (B)	<i>Stx1a, stx1b</i>			<i>hlyA, fimH, fyuA, hlyF</i>	B1	O23:H8	STEC	/
X2504 (B)	<i>stx1a, stx1b,</i>			<i>hlyA, subAB, tia, fimH cnf1, iucD, traT, fyuA fyuF, iroN, iss, ompT</i>	B1	O8:H8	STEC	APEC
X2318 (B)	<i>stx1a, stx1b,</i>			<i>hlyA, subAB, fimH cnf1, iucD, traT, fyuA fyuF, iroN, iss, ompT</i>	B1	O8:H8	STEC	APEC
X2485 (B)	<i>stx1a, stx1b</i>			<i>,tia, saa, fimH, cnf1, cdtB, iucD, traT, iutA, hlyF</i>	B1	O55:H12	aEHEC	/
X2366 (B)		<i>stx2a, stx2b,</i>		<i>fimH, cnf1, cdtB, iucD traT, iutA, hlyF</i>	B1	O138:H8	STEC	/
X2487 (B)		<i>stx2a, stx2b,</i>		<i>tia, subAB, fimH</i>	B1	O138:H8	STEC	/
X2472 (B)		<i>sxt2a, stx2b,</i>		<i>subAB, hlyA, saa, fimH cdtB, hlyF</i>	B1	O113:H21	aEHEC	/
X2513 (B)		<i>stx2a, stx2b,</i>		<i>saa, fimH, traT, hlyF</i>	B1	O150:H8	aEHEC	/
X2457 (B)			<i>eae beta 1</i>	<i>ehx, fimH, malX, fyuA, hlyF</i>	B1	O157:HNM	aEPEC	/
X2464			<i>eae beta 1</i>	<i>ehx, fimH, malX, fyuA, hlyF</i>	B1	O157:HNM	aEPEC	/

Suite Tableau 31

X2469 (B)			<i>eae beta 1</i>	<i>ehx, fimH, malX, fyuA, hlyF</i>	B1	O157:HNM	EPECa	/
X2473 (B)			<i>eae beta 1</i>	<i>ehx, fimH, malX, fyuA, hlyF</i>	B1	O157:HNM	EPECa	/
X2364 (B)			<i>eae beta 1</i>	<i>fimH, malX</i>	B1	O76:H7	EPECa	/
X2323 (B)			<i>eae gamma-theta</i>	<i>ehx, fimH, hlyF</i>	A	O10:HNM	EPECa	/
X2376 (B)			<i>eae gamma,</i>	<i>subAB, fimH, KpsM II, K5, traT, hlyF</i>	A	O7:H4	EPECa	/
X2497 (B)			<i>eae iota-1-C,</i>	<i>tia, fimH,</i>	A	O138:H8	EPECa	/
X2381 (B)			<i>eae iota-1-C,</i>	<i>tia, fimH, iucD, hlyF</i>	B1	ONT:HNM	EPECa	/
X2480 (B)			<i>Eae-omicron,</i>	<i>subAB, fimH,</i>	B1	O85:H18	EPECa	/
X2557 (H)	<i>stx1a, stx1b</i>			<i>Saa, hlyF, iutA, traT, iucD, cdtB, cnf1, fimH</i>	B1	O55 :H12	EHECa	/

(B) : Bovin

(H) : Hunain

6.3.8. Caractérisation des souches appartenant au phylogroupe B2 :

L'étude des 13 souches d'*E. coli* appartenant au phylogroupe B2, représentées dans le Tableau 32, permet d'identifier les principales caractéristiques de virulence et de résistance des souches étudiées.

Tableau 32 : Les caractéristiques des souches appartenant au phylogroupe B2

Code De la souche	Origine	Phenotype de l'antibioresistance ^a	Gènes de résistance	MLST	Serotype	Pathotype
X2325	Bovin (Alger)	AMP-AMC-TE	<i>bla_{TEM}</i>	ST998	ONT:H6	UPEC
X2384	Bovin (Tizi-Ouzou)	AMP	<i>bla_{TEM}</i>	ST14	O18 :HNM	UPEC
X2393	Bovin (Tizi-Ouzou)	Sensible	-	ST95	O2 : H5	UPEC
X2509	Bovin (Alger)	CHL	-	ST95	O2 : H5	UPEC
X2515	Bovin (Blida)	Sensible	-	ST95	O2 : H5	UPEC
X2553	Humain	Sensible	-	ST998	O8 : H9	UPEC
X2564	Humain	TET	<i>tetB</i>	ST131	O25 :H4	UPEC/APEC
X2566	Humain	AMP-AMC-CIP-TET-GEN	<i>oxa1, tetA, aac3-II, aac(6')-Ib-cr</i>	ST131	O25:H4	UPEC
X2710	Humain	SENSIBLE	-	ST66	O4 /H5	UPEC
X2721	Humain	Sensible	-	ST73	O6/ H1	UPEC
X2783	Humain	AMP	<i>bla_{TEM}</i>	ST14	O75:HNM	UPEC
X2788	Humain	AMP-AMC-TET-STR-GEN	<i>bla_{TEM}</i>	ST73	O6:H1	UPEC
X2790	Humain	AMP-AMC	<i>bla_{TEM}</i>	ST73	O6:H1	UPEC

Le tableau 32 représente 13 souches d'*E. coli* appartenant au phylogroupe B2. Elles sont réparties entre 6 souches bovines (46 %) et 7 souches humaines (54 %). Elles sont toutes classées sous le pathotype UPEC, dont une souche humaine présente un profil hybride (UPEC/APEC).

Les souches bovines, principalement de types ST95, ST998, et ST14, affichaient des profils de résistance variés, notamment à l'ampicilline (AMP) et à la tétracycline (TE), et sont associées à des sérotypes tels que O2 :H5 et O18 :HNM.

Parmi les souches humaines, 71 % (5 sur 7) montrent des profils de résistance, notamment à l'ampicilline (AMP), la tétracycline (TET), la ciprofloxacine (CIP) et la gentamicine (GEN). En ce qui concerne les gènes de résistance, la souche X2566 (humaine) se distingue par sa multirésistance, portant plusieurs gènes (*oxa1*, *tetA*, *aac3-II*, *aac(6')-Ib-cr*).

Les souches humaines présentent également une diversité génétique plus marquée, avec des sérotypes comme O25 :H4 (ST131), associés à des souches multirésistantes de type UPEC.

6.4. Discussion :

6.4.1. Échantillonnage :

Pour la recherche et l'étude des *Escherichia coli* entérohémorragiques (*EHEC*) chez les bovins, la représentativité de notre échantillon est discutable, puisque la sélection des élevages prélevés n'a pas été aléatoire, car les données concernant les éleveurs et les différents cheptels n'existaient pas.

Cependant, notre échantillon étant suffisamment grand par rapport à la sous-population totale, nos résultats sont assez précis.

Tout au long de l'étude, la collecte des échantillons s'est effectuée dans le respect des règles d'hygiène et de conservation de la chaîne du froid, du prélèvement jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

6.4.2. Antibiorésistance :

La résistance aux antibiotiques est l'une des menaces les plus pressantes pour la santé publique mondiale [226]. L'utilisation excessive d'antibiotiques dans les secteurs humain et vétérinaire a conduit à une augmentation préoccupante de la résistance bactérienne, tant dans les hôpitaux que dans les élevages.

Dans cette étude, les souches humaines montrent une plus grande résistance à la plupart des antibiotiques par rapport aux souches bovines. Ce phénomène est particulièrement marqué pour des antibiotiques comme l'ampicilline (41,2% des souches humaines contre 15,5% des souches bovines), la ciprofloxacine (17,6% contre 3,1%) et la tétracycline (47,1% contre 32,3%). Ce qui peut être attribué à l'usage plus fréquent d'antibiotiques dans les soins médicaux humains.

Sur les 223 souches d'*E. coli* isolées des prélèvements fécaux de bovins asymptomatiques, 134 (60,1 %) souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés et 89 (39,9 %) étaient résistants à au moins 1 agent antimicrobien, dont 36 (40,9 %) étaient multirésistants. Cette étude montre un taux de résistance aux antimicrobiens inférieur à ceux enregistrés chez la volaille et le porc par Tamta et *al.* (2020) [227] et Vounba et *al.* (2019) [228]. Cela pourrait s'expliquer par la faible utilisation d'antibiotiques dans l'élevage bovin comme facteurs de croissance.

Le taux de résistance des *E. coli* le plus élevé a été mis en évidence pour la tétracycline, soit un taux de 32,3 %. Ce résultat peut être expliqué par l'utilisation élevée de cet antibiotique dans la production animale [229]. Ceci n'est pas conforme au faible taux de résistance aux tétracyclines de 20 % enregistré, dans les matières fécales bovines, par Suzuki et al. en 2022 [230]. Cependant, cette valeur était proche de celle rapportée par Amador et al. en 2019 [231], qui ont observé un taux de résistance de 23,1 % des *E. coli* dans le fumier de bovins. En revanche, Shin et al. (2014) ont rapporté des taux de résistance plus élevés parmi les souches d'*E. coli* vis-à-vis de la tétracycline, atteignant 54,5 % [232]. Les résultats de cette étude ont montré également un taux de résistance élevé pour la streptomycine, 49 (21,9 %) après la tétracycline.

Une résistance très élevée des *E. coli* à la streptomycine et à la tétracycline, respectivement 98,25 % et 98,09 %, a été rapportée par Shahrani et al. (2014) [233], chez des veaux diarrhéiques en Iran. La variation rapportée par ces études pourrait être due aux différences dans les pratiques agricoles et à l'application des réglementations sur l'utilisation des antimicrobiens chez les animaux dans ce pays, telles que l'usage intensif d'antibiotiques en élevage et leur utilisation comme facteurs de croissance.

Dans l'est de l'Algérie, Barour et al. (2019) [234] ont signalé, dans les matières fécales bovines, des taux de résistance des *E. coli* proches de nos résultats pour l'amoxicilline/ acide clavulanique, le sulfaméthoxazole/triméthoprim et le chloramphénicol, respectivement 11,62 %, 15,15 % et 4,04 %. La même étude a montré un pourcentage plus élevé de résistance à l'ampicilline (59,09 %), de résistance à la tétracycline (43,43 %).

Les souches d'*E. coli* bovines *étaient* moins résistantes aux céphalosporines, en particulier au céfotaxime et à la ceftazidime (0,4 %). Les *E. coli* producteurs de BLSE étaient de 2 (0,9 %). En Allemagne, Hille et al. (2018) [235] rapportent une très haute résistance des *E. coli* au céfotaxime dans 70 % des échantillons fécaux des fermes élevant des bovins de boucherie et dans 85 % des fermes élevant des bovins laitiers.

Concernant les souches humaines, sur un total de 85 souches *E. coli* étudiées, 61,2 % des souches ont montré une résistance à au moins un antibiotique dont 57,7%

étaient multirésistantes. Nos résultats sont proches des résultats rapportés par Zelelie et *al.* en 2023 en Ethiopie [236], dans le cadre d'une étude réalisée sur des enfants présentant des diarrhées.

Les souches humaines étaient résistantes à l'ampicilline (41,1%), à la tétracycline (47,7%), au triméthoprim-sulfaméthoxazole (28,2%), à la ciprofloxacine (17,6%), à la streptomycine (25,9%) et à la céfotaxime et à la ceftazidime (3,5%).

De plus, cette résistance n'est pas un phénomène isolé, car des études menées en Algérie [237] et dans d'autres pays, comme en Éthiopie [236], en Égypte [238] et au Mexique [239], ont également observé des résistances similaires, ce qui souligne un problème mondial de résistance aux antimicrobiens. Cela pourrait poser un défi majeur dans la gestion des infections diarrhéiques.

L'analyse moléculaire a révélé que la résistance à l'ampicilline chez les *E. coli* d'origine humaine est principalement associée au gène blaTEM (68,6 %) et au gène blaOXA1 (8,6 %), tandis que chez les bovins, blaTEM prédomine (75 %). Concernant la ciprofloxacine, les gènes qnrS, qnrB et aac(6')Ib-cr sont fréquents chez les souches humaines, tandis que chez les bovins, seul qnrS est impliqué. De même pour sulfaméthoxazole/triméthoprim, les souches humaines présentent une plus grande diversité de gènes (notamment sul2 et dfrA12) que les souches bovines. Pour la tétracycline, les gènes tetA et tetB sont présents dans les deux groupes (souches humaines et souches bovines), mais à des niveaux plus élevés chez les humains (45,1 % contre 31,7 %). Enfin, les souches humaines montrent également une plus grande diversité de gènes pour la gentamicine (aac(3)-II) et la streptomycine (aadA1, aadA2).

L'intégron de classe 1 (intl1) est prédominant, retrouvé respectivement dans 87,5 % des souches humaines et 82,8 % des souches bovines, résistantes au triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT), tandis que l'intl2 est moins fréquent (16,7 % dans les souches humaines contre 2,8 % dans les bovines), suggérant une diversité génétique plus importante des intégrons dans les souches humaines. L'absence d'intl3 dans les deux groupes de souches confirme l'homogénéité de ces souches par rapport aux intégrons de classe 3.

