

UNIVERSITE DE RENNES I
FACULTE de PHARMACIE

Année 2006

N°

THESE

pour le

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

Mme GOURMELON Michèle

Née le 03 mars 1967 à Brest

TITRE

**Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-
toxines (STEC) dans l'environnement marin (coquillages)**

Présentée et soutenue publiquement le 23 juin 2006

Président	Monsieur le Professeur Cormier , Université de Rennes I
Directeur de thèse	Monsieur le Professeur Cormier
Membres du jury	Madame le Docteur Pommeppy, Ifremer, Centre de Brest Madame le Docteur Gougeon, Maître de Conférences, Université de Rennes I Madame le Docteur Sauvager, Maître de Conférences, Université de Rennes I

Liste des enseignants de la Faculté de Pharmacie

Année universitaire 2005-2006

Monsieur le Professeur Honoraire Jean-Pierre ANGER
 Monsieur le Professeur Honoraire Pierre-Louis BIGET
 Monsieur le Professeur Honoraire Jean HUET
 Monsieur le Professeur Honoraire Pierre JOUAN
 Monsieur le Professeur Honoraire Jean-Yves LEBORGNE
 Monsieur le Professeur Honoraire Bernard RAULT
 Madame le Professeur Honoraire Armelle SAULEAU
 Monsieur le Professeur Honoraire Guy TAIEB
 Monsieur le Professeur Honoraire Louis TREBAUL

Madame le Professeur Liliane ACAR
 Monsieur le Professeur Joël BOUSTIE
 Madame le Professeur Gwénola BURGOT
 Monsieur le Professeur Jean-Louis BURGOT
 Madame le Professeur Josiane CILLARD
 Monsieur le Professeur Pierre CILLARD
 Monsieur le Professeur Michel CORMIER
 Monsieur le Professeur Jean DEUNFF
 Monsieur le Professeur Olivier FARDEL
 Monsieur le Professeur Brice FELDEN
 Madame le Professeur Noëlle GENETET
 Monsieur le Professeur André GUILLOUZO
 Monsieur le Professeur Vincent LAGENTE
 Monsieur le Professeur Pascal LE CORRE
 Monsieur le Professeur Alain LEGRAND
 Monsieur le Professeur Roger LEVERGE
 Madame le Professeur Isabelle MOREL
 Monsieur le Professeur Pierre SADO
 Monsieur le Professeur Alain SEGUI
 Monsieur le Professeur Philippe URIAC
 Monsieur le Professeur Laurent VERNHET

Monsieur le Professeur Associé Didier FONTANEL
 Monsieur le Professeur Associé Denis GIBASSIER

Madame Marie-Laurence ABASQ-PAOFAL, Maître de Conférences
 Mademoiselle Caroline ANINAT, Maître de Conférences
 Madame Laurence BUNETEL, Maître de Conférences
 Mademoiselle Marylène CHOLLET-KRUGLER, Maître de Conférences
 Monsieur Xavier COLLIN, Maître de Conférences
 Monsieur Jean-Charles CORBEL, Maître de Conférences
 Madame Michèle DAVID, Maître de Conférences
 Madame Elisabeth DELAGE, Maître de Conférences
 Monsieur Gilles DOLLO, Maître de Conférences
 Monsieur Reynald GILLET, Maître de Conférences
 Monsieur GILOT David, Maître de Conférences

Monsieur Nicolas GOUAULT, Maître de Conférences
Madame Anne GOUGEON, Maître de Conférences
Monsieur Jacques GUERIN, Maître de Conférences
Madame Annie GUILLER, Maître de Conférences
Monsieur Nabil HANNOUCHE, Maître de Conférences
Monsieur Eric HITTI, Maître de Conférences
Monsieur Alain HOUEIX, Maître de Conférences
Madame Elisabeth LAGENTE, Maître de Conférences
Monsieur Eric LE FERREC, Maître de Conférences
Madame Marie LE FLOCH, Maître de Conférences
Madame Béatrice LEGOUIN-GARGADENNEC, Maître de Conférences
Madame Valérie LECUREUR-ROLLAND, Maître de Conférences
Madame Brigitte LEROY, Maître de Conférences
Madame LOHEZIC-LE DEVEHA T Françoise, Maître de Conférences
Madame Corinne MARTIN-CHOUL Y, Maître de Conférences
Monsieur Didier MEILLARD, Maître de Conférences
Monsieur Laurent METZINGER, Maître de Conférences
Monsieur Jacques MINET, Maître de Conférences
Mademoiselle Liza MOURET, Maître de Conférences
Madame Christine OLLIVIER, Maître de Conférences
Monsieur Jacques RENAULT, Maître de Conférences
Madame Françoise SAUVAGER, Maître de Conférences
Mademoiselle Odile SERGENT, Maître de Conférences
Madame SPARFEL-BERLIVET Lydie, Maître de Conférences
Mademoiselle Sophie TOMASI, Maître de Conférences

Monsieur HORHAND David, ATER

Liste mise à jour le 10/11/2005

Remerciements

Cette recherche des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines dans les coquillages a été possible grâce à une collaboration entre le laboratoire EMP/MIC à Ifremer et l'Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL). Elle a été financée en partie par le PNEC, Programme National d'Environnement Côtier.