En ce qui concerne les profils de gènes-cassettes, les deux populations présentent une diversité de mécanismes de résistance, bien que leur distribution varie. Les souches humaines montrent une plus grande variété de combinaisons de gènes,

avec des profils comme *dfrA12-OrfF-aadA2-cmlA/aadA1* retrouvés dans 7 souches humaines, contre seulement 1 souche bovine. Ce profil en particulier, qui combine des gènes de résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, pourrait refléter un phénomène de multiplicité de résistances plus prononcé chez les souches humaines. En revanche, chez les souches bovines, certains profils comme *dfrA1-aadA1* sont plus fréquents, observés dans 10 souches, ce qui indique une transmission ou une sélection plus homogène des gènes de résistance parmi les souches bovines.

De plus, bien que les réseaux de gènes-cassettes comme *aadA1/2* et *dfrA17-aadA5* soient communs aux deux groupes, leur prévalence varie. Le gène *aadA1/2* est détecté dans 5 souches bovines et 2 souches humaines, et *dfrA17-aadA5* est plus représenté parmi les souches bovines (3 souches) que chez les souches humaines (1 souche), suggérant que certains gènes cassettes sont plus localisés à une population d'hôtes spécifique.

Dans cette étude, l'isolement des souches d'*E. coli* a été réalisé sur des milieux sans additifs de céphalosporines de troisième génération pour la détection des BLSE, ce qui pourrait expliquer la faible fréquence des BLSE identifiées (0,9% des souches bovines et 3,5% des souches humaines). Un milieu de culture supplémenté en céfotaxime pourrait permettre une détection plus efficace d'*E. coli* BLSE.

Parmi les 5 souches productrices de BLSE identifiées dans cette étude, 4 contenaient le gène *bla_{CTX-M-15}* tandis que 1 (une) portait le gène *bla_{SHV-12}*. Le CTX-M-15 est l'enzyme CTX-M la plus importante en raison de sa grande diffusion et de sa relation avec des épidémies et des infections extra-intestinales graves [240], [241], [242], [243]. En Algérie, Rebbah et al. (2017) [244] rapportent un taux de 27,5 % de BLSE chez les *Escherichia coli* isolées à partir de carcasses bovines, où les types CTX-M, CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-24 et CTX-M-32 ont été détectés.

La souche porteuse du gène *bla_{SHV-12}* était phénotypiquement sensible au CAZ et au CTX, mais affichait un test de dépistage des BLSE positif, présentant une forme caractéristique de bouchon de champagne. Chez les bovins, le *bla_{SHV12}* est l'une des sources de gènes associés aux BLSE [241], [245]. À notre connaissance, il s'agit du premier rapport d'un génotype de BLSE associé au gène *bla_{SHV-12}* retrouvé dans les fèces de bovins asymptomatiques en Algérie.

Le CTX-M-15 a été signalé sur tous les continents et dans toutes les principales niches écologiques (humaines, animales et environnementales) [246], [247], [248]. Ces *E. coli* BLSE positives productrices de CTX-M-15 sont une menace pour la santé animale et publique, impliquant la circulation de souches d'*E. coli* résistantes entre différentes niches écologiques, ce qui se manifeste actuellement sous le prisme de l'approche « One Health » [249], [250], [251], [252], [253], [254].

Les bactéries productrices de BLSE, en particulier *Escherichia coli*, étaient initialement observées principalement dans des souches cliniques humaines. Cependant, les BLSE ont considérablement augmenté chez les animaux de rente, ce qui en fait un réservoir naturel et contribue à leur propagation. [255]

Il est intéressant de noter que les 5 souches productrices de *BLSE* étaient multirésistantes (MDR) avec les gènes de résistance blaOXA-1, tet B, sul1, sul2, tet A et aac3-II. Une observation similaire a déjà été rapportée par Ibrahim et al. (2016) [256] et Lee et al. (2020) [257].

La présence des souches productrices de BLSE dans les systèmes de production bovine présente un risque de transfert horizontal des gènes BLSE et souligne l'importance de la surveillance génomique [258].

8.4.3. Groupes phylogénétiques

Les résultats de cette étude montrent une répartition phylogénétique variée des souches d'*Escherichia coli*, avec une prédominance des phylogroupes A et B1, qui étaient les plus fréquents tant dans les souches bovines que humaines. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études, qui montrent que ces deux phylogroupes dominent dans diverses populations humaines et animales, notamment bovines [259] [244], [260]. Le phylogroupe B2, généralement associé à des infections plus graves, a été retrouvé à une fréquence relativement faible dans les souches bovines (2,2 %) et humaines (9,4 %), ce qui est également en accord avec des recherches antérieures qui rapportent la rareté de ce groupe, bien qu'il soit d'une grande importance clinique [16], [260], [261].

Les souches d'*Escherichia coli* de type B2 provenant des animaux peuvent être à l'origine de la plupart des gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens détectés dans les souches d'*E. coli* uropathogènes humaines [262].

Des résultats similaires sur les souches d'*E. coli* associées à la mammite chez les bovins appartenant aux groupes B1 (35,9 %) et A (31,5 %) ont été rapportés par Lan et al. (2020) [263]. De plus, au Brésil, selon Tomazi et al. (2018), la plupart des souches bovines d'*E. coli* ont été attribuées aux phylogroupes A (52 %) et B1 (38 %) [260].

Notre étude montre que la majorité des souches d'*E. coli* multirésistantes appartenaient aux phylogroupes A (50 %) et B1 (35,6 %). À Pékin, 58,6 % des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques appartenaient au groupe B1 et 35,7 % au groupe A [264]. De plus, en Espagne, les souches d'*E. coli* présentant une multirésistance ont été classées dans les groupes phylogénétiques A ou B [265]. La combinaison de différentes phylogénies et résistances antimicrobiennes d'*E. coli* pourrait améliorer la reconnaissance de nouveaux sous-groupes de bactéries virulentes.

Les cinq souches d'*Escherichia coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées dans notre étude ont toutes été attribuées au phylogroupe A, confirmant les observations antérieures ayant mis en évidence la prédominance de ce phylogroupe au sein du microbiote intestinal bovin [16], [266], [267].

Les souches bovines productrices de BLSE, portant les gènes blaCTX-M-15 et blaSHV-12, appartiennent respectivement aux ST617/phylogroupe A et ST48/phylogroupe A, tandis que les trois souches humaines appartiennent au couple ST1845/phylogroupe A. Le gène blaCTX-M-15 est souvent détecté en milieu hospitalier, où il est associé au ST131/B2 [268]. Des résultats similaires ont été rapportés par Taghadosi et al. (2019) [269], en Iran. De plus, ce ST (ST617) est également largement distribué parmi diverses espèces de bétail et chez les humains dans de nombreux pays africains [270]–[273].

Les souches bovines (n=5) appartenant au groupe phylogénétique B2, trois ont été attribuées à ST95, tandis que les deux ont été attribuées à ST14 et ST998. Les souches d'*E. coli* appartenant aux lignées ST95/B2, ST14/B2 et ST998/B2 sont fréquemment rapportées dans les souches d'origine humaine. [274]–[276].

Aucune corrélation statistique n'a été trouvée entre les groupes phylogénétiques et la fréquence de résistance à un agent antimicrobien.

Les souches humaines d'*E. coli* présentent généralement une plus grande résistance aux antibiotiques et un taux de multirésistance plus élevé (57,7 %) par rapport aux souches bovines (16,1 %). Les phylogroupes B2, E et F montrent des résistances particulièrement élevées chez les souches humaines. Cependant, certaines souches bovines, notamment dans les groupes C, D et F, présentent également des taux préoccupants de multirésistance. Les souches humaines du phylogroupe B1 sont significativement moins multirésistantes que celles du phylogroupe A.

8.4.4. Virulence

Aucune des souches d'*E. coli* isolées et identifiées dans cette étude n'appartenait au pathotype EHEC typique, qu'elles aient été isolées de bovins ou d'humains. L'absence de souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques typiques (tEHEC) dans les échantillons fécaux humains et bovins peut être expliquée par plusieurs facteurs liés à la variabilité des souches, aux conditions environnementales et à la méthodologie de recherche utilisée.

Les EHEC typiques ne représentent qu'une sous-population d'*E. coli* et sont définis par la présence de gènes de virulence spécifiques, notamment ceux codant pour la toxine Shiga (stx1 et stx2) et le locus de virulence LEE (Locus of Enterocyte Effacement, *LEE*) [277]. L'absence de l'association des gènes de virulence (*stx* et *eae*) dans les souches isolées dans cette étude explique pourquoi elles ne sont pas classées comme des *EHEC*. En outre, la présence d'*EHEC* chez les bovins, bien qu'ils soient des réservoirs bien connus des *EHEC*, varie considérablement en fonction de nombreux facteurs comme la gestion de l'élevage, les pratiques alimentaires et les conditions sanitaires, ce qui peut affecter leur détection. Certaines souches d'*EHEC* sont présentes en faible quantité dans les matières fécales des bovins asymptomatiques, ce qui complique leur détection [138].

La détection des *EHEC* dans les matières fécales des enfants diarrhéiques peut également être sous-estimée, car ces infections peuvent être dues au sérotype O157:H7, dont la détection nécessite des méthodes spécifiques, telles que les techniques immunologiques, qui n'ont pas été utilisées dans cette étude. La diversité des agents responsables des diarrhées chez les enfants peut également expliquer cette absence apparente dans les échantillons humains. Certaines études ont montré

que les EHEC sont plus fréquents dans les pays développés, en raison de différences dans les pratiques sanitaires et agricoles [278]–[281].

Enfin, il est possible que les méthodes de détection utilisées dans cette étude, telles que les cultures conventionnelles, n'aient pas permis de détecter les EHEC en raison de leur faible abondance ou de la présence d'autres souches d'*E. coli* dans les échantillons fécaux. La détection de EHEC nécessite des tests spécifiques et sensibles [282], [138]. Une absence de gènes de virulence classiques des EHEC ne signifie pas l'absence d'autres types de *E. coli* pathogènes.

En effet, dans cette étude, 10,3 % des souches bovines et 10,6% des souches humaines portaient des gènes de virulence. Cinq pathotypes ont été identifiés, ainsi que des combinaisons de 2 pathotypes, aEHEC, STEC, APEC, UPEC et aEPEC. Les deux derniers étant les plus fréquents. De plus, des associations entre les facteurs de virulence associés liés à la colonisation (*saa*, *fimH*), à la cytotoxicité (*sat*, *hlyA*) et à l'hémolyse (*ehx*, *hlyF*) avec différents pathotypes ont été détectées, ainsi que des associations des facteurs de virulence associés liés à la cytotoxicité (*hlyA*), à l'acquisition de fer (*iucD*, *iutA*, *iroN*) et à la protectine (*kpsM II*, *KpsM II*, *traT*, *malX*) avec les pathotypes d'*E. coli*. En outre, parmi les pathotypes étudiés, 13 étaient associés au phylogroupe B2, 15 au phylogroupe B1 et 3 au phylogroupe A, montrant ainsi une répartition variée au sein des différents groupes phylogénétiques. Au total, 53,1% des pathotypes étaient résistants à au moins un antibiotique, dont 6 souches étaient multirésistantes (MDR).

Contrairement aux souches bovines, où les pathotypes InPEC dominent, les pathotypes d'*E. coli* chez les humains sont majoritairement représentés par l'ExPEC (*E. coli* extra-intestinal pathogenic), notamment les souches UPEC (uropathogènes). La majorité des souches UPEC portent des gènes de virulence, tels que le gène *usp* (protéine spécifique aux uropathogènes), qui est considéré comme un marqueur des souches uropathogènes de *E. coli* [283].

E. coli est l'un des agents étiologiques des maladies diarrhéiques et est particulièrement grave chez les jeunes enfants de moins de cinq ans. L'*Escherichia coli* diarrhéique est responsable de 30 à 40 % des épisodes de diarrhée aiguë chez les enfants dans les pays en développement [236], [284]. Une seule souche (1,17%) d'*E. coli* InPEC (aEHEC), appartenant au sérotype O55:H12, a été isolée chez un

enfant dans cette étude, ce qui est inférieur par rapport à d'autres rapports, notamment 48 % au Soudan [285], 48,6 % au Mozambique [283] et 55 % en Iran [283]. Cependant, une prévalence beaucoup plus élevée a été signalée dans d'autres pays africains, avec 82 % en Afrique du Sud et 73,8 % au Nigeria [284]. D'autres régions du monde rapportent une prévalence plus faible, avec 7,9 % en Chine [283], 9,8 % en Colombie [283] et 17,4 % en Inde [283].

Cette divergence pourrait être due à des différences géographiques associées à la variabilité climatique, à des populations étudiées différentes et à l'approvisionnement en eau, qui pourraient influencer l'incidence des InPEC.

Chez les bovins, 3 souches de aEHEC ont été détectées ; elles se caractérisent par la production et l'expression de plusieurs gènes de virulence, notamment *saa* (adhésine), *cdtB* (toxine de cytolethal distending) et *cnf1* (facteur nécrosant cytotoxique), *subBA* (subtilase cytotoxine) [286]. Le gène *saa* est impliqué dans la formation de biofilms et dans l'adhésion aux cellules épithéliales [109], contribuant ainsi à la persistance de la souche dans l'intestin.

Les 3 souches bovines aEHEC détectées appartenaient au sérotype O113:H21, précédemment liées à des maladies humaines, notamment le syndrome hémolytique et urémique (SHU) [287]–[289], ce qui pourrait suggérer que les bovins représentent un réservoir de souches de aEHEC O113:H21.

Parmi les souches d'*E. coli* étudiées, des STEC ont été identifiés chez 2,24 % (n=5) des bovins, tous de sérotypes non-O157. Les souches STEC sont principalement identifiées par la production des shigatoxines Stx1 et Stx2. La présence de *stx1* dans 3 souches STEC et de *stx2* dans 2 souches augmentent leur virulence. Selon Persson et al. 2007, les souches productrices de Stx2 étaient plus susceptibles de provoquer des complications sévères que celles produisant uniquement Stx1.

Des souches du pathotype STEC portant les gènes *stx1* et/ou *stx2* ont déjà été rapportées dans plusieurs enquêtes en Algérie [290]–[292]. Les résultats de cette étude renforcent le rôle des bovins en tant que réservoirs de souches STEC potentiellement pathogènes.

En comparant nos résultats avec ceux publiés par d'autres auteurs, nous avons observé des similarités dans la distribution des sérotypes. La détection du sérotype O8:H8 parmi les souches de STEC provenant de bovins corrobore les résultats d'une

étude antérieure qui avait également identifié ce sérotype dans les matières fécales des bovins [293]. Il convient de noter que le sérotype O8 :H8 a aussi été détecté dans la viande de bovins en Chine [294]. Ces observations suggèrent une association potentielle entre le sérotype O8:H8 et les bovins en tant que réservoirs.

L'analyse des sous-types de la toxine Shiga présents dans les cinq souches de STEC étudiées a révélé que toutes étaient positives pour l'un des sous-types *stx1a* ou *stx2a*. Le sous-type *stx2a*, reconnu pour sa forte virulence, a été identifié dans deux souches d'*E. coli* appartenant au sérotype O138:H8. Ce sous-type est particulièrement préoccupant, car il est fréquemment associé à des infections graves chez l'homme, telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU) [71]. Parmi les trois sous-types connus de Stx1 et les sept sous-types de Stx2 [69], ce sont principalement les sous-types Stx1a, Stx2a, Stx2c et Stx2d qui ont été impliqués dans des maladies humaines graves, comme l'ont montré diverses études [200], [295]. Ces sous-types sont capables de produire des toxines qui endommagent les cellules endothéliales, entraînant des complications systémiques telles que des hémorragies et une défaillance rénale [71]. Les souches portant ces sous-types représentent ainsi un risque significatif pour la santé publique.

Bien que toutes les souches STEC soient négatives pour le gène *eae*, d'autres gènes de virulence, *fimH*, *hlyA*, *subAB* et *cnf1*, ont été détectés. Ce résultat est conforme aux enquêtes précédentes menées chez les humains, les bovins, les ovins et les animaux sauvages [201], [296]–[299]. La présence des gènes *fimH*, *hlyA*, *subAB* et *cnf1* pourrait augmenter la pathogénicité de ces STEC chez l'homme. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté des cas de diarrhée sanglante chez l'homme, où l'agent causal était considéré comme un STEC *eae*-négatif, *ehx*-négatif et *subAB*-positif, portant le gène *stx2* et/ou le gène *stx1* [300]–[302].

Il est également important de souligner que deux des souches STEC détectées dans la présente étude portaient le gène *tia*. Ce dernier, décrit précédemment dans les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) [303], code pour une protéine de membrane externe impliquée dans l'invasion des cellules épithéliales intestinales. La présence du gène *tia* dans les souches portant également le gène *subAB* suggère que ces deux gènes sont localisés sur le même îlot de pathogénicité, comme l'ont proposé d'autres chercheurs [202].

Aucune souche typique d'EPEC n'a été détectée dans cette étude. Les souches typiques d'EPEC sont pathogènes pour l'homme et rarement retrouvées chez les animaux, à l'exception de rares cas, notamment la détection de souches EPEC positives pour *bfpA* chez le sanglier et le chien [201] [304].

Les souches atypiques d'EPEC (n=10) détectées dans cette étude comprenaient une variété de 5 variantes d'intimin, les sous-types *gamma*, *iota-1-C* et *beta1* étant présents dans plus d'une souche. Ce dernier sous-type (*eae-bêta1*) a été largement identifié dans des EPEC appartenant au sérotype O157:HNM. Ce sérotype a été fréquemment retrouvé dans des STEC causant le SHU (syndrome hémolytique et urémique) et la colite hémorragique [305], et il est intéressant de noter qu'il a également été détecté dans 3 EPEC isolés chez des bovins dans cette étude.

Les prophages codant pour la toxine Shiga peuvent être stables dans le génome bactérien, mais certaines souches de STEC peuvent perdre le prophage et revenir ainsi à l'état aEPEC. De plus, la plupart des STEC pathogènes pour l'homme proviennent de populations d'EPEC lysogénisées par un ou plusieurs phages portant des gènes codant pour *stx1* et/ou *stx2* [306].

L'intimin γ , fréquemment présent chez les EPEC et STEC isolés chez les humains et animaux, a été identifié en association avec une souche aEPEC O7:H4. Ce sérotype est rapporté parmi les ETEC cliniques [306].

Le pathotype prédominant identifié dans cette étude était UPEC, avec un total de 13 souches, toutes appartenant au phylogroupe B2, dont 6 souches bovines (46 %) et 7 souches humaines (54 %). Selon Habets et *al.* 2021, les souches responsables de l'infection extra-intestinale sont plus susceptibles d'appartenir au groupe phylogénétique B2 que plutôt qu'à d'autres groupes. Il existe aussi une corrélation entre présence de facteurs de virulence et groupes phylogénétiques [308], [309].

CONCLUSION

Cette étude confirme la diversité génétique des souches d'*E. coli* et la complexité de leur pathogénicité, en particulier en ce qui concerne les pathotypes STEC, aEHEC et EPEC. La comparaison avec la littérature montre que ces souches partagent des gènes de virulence bien établis, mais que des variations dans leur profil génétique peuvent moduler leur pouvoir pathogène, nécessitant une surveillance continue pour mieux comprendre leur rôle dans les infections humaines.

Les bovins sont porteurs de souches productrices de *BLSE* (0,9 %), portant les gènes *bla_{CTX-15}* et *bla_{SHV12}*, ce qui indique que les bovins peuvent être considérés comme des réservoirs qui jouent un rôle dans la transmission de ces déterminants de résistance aux bêtalactamines. Des taux relativement élevés de multirésistance (40,4%) sont observés parmi les souches d'*Escherichia coli* bovine.

Ces éléments reflètent la diversité des gènes de résistance présents dans les souches d'*E. coli*, incluant à la fois la résistance aux antibiotiques historiquement utilisés et aux céphalosporines de génération récente. La présence des souches productrices de *BLSE* dans les systèmes de production bovine présente un risque de transfert des gènes *BLSE* et souligne l'importance de la surveillance génomique.

Les élevages bovins peuvent avoir un impact sur les taux de résistance à certains antibiotiques. La détection de nombreux gènes de résistance chez les *E. coli*, dont certains concernent des antibiotiques couramment utilisés et les céphalosporines de génération récente, souligne la valeur épidémiologique des *E. coli* en tant que réservoir et possible voie de transmission de gènes de résistance vers d'autres espèces à potentiel pathogénique plus élevé.

Une fréquence élevée d'antibiorésistance a été détectée dans les souches humaines (60,5%), dont 57,7 % sont MDR, avec l'identification de 3 souches productrices de *BLSE* (*bla_{CTX-15}*). La résistance aux antibiotiques pourrait poser un défi majeur dans la gestion des infections diarrhéiques d'origine bactérienne chez les enfants. La détection de souches productrices de *BLSE* chez les enfants représente un risque émergent pour la santé humaine.

Des pathovars importants (aEHEC, STEC, aEPEC et UPEC) et des pathovars hybrides (STEC/APEC ET UPEC/APEC) ont été détectés dans des souches d'*E. coli* d'origine bovine et humaine. Cela souligne la nécessité d'une surveillance accrue des micro-organismes dans ces niches épidémiologiques.

Des souches épidémiques importantes d'aEHEC (O113 :H21), aEPEC (O157) ont été isolées dans les fèces des bovins, ce qui met en évidence le rôle des bovins comme réservoirs de ces clones.

La détection des pathovars hybrides dans des souches d'*E. coli* d'origine humaine et bovine, une découverte très inhabituelle, constitue un enjeu important pour la santé publique et animale en raison de sa possible propagation à l'interface entre les espèces animales d'une part et entre l'animal et l'homme d'autre part.

PERSPECTIVES

La détection de gènes de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulence d'importance clinique dans les *Escherichia coli* provenant de bovins ainsi que dans des échantillons humains met en évidence l'importance d'adopter une approche One Health.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] T. Escherich, "Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings," *Fortschritte der Med.*, vol. 3, no. 16, pp. 515,522,547-554, 1885, [Online]. Available: <https://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/opus4/frontdoor/deliver/index/docId/19650/file/E001607143.pdf>.
- [2] O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur, "The population genetics of commensal *Escherichia coli*," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 207–217, 2010, doi: 10.1038/nrmicro2298.
- [3] M. Gouali and F. Weill, "Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité," *Presse Med.*, vol. 42, no. 1, pp. 68–75, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.lpm.2012.10.010.
- [4] P. A. . Grimont, "Taxonomie des *Escherichia*," *Médecine Mal. Infect.*, vol. 17, pp. 6–10, Mar. 1987, doi: 10.1016/S0399-077X(87)80308-6.
- [5] D. Yu, G. Banting, and N. F. Neumann, "A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*," *Can. J. Microbiol.*, vol. 67, no. 8, pp. 553–571, Aug. 2021, doi: 10.1139/cjm-2020-0508.
- [6] L. A. King *et al.*, "Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 12, pp. O1136–O1144, Dec. 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12736.
- [7] ISO16654, "Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* 0157 NO COPYING WITHOUT BSI PERMISSION EXCEPT AS PERMITTED BY COPYRIGHT LAW," no. 1, 2001.
- [8] R. Ducluzeau and P. Raibaud, "[Microbial ecology of the digestive system].," *Agressologie.*, vol. 26, no. 2, pp. 161–3, Feb. 1985, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4051125>.
- [9] M. Smati *et al.*, "Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level," *Microbiologyopen*, vol.

- 4, no. 4, pp. 604–615, Aug. 2015, doi: 10.1002/mbo3.266.
- [10] F. Kauffmann, “The Serology of the Coli Group,” *J. Immunol.*, vol. 57, no. 1, pp. 71–100, Sep. 1947, doi: 10.4049/jimmunol.57.1.71.
 - [11] P. A. M. Guinée, W. H. Jansen, T. Wadström, and R. Sellwood, “Escherichia Coli Associated with Neonatal Diarrhoea in Piglets and Calves,” in *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1981, pp. 126–162.
 - [12] J. P. Nataro and J. B. Kaper, “Diarrheagenic Escherichia coli,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, no. 1, pp. 142–201, Jan. 1998, doi: 10.1128/CMR.11.1.142.
 - [13] H. Ochman and R. K. Selander, “Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations,” *J. Bacteriol.*, vol. 157, no. 2, pp. 690–693, Feb. 1984, doi: 10.1128/jb.157.2.690-693.1984.
 - [14] O. Clermont, S. Bonacorsi, and E. Bingen, “Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 10, pp. 4555–4558, Oct. 2000, doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
 - [15] M. Smati *et al.*, “Real-Time PCR for Quantitative Analysis of Human Commensal Escherichia coli Populations Reveals a High Frequency of Subdominant Phylogroups,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 16, pp. 5005–5012, Aug. 2013, doi: 10.1128/AEM.01423-13.
 - [16] O. Clermont, J. K. Christenson, E. Denamur, and D. M. Gordon, “The <scp>C</scp> lermont <scp>E</scp> *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups,” *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 5, no. 1, pp. 58–65, Feb. 2013, doi: 10.1111/1758-2229.12019.
 - [17] O. Clermont, D. M. Gordon, S. Brisse, S. T. Walk, and E. Denamur, “Characterization of the cryptic Escherichia lineages: Rapid identification and prevalence,” *Environ. Microbiol.*, vol. 13, no. 9, pp. 2468–2477, 2011, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x.
 - [18] P. Duriez *et al.*, “Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations,” *Microbiology*, vol.

147, no. Pt 6, pp. 1671–1676, Jun. 2001, doi: 10.1099/00221287-147-6-1671.