Je tiens tout d'abord à remercier M Michel Cormier pour avoir accepté de présider ce jury de thèse sur cette thématique et Mme Monique Pommeputy, responsable du département EMP, Ifremer, pour le choix du sujet au laboratoire et ses conseils. Je remercie également Mmes Anne Gougeon et Françoise Sauvager pour avoir accepté de participer à ce jury.

Un grand merci à Mmes Christine Vernozy-Rozand et Marie-Pierre Montet pour leur accueil à ENVL, pour m'avoir fait partager leurs expériences sur la recherche de ces bactéries et pour le travail réalisé au cours de cette étude (isolement des souches STEC par hybridation sur colonie). Je tiens également à remercier M Lothar Beutin pour les très intéressants échanges par e-mails lors de la rédaction de la publication issue de ce travail et la recherche de l'identité des variants Stx1 obtenus dans les coquillages.

Je remercie également les différentes personnes du laboratoire EMP/MIC, et tout particulièrement celles qui ont contribué aux résultats obtenus au cours de cette étude : Solen Lozach et Cécile Le Mennec pour la réalisation d'une partie des analyses, Dominique Hervio-Heath, Marie-Paule Caprais et Jean-Claude Le Saux pour leurs conseils ou leurs participations au travail expérimental.

Je remercie également les différentes personnes des laboratoires côtiers de l'Ifremer des centres de Boulogne, Port-en-Bessin, Concarneau, La Rochelle et Toulon ayant assuré le prélèvement des coquillages et les analyses *E. coli*.

Enfin, un grand merci à Pascal, Fanny, Nicolas, Elise et Claire.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE	2
ANNEE UNIVERSITAIRE 2005-2006	2
REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ILLUSTRATIONS	7
INTRODUCTION	8
1. LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE / PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	10
1.1. La contamination de l'environnement marin	10
1.2. Les TIACs liées aux coquillages	11
1.3. Présentation des <i>Escherichia coli</i> pathogènes dont les STEC.....	12
1.4. La contamination par les STEC.....	13
1.5. Description des facteurs de virulence	15
1.5.1. Les Shiga-toxines	15
1.5.2. Les autres facteurs de virulence	18
2. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE	21
3. MATERIELS ET METHODES	22
3.1. Mise au point du protocole : optimisation de la préparation des échantillons	22
3.1.1. Préparation des enrichissements pour une recherche des <i>E. coli</i> O157	22
3.1.2. Préparation des enrichissements pour une recherche des gènes <i>stx</i> par PCR	23
3.2. Recherche des STEC et des <i>E. coli</i> O157 : H7 dans les coquillages et dans des eaux de l'environnement.....	24
3.2.1. Prélèvements des échantillons	24
3.2.1.1. Obtention des bouillons d'enrichissement à partir des coquillages et des eaux	25
3.2.2. Isolement des <i>E. coli</i> O157 par IMS (ISO 16654).....	26
3.2.3. Recherche des gènes <i>stx</i> par PCR.....	27
3.2.4. Isolement des STEC à partir des bouillons d'enrichissement PCR <i>stx</i> positif.....	28
3.2.4.1. Description des sondes.....	28
3.2.4.2. Hybridation sur colonie	28
3.2.4.3. Identification et caractérisation des souches	29
3.2.5. Séquencage des amplicons	31
3.2.6. Analyse de l'indicateur de contamination fécale <i>Escherichia coli</i>	31
4. RESULTATS.....	32

4.1. Mise au point du protocole IMS/culture et PCR <i>stx</i> sur coquillages artificiellement contaminés	32
4.1.1. Recherche des <i>E. coli</i> O157 par IMS	32
4.1.2. Recherche des STEC par PCR <i>stx</i>	33
4.2. Analyse des coquillages	34
4.2.1. Recherche des <i>E. coli</i> O157 : H7	34
4.2.2. Recherche des STEC par PCR	35
4.2.2.1. Recherche des gènes <i>stx</i>	35
4.2.2.2. Recherche de souches STEC	37
4.2.2.3. Caractérisation des souches isolées de coquillages	37
4.3. Comparaison de la présence des STEC et de l'indicateur de contamination fécale (<i>E. coli</i>)....	39
4.3.1. Coquillages analysés au cours de l'étude	39
4.4. Analyse des eaux	41
5. DISCUSSIONS / CONCLUSION	43
6. PERMIS D'IMPRIMER	51
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52
8. ABREVIATIONS	60
ANNEXES	61
Annexe 1 : Classement des zones conchylicoles (Anon., 1991)	61
Annexe 2 : Concentrations en <i>E. coli</i> des coquillages	62
Annexe 3 : Séquences des gènes <i>stx1</i> de 3 des souches isolées au cours de l'étude et déposées dans la banque de données GenBank	64
Annexe 4 : Publication	68