- [19] J. R. Johnson and T. A. Russo, “Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*,” *EcoSal Plus*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1128/ecosalplus.esp-0004-2017.
- [20] I. Carvalho *et al.*, “Antimicrobial Resistance Genes and Diversity of Clones among Faecal ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy and Sick Dogs Living in Portugal,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 8, p. 1013, Aug. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10081013.
- [21] J. P. Girardeau *et al.*, “Association of Virulence Genotype with Phylogenetic Background in Comparison to Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 12, pp. 6098–6107, Dec. 2005, doi: 10.1128/JCM.43.12.6098-6107.2005.
- [22] F. M. Coura *et al.*, “Virulence factors and phylotyping of *Escherichia coli* isolated from non-diarrheic and diarrheic water buffalo calves,” *Ciência Rural*, vol. 49, no. 5, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1590/0103-8478cr20180998.
- [23] P. Escobar-Páramo *et al.*, “Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 9, pp. 5698–5700, 2004, doi: 10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004.
- [24] D. Müller *et al.*, “Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 10, pp. 3380–3390, May 2007, doi: 10.1128/AEM.02855-06.
- [25] T. A. Russo and J. R. Johnson, “Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC,” *J. Infect. Dis.*, vol. 181, no. 5, pp. 1753–1754, May 2000, doi: 10.1086/315418.
- [26] J. L. Smith, P. M. Fratamico, and N. W. Gunther, “Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*,” *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 4, no. 2, pp. 134–163, 2007, doi: 10.1089/fpd.2007.0087.
- [27] C. Balière, “Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l’environnement

littoral : cas des STEC et des EPEC,” *Microbiol. Parasitol. Univ. Bretagne Occident. - Brest, Français. NNT 2016BRES0003 . tel-01505750*, pp. 1–180, 2016, [Online]. Available: <https://theses.hal.science/tel-01505750>.

- [28] C. Frank *et al.*, “Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 19, pp. 1771–1780, Nov. 2011, doi: 10.1056/NEJMoa1106483.
- [29] L. Beutin and A. Martin, “Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains,” *Journal of Food Protection*. pp. 408–418, 2012, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-452.
- [30] D. D. Munhoz *et al.*, “*E. coli* Common pili promote the fitness and virulence of a hybrid aEPEC / ExPEC strain within diverse host environments,” *Gut Microbes*, vol. 15, no. 1, 2023, doi: 10.1080/19490976.2023.2190308.
- [31] S. R. Leonard, M. K. Mammel, D. A. Rasko, and W. Lacher, “Cryptic Lineage 1 Strain 7v Harbors a Hybrid Plasmid,” vol. 82, no. 14, pp. 4309–4319, 2016, doi: 10.1128/AEM.01129-16.Editor.
- [32] O. Nyholm, S. Heinikainen, S. Pelkonen, S. Hallanvuo, K. Haukka, and A. Siitonen, “Hybrids of Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC / ETEC) Among Human and Animal Isolates in Finland,” *Zoonoses Public Health*, vol. 62, no. 7, pp. 518–524, Nov. 2015, doi: 10.1111/zph.12177.
- [33] A. D. O’Brien and R. K. Holmes, “Shiga and Shiga-like toxins.,” *Microbiol. Rev.*, vol. 51, no. 2, pp. 206–220, 1987, doi: 10.1128/MMBR.51.2.206-220.1987.
- [34] P. I. Tarr, C. A. Gordon, and W. L. Chandler, “Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome,” *Lancet*, vol. 365, no. 9464, pp. 1073–1086, Mar. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2.
- [35] M. A. Croxen and B. B. Finlay, “Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 26–38, Jan. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2265.
- [36] J. Rodrigues, I. C. A. Scaletsky, L. C. Campos, T. A. T. Gomes, T. S. Whittam, and

- L. R. Trabulsi, "Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55," *Infect. Immun.*, vol. 64, no. 7, pp. 2680–2686, Jul. 1996, doi: 10.1128/iai.64.7.2680-2686.1996.
- [37] I. C. A. Scaletsky, M. Z. Pedroso, C. A. G. Oliva, R. L. B. Carvalho, M. B. Moraes, and U. Fagundes-Neto, "A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea," *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 7, pp. 3410–3415, Jul. 1999, doi: 10.1128/IAI.67.7.3410-3415.1999.
- [38] L. R. Trabulsi, R. Keller, and T. A. T. Gomes, "Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 5, pp. 508–513, May 2002, doi: 10.3201/eid0805.010385.
- [39] J. B. Kaper, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley, "Pathogenic *Escherichia coli*," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 123–140, Feb. 2004, doi: 10.1038/nrmicro818.
- [40] R. T. Hernandez, W. P. Elias, M. A. M. Vieira, and T. A. T. Gomes, "An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 297, no. 2, pp. 137–149, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x.
- [41] A. Mellmann *et al.*, "Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e22751, Jul. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0022751.
- [42] A. W. Paton and J. C. Paton, "Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 598–602, Feb. 1998, doi: 10.1128/JCM.36.2.598-602.1998.
- [43] Anses, "Escherichia coli entérohémmorragiques (EHEC)," 2019. [Online]. Available: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2017SA0224Fi.pdf](https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2017SA0224Fi.pdf).
- [44] M. A. Karmali, V. Gannon, and J. M. Sargeant, "Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC)," *Vet. Microbiol.*, vol. 140, no. 3–4, pp. 360–370, Jan. 2010, doi:

10.1016/j.vetmic.2009.04.011.

- [45] C. Welinder-Olsson and B. Kaijser, "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 37, no. 6–7, pp. 405–416, 2005, doi: 10.1080/00365540510038523.
- [46] P. I. Tarr *et al.*, "Iha: a Novel *Escherichia coli* O157:H7 Adherence-Confering Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure," *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 3, pp. 1400–1407, Mar. 2000, doi: 10.1128/IAI.68.3.1400-1407.2000.
- [47] S. Doughty, J. Sloan, V. Bennett-Wood, M. Robertson, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland, "Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 12, pp. 6761–6769, Dec. 2002, doi: 10.1128/IAI.70.12.6761-6769.2002.
- [48] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017," *EFSA J.*, vol. 16, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500.
- [49] S. W. Naylor, D. L. Gally, and J. Christopher Low, "Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 295, no. 6–7, pp. 419–441, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.010.
- [50] M. A. Karmali, "Infection by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: An Overview," *Mol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 2, pp. 117–122, Feb. 2004, doi: 10.1385/MB:26:2:117.
- [51] J. Yang *et al.*, "Control of Acid Resistance Pathways of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strain EDL933 by PsrB, a Prophage-Encoded AraC-Like Regulator," *Infect. Immun.*, vol. 83, no. 1, pp. 346–353, Jan. 2015, doi: 10.1128/IAI.02758-14.
- [52] F. M. Coura, A. P. Lage, and M. B. Heinemann, "Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização," *Pesqui. Veterinária Bras.*, vol. 34, no. 9, pp. 811–818, Sep. 2014, doi: 10.1590/S0100-736X2014000900001.

- [53] I. M. Pruimboom-Brees *et al.*, “Cattle lack vascular receptors for Escherichia coli O157:H7 Shiga toxins,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 19, pp. 10325–10329, Sep. 2000, doi: 10.1073/pnas.190329997.
- [54] S. A. Wani, M. A. Bhat, I. Samanta, Y. Nishikawa, and A. S. Buchh, “Escherichia coli O4:NM associated with an outbreak of calf diarrhoea,” *Vet. J.*, vol. 169, no. 2, pp. 300–302, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.tvjl.2004.01.001.
- [55] S. Türkyılmaz, S. Eskiizmirli, S. Tunaligil, and B. Bozdogan, “Identification, characterization and molecular epidemiology of Escherichia coli isolated from lamb and goat kids with diarrhoea,” *Acta Vet. Brno*, vol. 82, no. 4, pp. 357–362, 2013, doi: 10.2754/avb201382040357.
- [56] T. K. Dutta, P. Roychoudhury, S. Bandyopadhyay, S. A. Wani, and I. Hussain, “Detection & characterization of Shiga toxin producing Escherichia coli (STEC) & enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in poultry birds with diarrhoea,” *Indian J. Med. Res.*, vol. 133, no. 5, pp. 541–5, May 2011, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623041>.
- [57] A. A. Sancak, H. C. Rutgers, C. A. Hart, and R. M. Batt, “Prevalence of enteropathic Escherichia coli in dogs with acute and chronic diarrhoea,” *Vet. Rec.*, vol. 154, no. 4, pp. 101–106, Jan. 2004, doi: 10.1136/vr.154.4.101.
- [58] J. C. Y. Ching, N. L. Jones, P. J. M. Ceponis, M. A. Karmali, and P. M. Sherman, “Escherichia coli Shiga-Like Toxins Induce Apoptosis and Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase via In Vitro Activation of Caspases,” *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 8, pp. 4669–4677, Aug. 2002, doi: 10.1128/IAI.70.8.4669-4677.2002.
- [59] J. Bergan, A. B. Dyve Lingelem, R. Simm, T. Skotland, and K. Sandvig, “Shiga toxins,” *Toxicon*, vol. 60, no. 6, pp. 1085–1107, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.toxicon.2012.07.016.
- [60] S. Herold, H. Karch, and H. Schmidt, “Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 294, no. 2–3, pp. 115–121, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.023.
- [61] N. A. Strockbine, L. R. M. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O’Brien, “Two toxin-converting phages from Escherichia coli O157:H7 strain

933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities,” *Infect. Immun.*, vol. 53, no. 1, pp. 135–140, Jul. 1986, doi: 10.1128/iai.53.1.135-140.1986.

- [62] A. D. O’Brien, J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, W. H. . Smith, and S. B. Formal, “Shiga-Like Toxin-Converting Phages from *Escherichia coli* Strains That Cause Hemorrhagic Colitis or Infantile Diarrhea Abstract.,” *Science (80-.)*, vol. 226, pp. 694–696, 1984.
- [63] AFSSA :Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, “Bilan des connaissances relatives aux *E. coli* producteurs de shigatoxine (STEC),” pp. 1–220, 2003, [Online]. Available: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-STEC.pdf.
- [64] J. Müthing *et al.*, “Promiscuous Shiga toxin 2e and its intimate relationship to Forssman,” *Glycobiology*, vol. 22, no. 6, pp. 849–862, Jun. 2012, doi: 10.1093/glycob/cws009.
- [65] A. R. Pacheco and V. Sperandio, “Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 2, no. June, p. 81, 2012, doi: 10.3389/fcimb.2012.00081.
- [66] R. Prager, A. Fruth, U. Busch, and E. Tietze, “Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources.,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 301, no. 3, pp. 181–91, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.06.003.
- [67] P. C. H. Feng and S. Reddy, “Prevalences of Shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 22, pp. 6917–23, Nov. 2013, doi: 10.1128/AEM.02455-13.
- [68] A. Krüger, P. M. A. Lucchesi, and A. E. Parma, “Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 1, pp. 73–9, Jan. 2011, doi: 10.1128/AEM.01445-10.

- [69] F. Scheutz *et al.*, "Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 9, pp. 2951–2963, 2012, doi: 10.1128/JCM.00860-12.
- [70] Y. Bertin, K. Boukhors, N. Pradel, V. Livrelli, and C. Martin, "Stx2 Subtyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle in France: Detection of a New Stx2 Subtype and Correlation with Additional Virulence Factors," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, no. 9, pp. 3060–3065, Sep. 2001, doi: 10.1128/JCM.39.9.3060-3065.2001.
- [71] A. W. Friedrich *et al.*, "Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms.," *J. Infect. Dis.*, vol. 185, no. 1, pp. 74–84, Jan. 2002, doi: 10.1086/338115.
- [72] C. A. Fuller, C. A. Pellino, M. J. Flagler, J. E. Strasser, and A. A. Weiss, "Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency," *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 3, pp. 1329–1337, 2011, doi: 10.1128/IAI.01182-10.
- [73] H. Schmidt, "Shiga-toxin-converting bacteriophages," *Res. Microbiol.*, vol. 152, no. 8, pp. 687–695, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0923-2508(01)01249-9.
- [74] C. Picozzi, G. Volponi, I. Vigentini, S. Grassi, and R. Foschino, "Assessment of transduction of *Escherichia coli* Stx2-encoding phage in dairy process conditions," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 153, no. 3, pp. 388–394, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.031.
- [75] A. MartÃ-nez-Castillo and M. Muniesa, "Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. APR, pp. 1–8, Apr. 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00046.
- [76] A. W. Friedrich *et al.*, "Prevalence, Virulence Profiles, and Clinical Significance of Shiga Toxin-Negative Variants of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Infection in Humans," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 45, no. 1, pp. 39–45, Jul. 2007, doi: 10.1086/518573.
- [77] M. Bielaszewska *et al.*, "Shiga Toxin Gene Loss and Transfer In Vitro and In Vivo during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Infection in Humans," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 10, pp. 3144–3150, May 2007, doi: 10.1128/AEM.02937-06.