Liste des illustrations

Figure 1 : Principales sources de contamination fécale de l'environnement marin....	10
Figure 2 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines	17
Figure 3 : Principales étapes du processus infectieux des STEC	18
Figure 4 : Localisation des principaux facteurs de virulence dans une bactérie STEC	20
Figure 5 : Localisation des points de prélèvements de coquillages (sites 1, 2, 3, 4, 5, 6 : zones conchylicoles classées en B ; 7 : en aval d'une station d'épuration) et des eaux (site 2).....	25
Figure 6 : Influence de la préparation des bouillons d'enrichissement sur la sensibilité de la PCR.....	34
Tableau 1 : Description des amorces utilisées pour la recherche de l'ensemble des gènes <i>stx</i>, des gènes <i>stx1</i> et <i>stx2</i>, des variants <i>stx1c</i> et <i>stx1d</i> et des gènes <i>ehx</i>, <i>eae</i> et <i>uidA</i>..	30
Tableau 2 : Dénombrement des colonies caractéristiques d'<i>E. coli</i> O157 après isolement sur géloses spécifiques des suspensions obtenues par IMS à partir des bouillons d'enrichissement des CLI artificiellement contaminés par une souche <i>E. coli</i> O157.	32
Tableau 3 : Echantillons PCR <i>stx</i> positif : 31/72 lots de coquillages prélevés dans l'environnement.....	36
Tableau 4 : Caractérisation des souches isolées à partir de lots de coquillages.....	38
Tableau 5 : Détection des STEC, des gènes <i>stx</i> et des concentrations en <i>E. coli</i> des coquillages analysés.	40
Tableau 6 : Concentrations de l'indicateur de contamination fécale, <i>E. coli</i>, et résultats des PCR <i>stx</i> commun selon les conditions de Read <i>et al.</i> (1992) après enrichissement des eaux prélevées sur le site 2..	41
Tableau 7 : Concentrations en <i>E. coli</i> des coquillages analysés au cours de l'étude... 63	

Introduction

La qualité sanitaire du milieu marin côtier est influencée par la présence de rejets urbains ou de rejets diffus d'origine agricole. Ces effluents sont riches en bactéries ou virus d'origine fécale, dont certains ont été mis en cause dans des pathologies humaines (Lipp et Rose, 1997 ; Feldhusen, 2000 ; Yam *et al.*, 1999).

Parmi les microorganismes pouvant présenter un danger pour l'homme, certains, pathogènes émergents ces dernières années, n'ont été que récemment recherchés dans l'environnement : on peut citer, par exemple, les *Cryptosporidium* et les *Giardia* pour les parasites (Li *et al.*, 2006), les norovirus pour les virus (Le Guyader *et al.*, 2000) et les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC ; Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli* ; ancienne dénomination *Escherichia coli* vérotoxiques, VTEC) pour les bactéries. Ces derniers ne sont connus que depuis 1982, date à laquelle *E. coli* O157 : H7 a été isolé pour la première fois dans des épidémies de colites hémorragiques aux Etats-Unis liées à la consommation d'hamburgers contaminés (Riley *et al.*, 1983). Les STEC ont été depuis mis en cause dans plusieurs épidémies ou cas sporadiques au Canada, au Japon, en Afrique et en Europe... (Chalmers *et al.*, 2000 ; Haeghebaert *et al.*, 2001b ; Vernozy-Rozand et Montet, 2001) ; en France, trois toxi-infections alimentaires collectives (TIACs) investiguées ont été attribuées à des STEC (souche *E. coli* O148 dans de la viande de mouton ; Espié *et al.*, 2003 ; souche *E. coli* O157 dans un couscous ; Haeghebaert *et al.*, 2002a ; souches *E. coli* O157 : H7 dans des steaks hachés congelés en octobre-novembre 2005 ; Institut de veille sanitaire, InVS, <http://www.invs.sante.fr/>).