- [78] A. Martinez-Castillo, P. Quirós, F. Navarro, E. Miró, and M. Muniesa, "Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophages in Human Fecal Samples from Healthy Individuals," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 16, pp. 4862–4868, Aug. 2013, doi: 10.1128/AEM.01158-13.
- [79] Y. Yan, Y. Shi, D. Cao, X. Meng, L. Xia, and J. Sun, "Prevalence of Stx Phages in Environments of a Pig Farm and Lysogenic Infection of the Field *E. coli* O157 Isolates with a Recombinant Converting Phage," *Curr. Microbiol.*, vol. 62, no. 2, pp. 458–464, Feb. 2011, doi: 10.1007/s00284-010-9729-8.
- [80] L. Imamovic, E. Ballesté, J. Jofre, and M. Muniesa, "Quantification of Shiga Toxin-Converting Bacteriophages in Wastewater and in Fecal Samples by Real-Time Quantitative PCR," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 17, pp. 5693–5701, Sep. 2010, doi: 10.1128/AEM.00107-10.
- [81] D. J. Rooks, Y. Yan, J. E. McDonald, M. J. Woodward, A. J. McCarthy, and H. E. Allison, "Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and other lambdoid bacteriophages," *Environ. Microbiol.*, vol. 12, no. 5, pp. 1194–1204, May 2010, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02162.x.
- [82] R. Dumke, U. Schroter-Bobsin, E. Jacobs, and I. Roske, "Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 42, no. 1, pp. 48–53, Jan. 2006, doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01809.x.
- [83] M. Muniesa, L. Imamovic, and J. Jofre, "Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments," *Microb. Biotechnol.*, vol. 4, no. 6, pp. 725–734, Nov. 2011, doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00264.x.
- [84] F. Grau-Leal, P. Quirós, A. Martínez-Castillo, and M. Muniesa, "Free <sc>S</sc> higa toxin 1-encoding bacteriophages are less prevalent than <sc>S</sc> higa toxin 2 phages in extraintestinal environments," *Environ. Microbiol.*, vol. 17, no. 11, pp. 4790–4801, Nov. 2015, doi: 10.1111/1462-2920.13053.
- [85] P. Garrido *et al.*, "STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains,"

Clin. Chem., vol. 52, no. 2, pp. 192–201, Feb. 2006, doi: 10.1373/clinchem.2005.059766.

- [86] J. Garmendia, G. Frankel, and V. F. Crepin, “Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation,” *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 5, pp. 2573–2585, May 2005, doi: 10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005.
- [87] E. Oswald, H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marchès, and A. Caprioli, “Typing of Intimin Genes in Human and Animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* : Characterization of a New Intimin Variant,” *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 1, pp. 64–71, Jan. 2000, doi: 10.1128/IAI.68.1.64-71.2000.
- [88] A. D. Phillips and G. Frankel, “Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures,” *J. Infect. Dis.*, vol. 181, no. 4, pp. 1496–1500, 2000, doi: 10.1086/315404.
- [89] R. J. Fitzhenry *et al.*, “Intimin type influences the site of human intestinal,” *Gut*, vol. 50, pp. 180–185, 2002.
- [90] F. Girard, I. Batisson, G. M. Frankel, J. Harel, and J. M. Fairbrother, “Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: Role of intimin and Tir in adherence,” *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 9, pp. 6005–6016, 2005, doi: 10.1128/IAI.73.9.6005-6016.2005.
- [91] W. L. Zhang *et al.*, “Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 12, pp. 4486–4492, 2002, doi: 10.1128/JCM.40.12.4486-4492.2002.
- [92] M. Blanco *et al.*, “Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina,” *Int. Microbiol.*, vol. 7, no. 4, pp. 269–76, Dec. 2004, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666247>.
- [93] Á. Monaghan, B. Byrne, S. Fanning, T. Sweeney, D. McDowell, and D. J. Bolton, “Serotypes and Virulence Profiles of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Bovine Farms,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 24, pp. 8662–8668, Dec. 2011, doi: 10.1128/AEM.06190-11.

- [94] D. Bibbal *et al.*, “Intimin Gene (eae) Subtype-Based Real-Time PCR Strategy for Specific Detection of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in Cattle Feces,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 3, pp. 1177–1184, Feb. 2014, doi: 10.1128/AEM.03161-13.
- [95] M. A. Karmali *et al.*, “Association of Genomic O Island 122 of Escherichia coli EDL 933 with Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 11, pp. 4930–4940, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.11.4930-4940.2003.
- [96] M. E. Wickham *et al.*, “Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection,” *J. Infect. Dis.*, vol. 194, no. 6, pp. 819–827, 2006, doi: 10.1086/506620.
- [97] B. K. Coombes, M. E. Wickham, M. Mascarenhas, S. Gruenheid, B. B. Finlay, and M. A. Karmali, “Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 shiga toxin-producing Escherichia coli strains,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 7, pp. 2153–2160, 2008, doi: 10.1128/AEM.02566-07.
- [98] M. Bugarel, L. Beutin, A. Martin, A. Gill, and P. Fach, “Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 142, no. 3, pp. 318–329, 2010, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.010.
- [99] L. Chui *et al.*, “Molecular Profiling of Escherichia coli O157:H7 and Non-O157 Strains Isolated from Humans and Cattle in Alberta, Canada,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 3, pp. 986–990, Mar. 2015, doi: 10.1128/JCM.03321-14.
- [100] S. Delannoy, L. Beutin, and P. Fach, “Discrimination of Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) from Non-EHEC Strains Based on Detection of Various Combinations of Type III Effector Genes,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 10, pp. 3257–3262, Oct. 2013, doi: 10.1128/JCM.01471-13.
- [101] L. Galli, A. G. Torres, and M. Rivas, “Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from humans and cattle in Argentina,” *FEMS*

Microbiol. Lett., vol. 308, no. 2, p. no-no, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01996.x.

- [102] M. J. Farfan and A. G. Torres, "Molecular Mechanisms That Mediate Colonization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains," *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 3, pp. 903–913, Mar. 2012, doi: 10.1128/IAI.05907-11.
- [103] I. Tatsuno *et al.*, "toxB Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 11, pp. 6660–6669, Nov. 2001, doi: 10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001.
- [104] L. Badea, S. Doughty, L. Nicholls, J. Sloan, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland, "Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells," *Microb. Pathog.*, vol. 34, no. 5, pp. 205–215, May 2003, doi: 10.1016/S0882-4010(03)00026-3.
- [105] I. Tatsuno *et al.*, "The lpf Gene Cluster for Long Polar Fimbriae Is Not Involved in Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* or Virulence of *Citrobacter rodentium*," *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 1, pp. 265–272, Jan. 2006, doi: 10.1128/IAI.74.1.265-272.2006.
- [106] A. W. Friedrich, J. Borell, M. Bielaszewska, A. Fruth, H. Tschäpe, and H. Karch, "Shiga Toxin 1c-Producing *Escherichia coli* Strains: Phenotypic and Genetic Characterization and Association with Human Disease," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 6, pp. 2448–2453, Jun. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.6.2448-2453.2003.
- [107] C. Jenkins *et al.*, "Distribution of the saa Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 4, pp. 1775–1778, Apr. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.4.1775-1778.2003.
- [108] B. A. Amézquita-López, B. Quiñones, B. G. Lee, and C. Chaidez, "Virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. JAN, pp. 1–9, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00007.
- [109] A. W. Paton, P. Srimanote, M. C. Woodrow, and J. C. Paton, "Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for

- Humans," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 11, pp. 6999–7009, Nov. 2001, doi: 10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001.
- [110] P. I. Tarr *et al.*, "Iha: a Novel Escherichia coli O157:H7 Adherence-Confering Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure," *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 3, pp. 1400–1407, Mar. 2000, doi: 10.1128/IAI.68.3.1400-1407.2000.
- [111] T. Slanec, A. Fruth, K. Creuzburg, and H. Schmidt, "Molecular Analysis of Virulence Profiles and Shiga Toxin Genes in Food-Borne Shiga Toxin-Producing Escherichia coli," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 19, pp. 6187–6197, Oct. 2009, doi: 10.1128/AEM.00874-09.
- [112] T. E. Grys, M. B. Siegel, W. W. Lathem, and R. A. Welch, "The StcE Protease Contributes to Intimate Adherence of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to Host Cells," *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 3, pp. 1295–1303, Mar. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.3.1295-1303.2005.
- [113] D. Kwon *et al.*, "Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and Sbc2e) in Escherichia coli isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea," *Vet. Rec.*, vol. 150, no. 2, pp. 35–37, Jan. 2002, doi: 10.1136/vr.150.2.35.
- [114] L. Zhao, X. Chen, X. Xu, G. Song, and X. Liu, "Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in Escherichia coli isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease," *Vet. J.*, vol. 180, no. 1, pp. 124–129, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.tvjl.2007.10.021.
- [115] M. C. Vidotto, E. C. T. Florian, and M. A. Ono, "Prevalence of the paa gene (porcine attaching and effacing associated) in porcine enteropathogenic Escherichia coli (PEPEC) associated with postweaning diarrhea in south Brazil," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 515–517, 2013, doi: 10.1590/S1517-83822013000200030.
- [116] N. Kobayashi *et al.*, "Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of shiga toxin-producing escherichia coli," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 12, pp. 4022–4028, 2013, doi: 10.1128/JCM.01598-13.

- [117] M. C. Cergole-Novella *et al.*, “Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 274, no. 2, pp. 329–334, Sep. 2007, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00856.x.
- [118] J. S. Cadona, A. V. Bustamante, A. E. Parma, P. M. A. Lucchesi, and A. M. Sanso, “Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 56, no. 6, pp. 449–455, Jun. 2013, doi: 10.1111/lam.12067.
- [119] X. Bai *et al.*, “Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Yaks (*Bos grunniens*) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e65537, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065537.
- [120] S. Dutta, G. P. Pazhani, J. P. Nataro, and T. Ramamurthy, “Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: Evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, no. 1, pp. 47–54, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.ijmm.2014.10.006.
- [121] J.-P. Nougayrède, F. Taieb, J. De Rycke, and E. Oswald, “Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle,” *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 103–110, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.tim.2005.01.002.
- [122] M. Bielaszewska *et al.*, “Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Non-O157 Serogroups,” *Infect. Immun.*, vol. 72, no. 3, pp. 1812–1816, Mar. 2004, doi: 10.1128/IAI.72.3.1812-1816.2004.
- [123] S. C. Lorenz, I. Son, A. Maounounen-Laasri, A. Lin, M. Fischer, and J. A. Kase, “Prevalence of hemolysin genes and comparison of ehxA subtype patterns in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Non-STEC strains from clinical, food, and animal sources,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 20, pp. 6301–6311, 2013, doi: 10.1128/AEM.02200-13.
- [124] L. Aidar-Ugrinovich *et al.*, “Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 115, no. 3, pp.

297–306, 2007, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.046.

- [125] A. W. Paton, P. Srimanote, U. M. Talbot, H. Wang, and J. C. Paton, “A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*,” *J. Exp. Med.*, vol. 200, no. 1, pp. 35–46, 2004, doi: 10.1084/jem.20040392.
- [126] S. Gruenheid *et al.*, “Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7,” *Mol. Microbiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 1233–1249, 2004, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03911.x.
- [127] F. Echtenkamp *et al.*, “Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 281, no. 1, pp. 98–107, 2008, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01088.x.
- [128] A. Hodgson *et al.*, “Metalloprotease NleC Suppresses Host NF- κ B/Inflammatory Responses by Cleaving p65 and Interfering with the p65/RPS3 Interaction,” *PLoS Pathog.*, vol. 11, no. 3, pp. 1–23, 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004705.
- [129] A. Martínez-Castillo *et al.*, “Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater,” *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 4, no. 1, pp. 147–155, Feb. 2012, doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00317.x.
- [130] S. R. Steyert and J. B. Kaper, “Contribution of urease to colonization by shiga toxin-producing *Escherichia coli*,” *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 8, pp. 2589–2600, 2012, doi: 10.1128/IAI.00210-12.
- [131] J. C. Rutherford, “The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor,” *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 5, pp. 1–3, 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004062.
- [132] M. Nishio, N. Okada, T. Miki, T. Haneda, and H. Danbara, “Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*,” *Microbiology*, vol. 151, no. 3, pp. 863–873, 2005, doi: 10.1099/mic.0.27654-0.
- [133] D. Orth, K. Grif, M. P. Dierich, and R. Würzner, “Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from

humans, animals and food,” *Res. Microbiol.*, vol. 158, no. 2, pp. 105–111, 2007, doi: 10.1016/j.resmic.2006.10.007.

- [134] J. W. Yoon, J. Y. Lim, Y. H. Park, and C. J. Hovde, “Involvement of the *Escherichia coli* O157:H7(pO157) *ecf* operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs,” *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 4, pp. 2367–2378, 2005, doi: 10.1128/IAI.73.4.2367-2378.2005.
- [135] N. Morin, A. E. Santiago, R. K. Ernst, S. J. Guillot, and J. P. Nataro, “Characterization of the *AggR* regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*,” *Infect. Immun.*, vol. 81, no. 1, pp. 122–132, 2013, doi: 10.1128/IAI.00676-12.
- [136] S. M. Harrington, J. Sheikh, I. R. Henderson, F. Ruiz-Perez, P. S. Cohen, and J. P. Nataro, “The *Pic* Protease of Enteroaggregative *Escherichia coli* Promotes Intestinal Colonization and Growth in the Presence of Mucin,” *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 6, pp. 2465–2473, Jun. 2009, doi: 10.1128/IAI.01494-08.
- [137] U. Gophna, T. A. Oelschlaeger, J. Hacker, and E. Z. Ron, “*Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts,” vol. 196, pp. 20–23, 2001.
- [138] W. A. Ferens and C. J. Hovde, “*Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection,” *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 8, no. 4, pp. 465–487, Apr. 2011, doi: 10.1089/fpd.2010.0673.
- [139] C. Cortés *et al.*, “Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain,” *Vet. Microbiol.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 67–76, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.vetmic.2005.06.009.
- [140] J. LeJeune, J. Homan, G. Linz, and D. , L. Pearl, “Role of the European Starling in the Transmission of *E. coli* O157 on Dairy Farms,” *Proc. Vertebr. Pest Conf.*, vol. 23, pp. 9–12, 2008, doi: 10.5070/v423110392.
- [141] S. Sánchez *et al.*, “Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars,” *Vet. Microbiol.*, vol. 143, no. 2–4, pp. 420–423, 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.11.016.