La contamination de l'environnement par les STEC peut éventuellement conduire à un risque pour la santé humaine ; en effet, des infections à STEC ont été reportées suite à la contamination d'aliments ou d'eaux ou suite à la pratique d'activités récréatives telles que les baignades dans des eaux douces contaminées. Le littoral en tant que réceptacle des effluents urbains et agricoles pourrait héberger de telles bactéries dans les zones particulièrement exposées. L'homme pourrait alors être infecté lors de la consommation de coquillages consommés crus ou lors de baignades dans des eaux marines de mauvaise qualité. A notre connaissance, cette implication de l'eau de mer et des coquillages n'a jamais été mise en évidence en France.

L'originalité de cette étude était de rechercher si ces bactéries pouvaient être présentes dans l'environnement marin (tout particulièrement dans les coquillages) en développant ou

adaptant des méthodes de détection. La présence de ces bactéries pourrait peut-être expliquer certaines TIACs liées à la consommation de coquillages dont l'agent responsable n'a pas été identifié.

1. Le contexte scientifique / partie bibliographique

1.1. La contamination de l'environnement marin

La contamination microbiologique du milieu littoral est liée aux apports de diverses origines parmi lesquels les rejets anthropiques urbains et agricoles (Pommepeuy *et al.*, 2005). La qualité du milieu qui en résulte va conditionner les activités littorales. En effet, la présence, dans les eaux, de contaminants et en particulier de micro-organismes pathogènes pour l'homme peut constituer un risque sanitaire lors de la baignade ou de la consommation de coquillages.

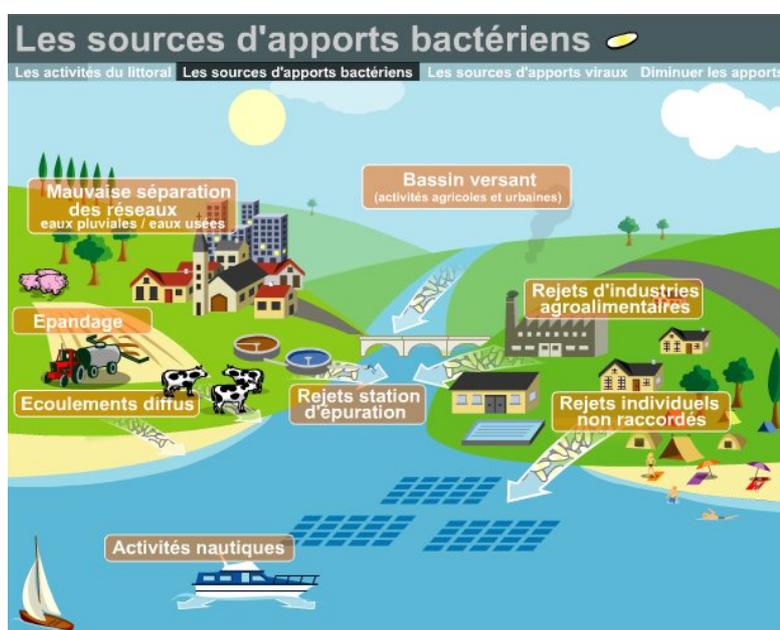


Figure 1 : Principales sources de contamination fécale de l'environnement marin (<http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/microbio/index.htm>)

Les sources potentielles d'apport de bactéries et de virus d'origine entérique sont multiples, il s'agit de rejets directs ou diffus, d'origine humaine ou animale : animaux domestiques (bovins, porcins, volailles ... ; Cox *et al.*, 2005) ou sauvages (oiseaux de bord de mer tels que les goélands, les canards ..., Jones et Obiro-Danso, 1999 ; Fogarty *et al.*, 2003). Les apports d'origine urbaine sont principalement les rejets de station d'épuration, les mauvaises séparations des réseaux d'eaux usées et d'eaux pluviales, les rejets individuels non raccordés sur le réseau d'évacuation des eaux usées ... Les rejets agricoles sont constitués essentiellement par les épandages de lisiers par écoulement diffus, les pâturages (Dupray *et al.*, 1999 ; Crowther *et al.*, 2002)...

Les bactéries et virus entériques présents dans les eaux littorales peuvent être accumulés par les coquillages filtreurs (huîtres, moules ...) et être à l'origine de pathologies digestives ou toxi-infections alimentaires (Lee et Younger 2002).

1.2. Les TIACs liées aux coquillages

Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins 2 cas de symptômes, en général, digestifs dont la cause peut être rapportée à une même origine alimentaire (JO, Juin 1988). En France, les TIACs sont à déclaration obligatoire et vont être à l'origine d'enquêtes épidémiologiques et vétérinaires qui permettront d'identifier les agents microbiens responsables de ces troubles et les facteurs favorisants (ces enquêtes sont réalisées par les médecins inspecteurs de santé publique des DDASS (Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales), des inspecteurs de santé publique vétérinaire des directions départementales des services vétérinaires, DDSV et par l'Institut de Veille Sanitaire qui analyse et synthétise les données.

Les toxi-infections alimentaires sont une cause importante de maladie et de mortalité dans le monde ; par exemple, aux Etats-Unis, elles ont été estimées être à l'origine d'environ 76 millions de maladies et 5000 morts par an (Mead *et al.*, 1999). En France, environ 500 TIACs sont déclarées chaque année (Zidane et Pommepuy, 2003 ; Haeghebaert *et al.*, 2002b).

Parmi les aliments ayant été impliqués dans des TIACs, on peut citer les coquillages, qui sont traditionnellement consommés crus ou insuffisamment cuits (Lipp et Rose 1997 ; Feldhusen *et al.*, 2000 ; Yam *et al.*, 1999). De plus, ces coquillages, ayant la capacité de filtrer des quantités importantes d'eau (jusqu'à 5 litres d'eau par heure, par exemple), peuvent concentrer tous les bactéries ou virus potentiellement pathogènes apportés par les rejets terrestres et présents dans les eaux environnantes ou les bactéries résidant naturellement dans les eaux côtières (Lee et Younger 2002).

L'implication des produits de la mer dans les toxi-infections alimentaires est variable d'une étude à l'autre. Par exemple, ces produits ont été impliqués dans respectivement 10, 16, 20 et plus de 70 % des toxi-infections respectivement à New York (données de 1980 à 1994), en Angleterre et au Pays de Galles (données de 1992 à 1996), en Australie et au Japon (Walace *et al.*, 1999 ; Panisello *et al.*, 2000 ; Scoging 2003). En France, les produits de la mer et les coquillages ont été impliqués respectivement dans 13 et 4 % des épisodes de toxi-infections alimentaires de 1999 à 2001 (Haeghebert *et al.*, 2002). Les coquillages et

spécialement les huîtres, ont également couramment été suspectés d'être impliqués dans les épisodes de gastro-entérites survenant dans les différents pays européens. En implantant les standards coliformes fécaux et *E. coli*, en développant les stations d'épurations dans les communes littorales et en réalisant l'épuration des coquillages, l'incidence des TIACs liées aux coquillages, tout spécialement celles liées aux salmonelles a considérablement diminué dans le monde ces dernières années. Toutefois, des microorganismes tels que les virus entériques et les vibrios sont encore isolés dans des coquillages et impliqués dans des TIACs liées aux coquillages (Wallace *et al.*, 1999 ; Lee et Younger 2002; Sumner et Ross 2002). Des revues récentes (Potasman *et al.*, 2002 ; Butt *et al.*, 2004) présentent les microorganismes qui ont été impliqués dans des épisodes de toxi-infections alimentaires par consommation de coquillages ou la pratique de la baignade. Il est à noter que 1) ces épisodes de toxi-infections alimentaires par les coquillages sont sujets à une sous-estimation comme cela est observé également pour les TIACs liées aux aliments et 2) dans une part importante des épisodes de TIAC le pathogène n'est pas identifié (Wall, 1996 ; Wallace *et al.*, 1999 ; Haeghebert *et al.*, 2002).

A notre connaissance, aucune TIAC à STEC n'a été attribuée, à l'heure actuelle, à des coquillages en France ou dans le monde.

1.3. Présentation des *Escherichia coli* pathogènes dont les STEC

Les *Escherichia coli* font partie de la flore habituelle du tube digestif de l'homme et des animaux (Cox *et al.*, 2005), cependant certaines souches possédant des facteurs de pathogénicité peuvent être à l'origine de pathologies intestinales mais également extra-digestives (Grimont, 1998). Ces facteurs sont essentiellement des toxines pour les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des composés permettant l'invasion pour les entéroinvasifs (EIEC), des facteurs permettant l'attachement aux parois intestinales pour les entéro-pathogènes (EPEC) et, à la fois, des toxines et des facteurs d'attachement pour les entérohémorragiques (EHEC). Parmi ces derniers, la souche *E. coli* O157 : H7, la plus fréquemment rencontrée dans les pathologies, proviendrait d'une souche entéro-pathogène O55 : H7, impliquée dans des diarrhées chez l'enfant. Cette souche aurait été lysogénéisée par des phages possédant les gènes *stx1* ou *stx2* qui codent pour des Shiga-toxines ou vérotoxines, dénommées ainsi du fait de leurs grandes similitudes avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae* et en raison de leur capacité à tuer *in vitro* les cellules Véro, cellules de rein de singe (Feng *et al.*, 1998).