- [142] K. Grif *et al.*, “Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 4, pp. 268–271, 2005, doi: 10.1007/s10096-005-1320-z.
- [143] R. S. Quilliam *et al.*, “Seroprevalence and Risk Factors Associated with *Escherichia coli* O157 in a Farming Population,” *Zoonoses Public Health*, vol. 59, no. 2, pp. 83–88, 2012, doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01430.x.
- [144] M. L. de la Mata, “El desarrollo de las acciones de memoria,” *Infanc. y Aprendiz.*, vol. 11, no. 42, pp. 3–18, Jan. 1988, doi: 10.1080/02103702.1988.10822199.
- [145] S. Naganandhini, Z. J. Kennedy, M. Uyttendaele, and D. Balachandar, “Persistence of pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains in various tropical agricultural soils of India,” *PLoS One*, vol. 10, no. 6, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130038.
- [146] J. Ma, A. Mark Ibekwe, D. E. Crowley, and C. H. Yang, “Persistence of *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains in agricultural soils,” *Sci. Total Environ.*, vol. 490, pp. 822–829, 2014, doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.069.
- [147] C. W. Knapp, J. Dolfing, P. A. I. Ehler, and D. W. Graham, “Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 2, pp. 580–587, Jan. 2010, doi: 10.1021/es901221x.
- [148] S. A. Waksman, “What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance?,” *Mycologia*, vol. 39, no. 5, p. 565, Sep. 1947, doi: 10.2307/3755196.
- [149] M. Hutchings, A. Truman, and B. Wilkinson, “Antibiotics: past, present and future,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 51, no. Figure 1, pp. 72–80, 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [150] J. M. Munita and C. A. Arias, “Mechanisms of Antibiotic Resistance,” in *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, no. 6, Washington, DC, USA: ASM Press, 2016, pp. 481–511.
- [151] Y. Sáenz *et al.*, “Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 10, pp. 3996–4001, Oct. 2004, doi:

10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004.

- [152] S. B. Levy, "Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 92, no. 31, pp. 65S-71S, May 2002, doi: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.4.x.
- [153] P. A. Bradford and C. R. Dean, "Resistance of Gram-Negative bacilli to antimicrobials," in *Antimicrobial resistance and Implications for the 21st Century*, 2008, pp. 97–159.
- [154] N. DATTA and P. KONTOMICHALOU, "Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae," *Nature*, vol. 208, no. 5007, pp. 239–241, Oct. 1965, doi: 10.1038/208239a0.
- [155] D. L. Paterson and R. A. Bonomo, "Clinical Update Extended-Spectrum Beta-Lactamases : a Clinical Update," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 657–686, 2005, doi: 10.1128/CMR.18.4.657.
- [156] T. M. Coque, F. Baquero, and R. Cantón, "Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe," *Eurosurveillance*, vol. 13, no. 47, pp. 1–11, Nov. 2008, doi: 10.2807/ese.13.47.19044-en.
- [157] O. Sköld, "Sulfonamide resistance: mechanisms and trends," *Drug Resist. Updat.*, vol. 3, no. 3, pp. 155–160, Jun. 2000, doi: 10.1054/drup.2000.0146.
- [158] V. Perreten and P. Boerlin, "A New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 3, pp. 1169–1172, Mar. 2003, doi: 10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003.
- [159] P. A. White, C. J. McIver, Y.-M. Deng, and W. D. Rawlinson, "Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 182, no. 2, pp. 265–269, Jan. 2000, doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08906.x.
- [160] K. J. Shaw, P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller, "Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes," *Microbiol. Rev.*, vol. 57, no. 1, pp. 138–163, Mar. 1993, doi: 10.1128/mr.57.1.138-163.1993.

- [161] G. D. Wright, "Aminoglycoside-modifying enzymes," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 2, no. 5, pp. 499–503, Oct. 1999, doi: 10.1016/S1369-5274(99)00007-7.
- [162] Clyde A. Smith and Edward N. Baker, "Aminoglycoside Antibiotic Resistance by Enzymatic Deactivation," *Curr. Drug Target -Infectious Disord.*, vol. 2, no. 2, pp. 143–160, Jun. 2002, doi: 10.2174/1568005023342533.
- [163] M. S. Ramirez and M. E. Tolmasky, "Aminoglycoside modifying enzymes," *Drug Resist. Updat.*, vol. 13, no. 6, pp. 151–171, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
- [164] C. Berens and W. Hillen, "Gene regulation by tetracyclines," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 15, pp. 3109–3121, Aug. 2003, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03694.x.
- [165] I. Chopra and M. Roberts, "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 65, no. 2, pp. 232–260, Jun. 2001, doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
- [166] C. S. Jones, D. J. Osborne, and J. Stanley, "Cloning of a probe for a previously undescribed enterobacterial tetracycline resistance gene," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 15, no. 3, pp. 106–108, Sep. 1992, doi: 10.1111/j.1472-765X.1992.tb00738.x.
- [167] S. R. Connell, "Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance," *EMBO J.*, vol. 22, no. 4, pp. 945–953, Feb. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg093.
- [168] L. Bissonnette, S. Champetier, J. P. Buisson, and P. H. Roy, "Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (cmlA) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins," *J. Bacteriol.*, vol. 173, no. 14, pp. 4493–4502, Jul. 1991, doi: 10.1128/jb.173.14.4493-4502.1991.
- [169] A. Cloeckert *et al.*, "Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance Encoded by the floR Gene in Escherichia coli Isolated from Cattle," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 10, pp. 2858–2860, Oct. 2000, doi: 10.1128/AAC.44.10.2858-2860.2000.
- [170] L. Martínez-Martínez, M. Eliecer Cano, J. Manuel Rodríguez-Martínez, J. Calvo, and Á. Pascual, "Plasmid-mediated quinolone resistance," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 6, no. 5, pp. 685–711, Oct. 2008, doi: 10.1586/14787210.6.5.685.

- [171] S. Schwarz and E. Chaslus-dancla, "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance To cite this version : Review article Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance," *Vet. Res. BioMed Cent.*, vol. 32, no. 3–4, pp. 201–225, 2001.
- [172] G. Bories, "Rapport concernant l'uitlisation d'antibiotiques comme facteur de croissance en alimentation animale," 1998. [Online]. Available: [hrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.vie-publique.fr/files/rapport/pdf/004000267.pdf](http://home-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.vie-publique.fr/files/rapport/pdf/004000267.pdf).
- [173] OMS, "Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark : the WHO international review panel' s evaluation of the termination of the use of antimicrobial growth promoters in Denmark," *World Heal. Organ. Dep.*, no. November 2002, p. 58, 2003, [Online]. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68357>.
- [174] S. Report, "The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021–2022," *EFSA J.*, vol. 22, no. 2, pp. 1–195, 2024, doi: 10.2903/j.efsa.2024.8583.
- [175] M. Cassone and A. Giordano, "Resistance genes traveling the microbial internet: down the drain, up the food chain?," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 7, no. 6, pp. 637–639, Aug. 2009, doi: 10.1586/eri.09.50.
- [176] EUCAST, "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>," 2020.
- [177] CLSI, "CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performed Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 29th ed.; CLSI: Wayne; PA; USA;" 2019.
- [178] V. Jarlier, M. H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon, "Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 10, no. 4, pp. 867–878, 1988, doi: 10.1093/clinids/10.4.867.
- [179] M. Batchelor *et al.*, "blaCTX-M genes in clinical Salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 4, pp. 1319–1322, 2005, doi: 10.1128/AAC.49.4.1319-1322.2005.

- [180] D. Costa *et al.*, "Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal [4]," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 58, no. 6, pp. 1311–1312, 2006, doi: 10.1093/jac/dkl415.
- [181] A. Belaaouaj *et al.*, "Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2)," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 75–80, 1994, doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07010.x.
- [182] J. D. D. Pitout, K. S. Thomson, N. D. Hanson, A. F. Ehrhardt, E. S. Moland, and C. C. Sanders, " β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, no. 6, pp. 1350–1354, 1998, doi: 10.1128/aac.42.6.1350.
- [183] V. Cattoir, L. Poirel, V. Rotimi, C. J. Soussy, and P. Nordmann, "Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 60, no. 2, pp. 394–397, 2007, doi: 10.1093/jac/dkm204.
- [184] V. Cattoir, F. X. Weill, L. Poirel, L. Fabre, C. J. Soussy, and P. Nordmann, "Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 59, no. 4, pp. 751–754, 2007, doi: 10.1093/jac/dkl547.
- [185] C. H. Park, A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, and D. C. Hooper, "Prevalence in the United States of *aac*(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 11, pp. 3953–3955, 2006, doi: 10.1128/AAC.00915-06.
- [186] Y. Sáenz *et al.*, "Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 10, pp. 3996–4001, 2004, doi: 10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004.
- [187] L. Madsen, F. M. Aarestrup, and J. E. Olsen, "Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella Typhimurium*," *Vet. Microbiol.*, vol. 75, no. 1, pp. 73–82, 2000, doi: 10.1016/S0378-1135(00)00207-8.

- [188] Q. Wei *et al.*, “dfrA27, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli*,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 63, no. 2, pp. 405–406, 2009, doi: 10.1093/jac/dkn474.
- [189] L. Guardabassi, L. Dijkshoorn, J. M. Collard, J. E. Olsen, and A. Dalsgaard, “Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 49, no. 10, pp. 929–936, 2000, doi: 10.1099/0022-1317-49-10-929.
- [190] L. K. Ng, M. R. Mulvey, I. Martin, G. A. Peters, and W. Johnson, “Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 12, pp. 3018–3021, 1999, doi: 10.1128/aac.43.12.3018.
- [191] D. Mazel, B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies, “Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel aad gene,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 6, pp. 1568–1574, 2000, doi: 10.1128/AAC.44.6.1568-1574.2000.
- [192] C. Maynard *et al.*, “Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 10, pp. 3214–3221, 2003, doi: 10.1128/AAC.47.10.3214-3221.2003.
- [193] V. Perreten and P. Boerlin, “A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 3, pp. 1169–1172, 2003, doi: 10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003.
- [194] M. M. Navia, J. Ruiz, J. Sanchez-Cespedes, and J. Vila, “Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 46, no. 4, pp. 295–298, 2003, doi: 10.1016/S0732-8893(03)00062-2.
- [195] C. Levesque, L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy, “PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, no. 1, pp. 185–191, 1995, doi: 10.1128/aac.39.1.185.
- [196] P. A. M. Guinée, W. H. Jansen, T. Wadstrom, and R. Sellwood, “*Escherichia coli*

associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: Leeww, P.W., Guinée, P.A.M. (Eds.), *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea*, "Curr. Top. Vet. Anim. Sci. Martinus Nijhoff Publ. Springer, Holl.", pp. 126–162, 1981.

- [197] F. Orskov and I. Orskov, "Serotyping of *Escherichia coli*," *Methods Microbiol. by T. Bergan. Acad. Press. London.*, vol. 14, pp. 43–112, 1984.
- [198] T. A. Cebula, W. L. Payne, and P. Feng, "Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 248–250, 1995, doi: 10.1128/jcm.33.1.248-250.1995.
- [199] M. Vidal *et al.*, "Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 10, pp. 5362–5365, 2005, doi: 10.1128/JCM.43.10.5362-5365.2005.
- [200] S. Persson, K. E. P. Olsen, S. Ethelberg, and F. Scheutz, "Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 6, pp. 2020–2024, 2007, doi: 10.1128/JCM.02591-06.
- [201] C. A. Alonso *et al.*, "Occurrence and characterization of stx and/or eae-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar," *Vet. Microbiol.*, vol. 207, no. March, pp. 69–73, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.vetmic.2017.05.028.
- [202] V. Michelacci *et al.*, "A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 19, no. 3, pp. E149–E156, Mar. 2013, doi: 10.1111/1469-0691.12122.
- [203] H. Brugère, A. Frédéric, M.-K. Patricia, A. K. Lisa, and L. Estelle, "E. coli producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques," 2012. [Online]. Available: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fmag.anses.fr%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2FBEP-mg-BE50->

art6.pdf&psig=AOvVaw0oBDegQLliwZd04s7UslzJ&ust=1729428003581000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CAQQn5wMahcKEwigxtXwu5qJAxUAAAAAHQAAAAAQBA.

- [204] J. R. Johnson *et al.*, "Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 7, pp. 2161–2168, 2003, doi: 10.1128/AAC.47.7.2161-2168.2003.
- [205] R. R. Spurbeck *et al.*, "Escherichia coli isolates that carry vat, fyua, chua, and yfcv efficiently colonize the urinary tract," *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 12, pp. 4115–4122, 2012, doi: 10.1128/IAI.00752-12.
- [206] J. R. Johnson and A. L. Stell, "Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise," *J. Infect. Dis.*, vol. 181, no. 1, pp. 261–272, 2000, doi: 10.1086/315217.
- [207] D. Marc and M. Dho-Moulin, "Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: Serogroup-specific sites within fimA and nucleotide sequence of fimI," *J. Med. Microbiol.*, vol. 44, no. 6, pp. 444–452, 1996, doi: 10.1099/00222615-44-6-444.
- [208] S. Yamamoto, A. Terai, K. Yuri, H. Kurazono, Y. Takeda, and O. Yoshida, "Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 12, no. 2, pp. 85–90, 1995, doi: 10.1016/0928-8244(95)00053-A.
- [209] C. Le Bouguenec, M. Archambaud, and A. Labigne, "Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, no. 5, pp. 1189–1193, 1992, doi: 10.1128/jcm.30.5.1189-1193.1992.
- [210] S. T. Gunzburg, N. G. Tornieporth, and L. W. Riley, "Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, no. 5, pp. 1375–1377, 1995, doi: 10.1128/jcm.33.5.1375-1377.1995.
- [211] R. R. Spurbeck, A. E. Stapleton, J. R. Johnson, S. T. Walk, T. M. Hooton, and H. L.

- T. Mobley, "Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Contribution of Ygi and Yad fimbriae," *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 12, pp. 4753–4763, 2011, doi: 10.1128/IAI.05621-11.
- [212] J. R. Johnson, A. Gajewski, A. J. Lesse, and T. A. Russo, "Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 12, pp. 5798–5802, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.12.5798-5802.2003.
- [213] A. Mora *et al.*, "Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans," *Vet. Microbiol.*, vol. 167, no. 3–4, pp. 506–512, 2013, doi: 10.1016/j.vetmic.2013.08.007.
- [214] M. Moulin-Schouleur *et al.*, "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 10, pp. 3366–3376, 2007, doi: 10.1128/JCM.00037-07.
- [215] I. Tóth, F. Héroult, L. Beutin, and E. Oswald, "Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV)," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 9, pp. 4285–4291, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.9.4285-4291.2003.
- [216] C. Dozois, M. Dho-Moulin, Brée.A.; J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss III, "Relationship between the *tsh* autotransporter and pathogenicity analysis of the *tsh* genetic region," *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 7, pp. 4145–4154, 2000.
- [217] P. D. Vigil *et al.*, "Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract," *MBio*, vol. 2, no. 3, 2011, doi: 10.1128/mBio.00066-11.
- [218] H. Schmidt, L. Beutin, and H. Karch, "Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933," *Infect. Immun.*, vol. 63, no. 3, pp. 1055–1061, 1995, doi: 10.1128/iai.63.3.1055-1061.1995.
- [219] R. Tozzoli, A. Caprioli, S. Cappannella, V. Michelacci, M. L. Marziano, and S. Morabito, "Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative

Escherichia coli,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 178–183, 2010, doi: 10.1128/JCM.01648-09.

- [220] J. R. Johnson and T. T. O’Bryan, “Detection of the Escherichia coli Group 2 Polysaccharide Capsule Synthesis Gene kpsM by a Rapid and Specific PCR-Based Assay,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, no. 4, pp. 1773–1776, 2004, doi: 10.1128/JCM.42.4.1773-1776.2004.
- [221] M. Moulin-Schouleur *et al.*, “Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 Escherichia coli isolates of human and avian origin,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 10, pp. 3484–3492, 2006, doi: 10.1128/JCM.00548-06.
- [222] J. R. Johnson *et al.*, “Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and iroN(E. coli), among Escherichia coli isolates from patients with urosepsis,” *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 5, pp. 3040–3047, 2000, doi: 10.1128/IAI.68.5.3040-3047.2000.
- [223] J. R. Johnson *et al.*, “Id Week 2015,” vol. 2, no. September, p. 2633851, 2017, doi: 10.1093/o.
- [224] K. E. Rodriguez-Siek, C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, and L. K. Nolan, “Characterizing the APEC pathotype,” *Vet. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 241–256, Mar. 2005, doi: 10.1051/vetres:2004057.
- [225] R. J. Bauer *et al.*, “Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for Escherichia coli Urinary Tract Infection—usp, iha, and iroN E. coli,” *J. Infect. Dis.*, vol. 185, no. 10, pp. 1521–1524, May 2002, doi: 10.1086/340206.
- [226] J. Bengtsson-Palme, E. Kristiansson, and D. G. J. Larsson, “Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 42, no. 1, pp. 68–80, 2018, doi: 10.1093/femsre/fux053.
- [227] S. Tamta *et al.*, “Antimicrobial resistance pattern of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli isolated from fecal samples of piglets and pig farm workers of selected organized farms of India,” *Vet. World*, vol. 13, no. 2, pp. 360–363, Feb. 2020, doi: 10.14202/vetworld.2020.360-363.
- [228] P. Vounba, J. Arsenault, R. Bada-Alambédji, and J. M. Fairbrother, “Prevalence of

antimicrobial resistance and potential pathogenicity, and possible spread of third generation cephalosporin resistance, in *Escherichia coli* isolated from healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal,” *PLoS One*, vol. 14, no. 3, p. e0214304, Mar. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0214304.

- [229] B. A. Wall *et al.*, “Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. In Fao. <http://www.fao.org/documents/card/es/c/d5f6d40d-ef08-4fcc-866b-5e5a92a12dbf/>,” 2016, [Online]. Available: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2017002096>.
- [230] Y. Suzuki *et al.*, “Antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from dairy cows and their surrounding environment on a livestock farm practicing prudent antimicrobial use,” *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 240, p. 113930, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.ijheh.2022.113930.
- [231] P. Amador, R. Fernandes, C. Prudêncio, and I. Duarte, “Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Portuguese Livestock Manure,” *antibiotics*, 2019, doi: 10.3390/antibiotics8010023.
- [232] S. W. Shin, J. Byun, M. Jung, M. Shin, and H. S. Yoo, “Antimicrobial resistance, virulence genes and PFGE-profiling of *Escherichia coli* isolates from South Korean cattle farms,” *J. Microbiol.*, vol. 52, no. 9, pp. 785–793, Sep. 2014, doi: 10.1007/s12275-014-4166-1.
- [233] M. Shahrani, F. S. Dehkordi, and H. Momtaz, “Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran,” *Biol. Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1186/0717-6287-47-28.
- [234] D. Barour, A. Berghiche, and N. Boulebda, “Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria,” *Vet. World*, vol. 12, no. 8, pp. 1195–1203, Aug. 2019, doi: 10.14202/vetworld.2019.1195-1203.
- [235] K. Hille *et al.*, “Association of farm-related factors with characteristics profiles of extended-spectrum β -lactamase- / plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from German livestock farms,” *Vet. Microbiol.*, vol. 223, pp. 93–99, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.vetmic.2018.07.022.
- [236] T. Z. Zelelie *et al.*, “Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of

diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under age five with and without diarrhea in Central Ethiopia," *PLoS One*, vol. 18, no. 7, p. e0288517, Jul. 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0288517.

- [237] A. Kara, C. Massaro, G. M. Giammanco, R. Alduina, and N. Boussoualim, "Phylogenetic Diversity, Antibiotic Resistance, and Virulence of *Escherichia coli* Strains from Urinary Tract Infections in Algeria," *Antibiotics*, vol. 13, no. 8, p. 773, Aug. 2024, doi: 10.3390/antibiotics13080773.
- [238] R. M. M. Khairy, Z. A. Fathy, D. M. Mahrous, E. S. Mohamed, and S. S. Abdelrahim, "Prevalence, phylogeny, and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* pathotypes isolated from children less than 5 years old with community acquired- diarrhea in Upper Egypt," *BMC Infect. Dis.*, vol. 20, no. 1, p. 908, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12879-020-05664-6.
- [239] G. Tapia-Pastrana *et al.*, "Virulence genes, antimicrobial resistance profile, phylotyping and pathotyping of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children in Southwest Mexico," *PLoS One*, vol. 19, no. 3, p. e0300304, Mar. 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0300304.
- [240] R. Cantón, J. M. González-Alba, and J. C. Galán, "CTX-M enzymes: Origin and diffusion," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. APR, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.
- [241] V. S. Sónia Ramos, M. de L. E. Dapkevicius, M. Caniça, M. T. Tejedor-Junco, 4 , Gilberto Igrejas 2, 3, and P. Poeta, "129Aa.Pdf," *Animals*, vol. 10, no. 2239, pp. 2–15, 2020.
- [242] Y. Matsumura *et al.*, "CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, no. 6, pp. 1639–1649, 2015, doi: 10.1093/jac/dkv017.
- [243] L. B. Price *et al.*, "The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx," *MBio*, vol. 4, no. 6, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1128/mBio.00377-13.
- [244] N. Rebbah, Y. Messai, P. Châtre, M. Haenni, J. Y. Madec, and R. Bakour, "Diversity of CTX-M extended-spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* isolates from retail

raw ground beef: First report of CTX-M-24 and CTX-M-32 in Algeria," *Microb. Drug Resist.*, vol. 24, no. 7, pp. 896–908, 2018, doi: 10.1089/mdr.2017.0171.

- [245] S. Ramos *et al.*, "Escherichia coli as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production," *Animals*, vol. 10, no. 12, pp. 1–15, Dec. 2020, doi: 10.3390/ani10122239.
- [246] N. S. Chenouf, I. Carvalho, C. R. Messai, and L. Ruiz-ripa, "Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from Broiler Liver," vol. 00, no. 00, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1089/mdr.2020.0024.
- [247] I. Carvalho *et al.*, "Escherichia coli Producing Extended-Spectrum β -lactamases (ESBL) from Domestic Camels in the Canary Islands: A One Health Approach," *Animals*, vol. 10, no. 8, p. 1295, Jul. 2020, doi: 10.3390/ani10081295.
- [248] D. A. Tadesse *et al.*, "Whole-Genome Sequence Analysis of CTX-M Containing Escherichia coli Isolates from Retail Meats and Cattle in the United States," vol. 24, no. 7, pp. 939–948, 2018, doi: 10.1089/mdr.2018.0206.
- [249] J. Dantas Palmeira and H. M. N. Ferreira, "Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world," *Heliyon*, vol. 6, no. 1, p. e03206, 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03206.
- [250] L. F. Chen *et al.*, "Widespread dissemination of CTX-M-15 genotype extended-spectrum- β -lactamase-producing enterobacteriaceae among patients presenting to community hospitals in the southeastern United States," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 2, pp. 1200–1202, 2014, doi: 10.1128/AAC.01099-13.
- [251] M. L. Dia *et al.*, "Molecular detection of CTX-M-15-type β -lactamases in Escherichia coli strains from Senegal," *New Microbes New Infect.*, vol. 9, pp. 45–46, 2016, doi: 10.1016/j.nmni.2015.11.009.
- [252] J. Hernández *et al.*, "Human-associated extended-spectrum β -lactamase in the Antarctic," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 6, pp. 2056–2058, 2012, doi: 10.1128/AEM.07320-11.
- [253] K. Liao *et al.*, "Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-

producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 87, no. 1, pp. 45–48, 2017, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.007.

- [254] L. Poirel, P. Nordmann, S. Ducroz, H. J. Boulouis, P. Arné, and Y. Millemann, “Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST274 in companion animals,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 5, pp. 2372–2375, 2013, doi: 10.1128/AAC.02622-12.
- [255] N. Silva, I. Carvalho, C. Currie, M. Sousa, G. Igrejas, and P. Poeta, “Extended-Spectrum- β -Lactamase and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Food-Producing Animals in Europe,” in *Antibiotic Drug Resistance*, Wiley, 2019, pp. 261–273.
- [256] D. R. Ibrahim, C. E. R. Dodd, D. J. Stekel, S. J. Ramsden, and J. L. Hobman, “Multidrug resistant , extended spectrum β -lactamase (ESBL) -producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm,” no. July 2015, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1093/femsec/fiw013.
- [257] S. Lee, L. Teng, N. Dilorenzo, T. A. Weppelmann, and K. C. Jeong, “Prevalence and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamase Producing *Escherichia coli* in Grazing Beef Cattle,” vol. 10, no. January, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.03076.
- [258] M. K. Aworh, E. Ekeng, P. Nilsson, B. Egyir, C. Owusu-Nyantakyi, and R. S. Hendriksen, “Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Among Humans, Beef Cattle, and Abattoir Environments in Nigeria,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 12, no. April, pp. 1–11, 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.869314.
- [259] I. M. Sheldon *et al.*, “Specific Strains of *Escherichia coli* Are Pathogenic for the Endometrium of Cattle and Cause Pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice,” *PLoS One*, vol. 5, no. 2, p. e9192, Feb. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0009192.
- [260] T. Tomazi, F. M. Coura, J. L. Gonçalves, M. B. Heinemann, and M. V Santos, “Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis,” *J. Dairy Sci.*, vol. 101, no. 10, pp. 9406–9418, 2018, doi: 10.3168/jds.2018-14485.