Les EHEC, correspondant aux souches STEC isolées en pathologie humaine, présentent le caractère pathogène le plus important et peuvent conduire à des pathologies sévères, digestives (simples diarrhées ou colites hémorragiques, avec une période d'incubation de 2 à 10 jours ; Griffin et Tauxe 1991) ou extra-digestives (syndrome hémolytique et urémique, SHU, avec 3 à 5 % de mortalité chez le jeune enfant et purpura thrombotique thrombocytopénique, PTT). Les complications rénales sont particulièrement observées chez les jeunes enfants et les personnes âgées. Lors de la mise en évidence de telles pathologies, *E. coli* O157 : H7 est le plus souvent isolé : en France, par exemple, le sérotype O157 a été mis en évidence dans 50 % des cas de SHU étudiés de 1993-1999 (Haeghebaert *et al.*, 2001b). Les autres souches, productrices de Shiga-toxines, pouvant également être rencontrées en pathologie sont principalement les *E. coli* O103, O26, O111 et O145 (Bettelheim 2000 ; Haeghebaert *et al.*, 2001b ; Hiramatsu *et al.*, 2002 ; Beutin *et al.*, 2004). Toutefois, plus de 200 serotypes O : H différents d'*E. coli* produisant des Shiga-toxines ont été mis en évidence lors d'infections humaines, dans des aliments ou des prélèvements de l'environnement (Beutin *et al.*, 2004). La présence d'autres gènes tels que les facteurs d'attachement et d'effacement ainsi que d'autres facteurs tels que l'entérohémolysine est susceptible d'augmenter la virulence des souches.

Parmi les STEC ou *E. coli* O157 : H7, des différences importantes dans le caractère pathogène des souches sont observées selon la nature et le nombre de gènes de virulence qu'elles possèdent. En général, les bactéries isolées dans les selles de malades possèdent la majorité ou l'ensemble des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA* codant respectivement pour les Shiga-toxines 1 et 2, l'intimine, protéine de la membrane externe intervenant dans l'attachement aux cellules intestinales, et l'entérohémolysine. Par contre, dans les aliments, chez les animaux ou dans l'environnement, une partie des souches ne possède que certains des gènes et de ce fait, sont le plus souvent moins pathogènes. Ainsi, des souches d'*E. coli* O157 : H7 ne possédant pas les gènes des Shiga-toxines ont été mis en évidence dans des selles de génisse (2 sur les 3 souches isolées à partir de 300 échantillons ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2000).

1.4. La contamination par les STEC

Une contamination de l'homme par les STEC se fait principalement par ingestion d'une faible quantité de bactéries (la dose infectieuse est inférieure à 100 bactéries ; Griffin et Tauxe, 1991). Plusieurs voies de contamination existent : principalement l'ingestion d'aliments ou d'eaux contaminés : viandes de bœuf insuffisamment cuites, produits laitiers

au lait cru, ou autres aliments et eaux souillés par des déjections animales (Cody *et al.*, 1999 ; Michino *et al.*, 1999 ; Tuttle *et al.*, 1999 ; Ogden *et al.*, 2001). Des contaminations directes par contact avec des malades ou des animaux contaminés ont été également observées (Boudaillez *et al.*, 1997 ; Chalmers *et al.*, 2000). Des cas de contamination au cours de baignade dans des eaux douces ont été reportés (Ackman *et al.*, 1997 ; Chalmers *et al.*, 2000 ; Paunio *et al.*, 1999).

Les ruminants et tout particulièrement les bovins sont les principaux réservoirs (Hancock *et al.*, 2001 ; Le Jeune *et al.*, 2001). Les STEC peuvent être isolés d'animaux malades ou d'animaux sains (Enriquez *et al.*, 2001). Le portage sain est généralement transitoire (inférieur à un mois) mais à l'échelle du troupeau l'excrétion peut durer plusieurs années (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). L'excrétion des *E. coli* O157 : H7 par des bovins a été évaluée et des pourcentages d'excrétion variant de 0,3 à 7 % ont été obtenus (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). Dans le cas d'animaux malades, les STEC non O157 seraient plutôt impliqués. La présence chez d'autres animaux (moutons, porcs, animaux familiers : Beutin *et al.*, 1993 ; Cornick *et al.*, 2000 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2000) ou chez des oiseaux (oiseaux marins, pigeons : Wallace *et al.*, 1997 ; Makino *et al.*, 2000 ; Schmidt *et al.*, 2000) a également été signalée.

Il est actuellement difficile d'avoir une idée précise de l'importance des infections à STEC dans le monde. En raison de l'incapacité de nombreux laboratoires à rechercher les *E. coli* O157 : H7 et autres STEC, le nombre de cas déclarés sous-estime l'importance des infections dues aux *E. coli* producteurs de Shiga-toxines. Aux Etats-Unis, les infections à *E. coli* O157 pourraient conduire à 73 500 cas de maladies, 2000 hospitalisations et 60 morts par an (Mead *et al.*, 1999). De 1982 à 2000, dans ce même pays, *E. coli* O157 a été identifié comme agent responsable de 283 cas d'infections (pour chaque cas retenu, au moins deux personnes devaient être contaminées par la même source) ayant conduit à la contamination de 8466 personnes, à 1276 (15 %) hospitalisations, à 294 (3 %) SHU et à 36 (0,4 %) décès (Griffin *et al.*, 2003 ; données recueillies par le CDC, Atlanta). En France, la recherche des STEC n'est réalisée que lors d'épisodes de SHU (pas de recherche en routine dans les selles de malades) ; on ne dispose donc pas du nombre de cas d'infections à STEC hors SHU.

Depuis 1996, l'Institut de Veille Sanitaire a mis en place un système de surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez l'enfant de moins de 15 ans. En France, une centaine de cas de SHU majoritairement liés à des STEC sont recensés par an chez ces

enfants (AFSSA, 2003). Ce réseau a ainsi permis de montrer que l'incidence des SHU était supérieure en Bretagne (1,4 / 100 000 ; 63 cas de 1993 à 2000) à celle des autres régions françaises (moyenne 0,8 / 100 000) et avec la moitié de ces cas dans le seul département du Finistère (Haeghebaert *et al.*, 2001a). Ce département se caractérise par une activité agricole importante d'élevages et de cultures. Une transmission des bactéries de l'animal ou de l'environnement à l'homme serait possible (Haeghebaert *et al.*, 2001a). Des études ont abordé la recherche de ces bactéries dans l'environnement (sols épandus par les déjections animales, eaux douces ou marines sous influence de rejets agricoles ou coquillages élevés en aval d'un bassin agricole ; Conedera *et al.*, 2001 ; Fenlon *et al.*, 2000 ; Dupray *et al.*, 1999 ; Le Jeune *et al.*, 2001 ; Miyagi *et al.*, 2001). Les travaux dont on dispose sur le sujet ont montré que ces bactéries survivaient suffisamment longtemps dans l'environnement pour être éventuellement retrouvées dans le milieu marin soumis à des apports d'origine agricole. En effet, des travaux ont montré qu'*E. coli* O157 : H7 survivait jusqu'à 38 semaines dans du fumier (Randall *et al.*, 1999 ; pour revue voir Duffy, 2003).

1.5. Description des facteurs de virulence

1.5.1. Les Shiga-toxines

Les Shiga-toxines (Stx1 ou Stx2) sont les principaux facteurs de virulence des STEC. Les toxines Stx1 et Stx2 possèdent des activités biologiques proches (dont la cytotoxicité pour les cellules Véro et Hela *in vitro*) mais sont différentes sur le plan immunologique ; elles possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie, au niveau de la séquence protéique, avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien *et al.*, 1982). Il existe peu de variants de Stx1 et plus de 20 variants de Stx2 décrits dans la littérature ou la banque de données GenBank (Nakao *et al.*, 2002). La Shiga-toxine Stx2 est 1000 fois plus cytotoxique que Stx1 et est donc plus souvent retrouvée en pathologie humaine. Les gènes de structure codant pour ces toxines sont localisés au niveau du génome de bactériophages convertisseurs : les souches lysogénéisées par ces phages acquièrent la capacité de produire la toxine correspondante (O'Brien *et al.*, 1984 ; Smith *et al.*, 1983). Les gènes sont composés d'une sous-unité A (pour Activité) et d'une sous-unité B (pour Binding ou liaison) organisés en un seul opéron d'environ 1230 paires de bases codant pour les deux parties de la toxine. Les toxines sont des hétéropolymères de 70 kDa, constitués d'une sous-unité A (32 kDa) responsable de l'activité enzymatique (activité de type N-

glycosidase qui agit au niveau de l'adénine 2348 de l'ARN 28S du ribosome de la cellule eucaryote ; Endo *et al.*, 1998 ; Fig. 2) et de cinq sous-unités B (7,7 kDa) qui permettent la fixation au niveau d'un récepteur cellulaire, un glycolipide membranaire appelé globotriosylcéramide (Gb3). L'activité N-glycosylase de la Shiga-toxine bloque la sous-unité 60S du ribosome conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et à la mort des cellules eucaryotes. Les cellules riches en Gb3 sont les principales cibles de cette toxine : cellules endothéliales au niveau colique, rénal et du système nerveux central (Fig. 2). Certains variants Stx2 (par exemple, Stx2e ; Johnson *et al.*, 1990) se fixent plutôt sur les globotétrasylicéramides (Gb4) et peuvent conduire à des pathologies chez l'animal tel que l'œdème du porc. Une fois fixée sur le récepteur membranaire, la molécule toxique est internalisée. Les Shiga-toxines (et en particulier les sous-unités B) pourraient induire également la production de cytokines par les cellules épithéliales intestinales ; AFSSA, 2003). Celles-ci induiraient la production de Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'action des Shiga-toxines (AFSSA, 2003). L'induction d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales en contact avec des STEC a été aussi mise en évidence. En activant la réponse inflammatoire, cette induction permettrait le développement de lésions au niveau de la barrière intestinale, la dissémination systémique des toxines et donc favoriserait l'évolution vers un SHU. L'effet cytotoxique des Shiga-toxines peut être mis en évidence par un modèle *in vitro* sur les cellules de type Véro ou Hela.