- [261] M. Barzan, M. Rad, G. Hashemi Tabar, and M. Azizzadeh, "Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* isolates from healthy and diarrhoeic calves in Mashhad, Iran.," *Bulg. J. Vet. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 11–18, 2017, doi: 10.15547/bjvm.952.
- [262] L. Jakobsen *et al.*, "Microarray-based detection of extended virulence and antimicrobial resistance gene profiles in phylogroup B2 *Escherichia coli* of human, meat and animal origin," *J. Med. Microbiol.*, vol. 60, no. 10, pp. 1502–1511, 2011, doi: 10.1099/jmm.0.033993-0.
- [263] T. Lan *et al.*, "Antimicrobial susceptibility , phylotypes , and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis in five provinces of China," 2020, doi: 10.1080/09540105.2020.1736009.
- [264] C. Garcia-Aljaro, E. Moreno, A. Andreu, G. Prats, and A. R. Blanch, "Phylogroups, virulence determinants and antimicrobial resistance in stx gene-carrying *Escherichia coli* isolated from aquatic environments," *Res. Microbiol.*, vol. 160, no. 8, pp. 585–591, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.resmic.2009.08.004.
- [265] S. Ramos *et al.*, "High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter : a food safety risk S onia Ramos , a – d † Nuno Silva , a † Manuela Canic and Patr ´," no. April 2012, pp. 517–526, 2013, doi: 10.1002/jsfa.5814.
- [266] C. Valat *et al.*, "Phylogenetic Grouping and Virulence Potential of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains in Cattle," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 13, pp. 4677–4682, Jul. 2012, doi: 10.1128/AEM.00351-12.
- [267] M. Giufrè *et al.*, "Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in humans and from food-producing animals in Italy: a 'One Health' study," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 58, no. 5, p. 106433, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106433.
- [268] E. De La Cadena *et al.*, "Genomic Analysis of CTX-M-Group-1-Producing Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEc) from Patients with Urinary Tract Infections (UTI) from Colombia," *Antibiotics*, vol. 9, no. 12, p. 899, Dec. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9120899.
- [269] R. Taghadosi, M. R. Shakibaie, and H. Hosseini-Nave, "Antibiotic resistance, ESBL

genes, integrons, phylogenetic groups and MLVA profiles of *Escherichia coli* pathotypes isolated from patients with diarrhea and farm animals in south-east of Iran,” *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 63, no. July 2018, pp. 117–126, 2019, doi: 10.1016/j.cimid.2019.01.004.

[270] I. Aibinu, T. Odugbemi, and W. Koenig, “Sequence Type ST131 and ST10 Complex (ST617) predominant among CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates from Nigeria *,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, no. 3, pp. E49–E51, 2011, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03730.x.

[271] O. E. Ojo, S. Schwarz, and G. B. Michael, “Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from chicken production chains in Nigeria,” *Vet. Microbiol.*, vol. 194, pp. 62–68, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.022.

[272] S. E. Mshana *et al.*, “Predictors of bl a CTX-M-15 in varieties of *Escherichia coli* genotypes from humans in community settings in Mwanza , Tanzania,” *BMC Infect. Dis.*, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1186/s12879-016-1527-x.

[273] J. Seni *et al.*, “Multiple ESBL-Producing *Escherichia coli* Sequence Types Carrying Quinolone and Aminoglycoside Resistance Genes Circulating in Companion and Domestic Farm Animals in Mwanza , Tanzania , Harbor Commonly Occurring Plasmids,” vol. 7, no. February, pp. 1–8, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00142.

[274] A. Suresh *et al.*, “Evolutionary dynamics based on comparative genomics of pathogenic *Escherichia coli* lineages harboring polyketide synthase (Pks) island,” *MBio*, vol. 12, no. 1, pp. 1–21, 2021, doi: 10.1128/mBio.03634-20.

[275] E. Bozcal, V. Eldem, S. Aydemir, and M. Skurnik, “The relationship between phylogenetic classification , virulence and antibiotic resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in İzmir province ,” 2018, doi: 10.7717/peerj.5470.

[276] F. Toval *et al.*, “Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection,” no. 13, 2014, doi: 10.1128/JCM.02069-13.

[277] B. Pakbin, W. M. Brück, and J. W. A. Rossen, “Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 18, p. 9922,

Sep. 2021, doi: 10.3390/ijms22189922.

- [278] M. D. Kirk, F. J. Angulo, A. H. Havelaar, and R. E. Black, "Diarrhoeal disease in children due to contaminated food.," *Bull. World Health Organ.*, vol. 95, no. 3, pp. 233–234, Mar. 2017, doi: 10.2471/BLT.16.173229.
- [279] T. Nhampossa *et al.*, "Diarrheal disease in rural Mozambique: Burden, risk factors and etiology of diarrheal disease among children aged 0-59 months seeking care at health facilities," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, pp. 12–23, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119824.
- [280] J. O. Oundo, S. M. Kariuki, H. I. Boga, F. W. Muli, and Y. Iijima, "High incidence of enteroaggregative *Escherichia coli* among food handlers in three areas of Kenya: A possible transmission route of travelers' diarrhea," *J. Travel Med.*, vol. 15, no. 1, pp. 31–38, 2008, doi: 10.1111/j.1708-8305.2007.00174.x.
- [281] E. Scallan *et al.*, "Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 7–15, Jan. 2011, doi: 10.3201/eid1701.P11101.
- [282] M. Tzschoppe, A. Martin, and L. Beutin, "A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 152, no. 1–2, pp. 19–30, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.009.
- [283] L. Manhique-Coutinho *et al.*, "Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from children with diarrhea: A cross-sectional study in four provinces of Mozambique," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 121, pp. 190–194, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.054.
- [284] H. K. Saka, N. T. Dabo, B. Muhammad, S. García-Soto, M. Ugarte-Ruiz, and J. Alvarez, "Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes From Children Younger Than 5 Years in Kano State, Nigeria," *Front. Public Heal.*, vol. 7, no. November, pp. 1–8, Nov. 2019, doi: 10.3389/fpubh.2019.00348.
- [285] A. Saeed, H. Abd, and G. Sandstrom, "Microbial aetiology of acute diarrhoea in children under five years of age in Khartoum, Sudan," *J. Med. Microbiol.*, vol. 64, no.

4, pp. 432–437, Apr. 2015, doi: 10.1099/jmm.0.000043.

- [286] A. W. Paton *et al.*, “AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP,” *Nature*, vol. 443, no. 7111, pp. 548–552, Oct. 2006, doi: 10.1038/nature05124.
- [287] M. A. Karmali, M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior, “The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. 1985.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 189, no. 3, pp. 556–63, Feb. 2004, doi: 10.1086/jid/189.3.566.
- [288] A. W. Paton, M. C. Woodrow, R. M. Doyle, J. A. Lanser, and J. C. Paton, “Molecular Characterization of a Shiga Toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 Strain Lacking eae Responsible for a Cluster of Cases of Hemolytic-Uremic Syndrome,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 10, pp. 3357–3361, Oct. 1999, doi: 10.1128/JCM.37.10.3357-3361.1999.
- [289] H. J. Newton, “Shiga Toxin–producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 3, pp. 372–380, Mar. 2009, doi: 10.3201/eid1502.080631.
- [290] D. Baazize-Amami *et al.*, “Prevalence of Asymptomatic Carriers of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Dairy Cattle Farms in the Governorate of Blida (Algeria),” *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, vol. 59, no. 1, pp. 23–28, Mar. 2015, doi: 10.1515/bvip-2015-0004.
- [291] L. Ferhat, A. Chahed, S. Hamrouche, M. Korichi-Ouar, and T. -M. Hamdi, “Research and molecular characteristic of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep carcasses,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 68, no. 6, pp. 546–552, Jun. 2019, doi: 10.1111/lam.13142.
- [292] A. Chahed, B. China, J. Mainil, and G. Daube, “Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 101, no. 2, pp. 361–368, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02954.x.
- [293] R. D. Schurman, H. Hariharan, S. B. Heaney, and K. Rahn, “Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle slaughtered

on Prince Edward Island,” *J. Food Prot.*, vol. 63, no. 11, pp. 1583–1586, 2000, doi: 10.4315/0362-028X-63.11.1583.

- [294] Y. Fang, K. Stanford, and X. Yang, “Lactic Acid Resistance and Population Structure of *Escherichia coli* from Meat Processing Environment,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 10, no. 5, Oct. 2022, doi: 10.1128/spectrum.01352-22.
- [295] M. Bielaszewska, A. W. Friedrich, T. Aldick, R. Schürk-Bulgrin, and H. Karch, “Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome.,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 43, no. 9, pp. 1160–7, Nov. 2006, doi: 10.1086/508195.
- [296] A. Jouini *et al.*, “Detection of Unrelated *Escherichia Coli* Strains Harboring Genes of CTX-M-15, OXA-1, and AAC(6’)-Ib-Cr Enzymes in a Tunisian Hospital and Characterization of Their Integrations and Virulence Factors,” *J. Chemother.*, vol. 22, no. 5, pp. 318–323, Oct. 2010, doi: 10.1179/joc.2010.22.5.318.
- [297] S. Sánchez, S. Díaz-Sánchez, R. Martínez, M. T. Llorente, S. Herrera-León, and D. Vidal, “The new allelic variant of the subtilase cytotoxin (subAB2) is common among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from large game animals and their meat and meat products,” *Vet. Microbiol.*, vol. 166, no. 3–4, pp. 645–649, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.031.
- [298] B. Oporto, J. I. Esteban, G. Aduriz, R. A. Juste, and A. Hurtado, “*Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in Healthy Cattle, Sheep and Swine Herds in Northern Spain,” *Zoonoses Public Health*, vol. 55, no. 2, pp. 73–81, Mar. 2008, doi: 10.1111/j.1863-2378.2007.01080.x.
- [299] V. S. Mihailovskaya, N. B. Remezovskaya, I. N. Zhdanova, M. Starčič Erjavec, and M. V. Kuznetsova, “Virulence potential of faecal *Escherichia coli* strains isolated from healthy cows and calves on farms in Perm Krai,” *Vavilov J. Genet. Breed.*, vol. 26, no. 5, pp. 486–494, Sep. 2022, doi: 10.18699/VJGB-22-59.
- [300] A. Mellmann *et al.*, “Analysis of Collection of Hemolytic Uremic Syndrome–associated Enterohemorrhagic *Escherichia coli*,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 8, pp. 1287–1290, Aug. 2008, doi: 10.3201/eid1408.071082.
- [301] S. Sánchez *et al.*, “Subtilase cytotoxin encoding genes are present in human, sheep

- and deer intimin-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O128:H2,” *Vet. Microbiol.*, vol. 159, no. 3–4, pp. 531–535, 2012, doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.036.
- [302] S. Sánchez, M. García Cenozo, C. Martín, X. Beristain, M. T. Llorente, and S. Herrera-León, “Cluster investigation of mixed O76:H19 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* infection in a Spanish household,” *Epidemiol. Infect.*, vol. 142, no. 5, pp. 1029–1033, May 2014, doi: 10.1017/S0950268813001842.
- [303] J. M. Fleckenstein, D. J. Kopecko, R. L. Warren, and E. A. Elsinghorst, “Molecular characterization of the *tia* invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*,” *Infect. Immun.*, vol. 64, no. 6, pp. 2256–2265, 1996, doi: 10.1128/iai.64.6.2256-2265.1996.
- [304] S. Ishii, K. P. Meyer, and M. J. Sadowsky, “Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse Human and Animal Sources,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 18, pp. 5703–5710, Sep. 2007, doi: 10.1128/AEM.00275-07.
- [305] R. R. Thomas, H. J. L. Brooks, and R. O’Brien, “Prevalence of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* marker genes in diarrhoeic stools in a New Zealand catchment area,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 70, no. 1, pp. 81–84, Jan. 2017, doi: 10.1136/jclinpath-2016-203882.
- [306] R. Söderlund *et al.*, “Genomic comparison of *Escherichia coli* serotype O103:H2 isolates with and without verotoxin genes: implications for risk assessment of strains commonly found in ruminant reservoirs,” *Infect. Ecol. Epidemiol.*, vol. 6, no. 1, p. 30246, Jan. 2016, doi: 10.3402/iee.v6.30246.
- [307] A. Habets *et al.*, “Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 from diarrhoeic and septicaemic calves and relatedness to human Shigatoxigenic *E. coli* O80:H2,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 130, no. 1, pp. 258–264, 2021, doi: 10.1111/jam.14759.
- [308] J. R. Johnson and T. A. Russo, “Uropathogenic *Escherichia coli* as Agents of Diverse Non–Urinary Tract Extraintestinal Infections,” *J. Infect. Dis.*, vol. 186, no. 6, pp. 859–864, Sep. 2002, doi: 10.1086/342490.

- [309] J. R. Johnson and T. A. Russo, "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : 'The other bad E coli'," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 139, no. 3, pp. 155–162, Mar. 2002, doi: 10.1067/mlc.2002.121550.

Production scientifique