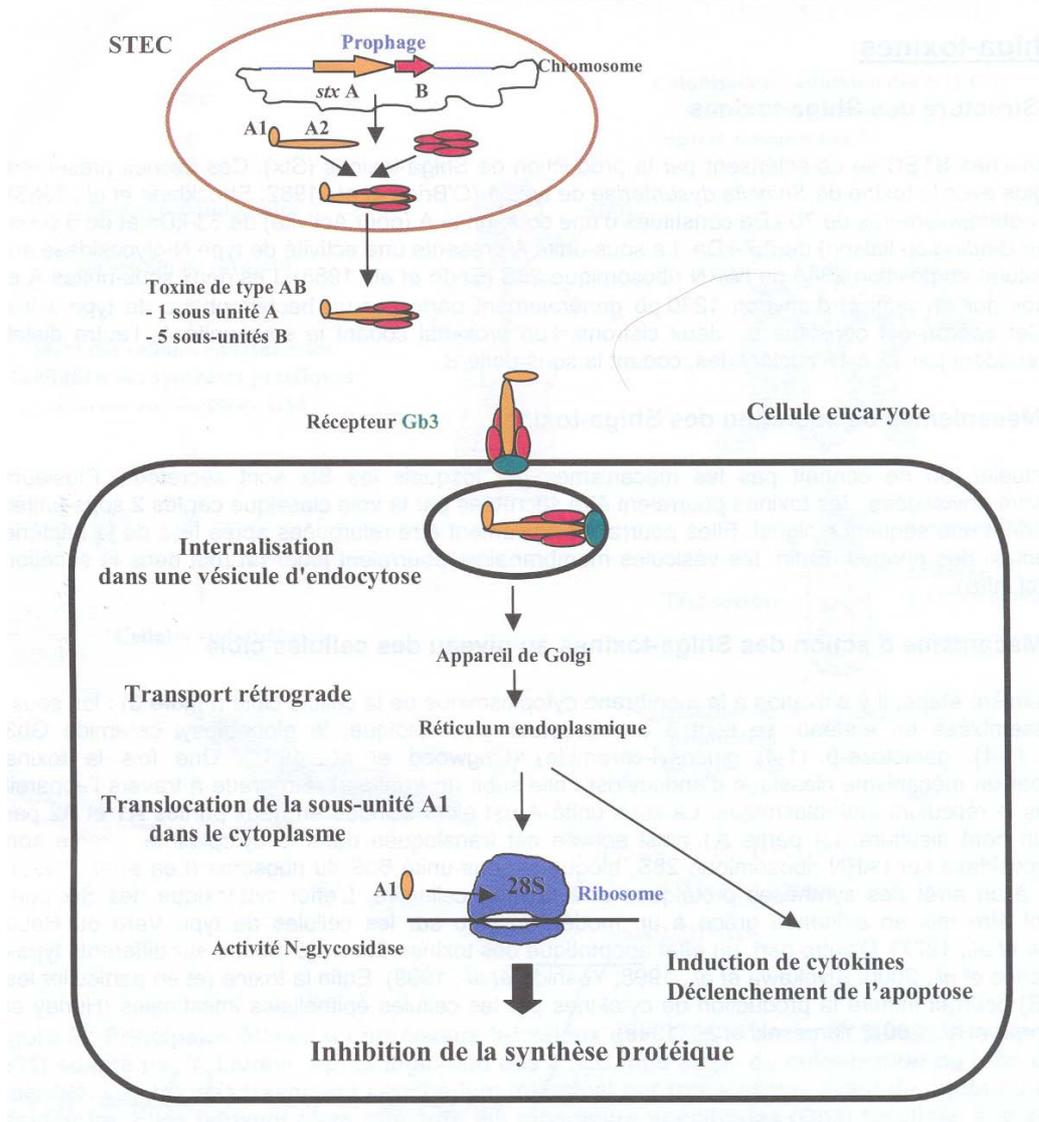


Figure 2 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (AFSSA, 2003)

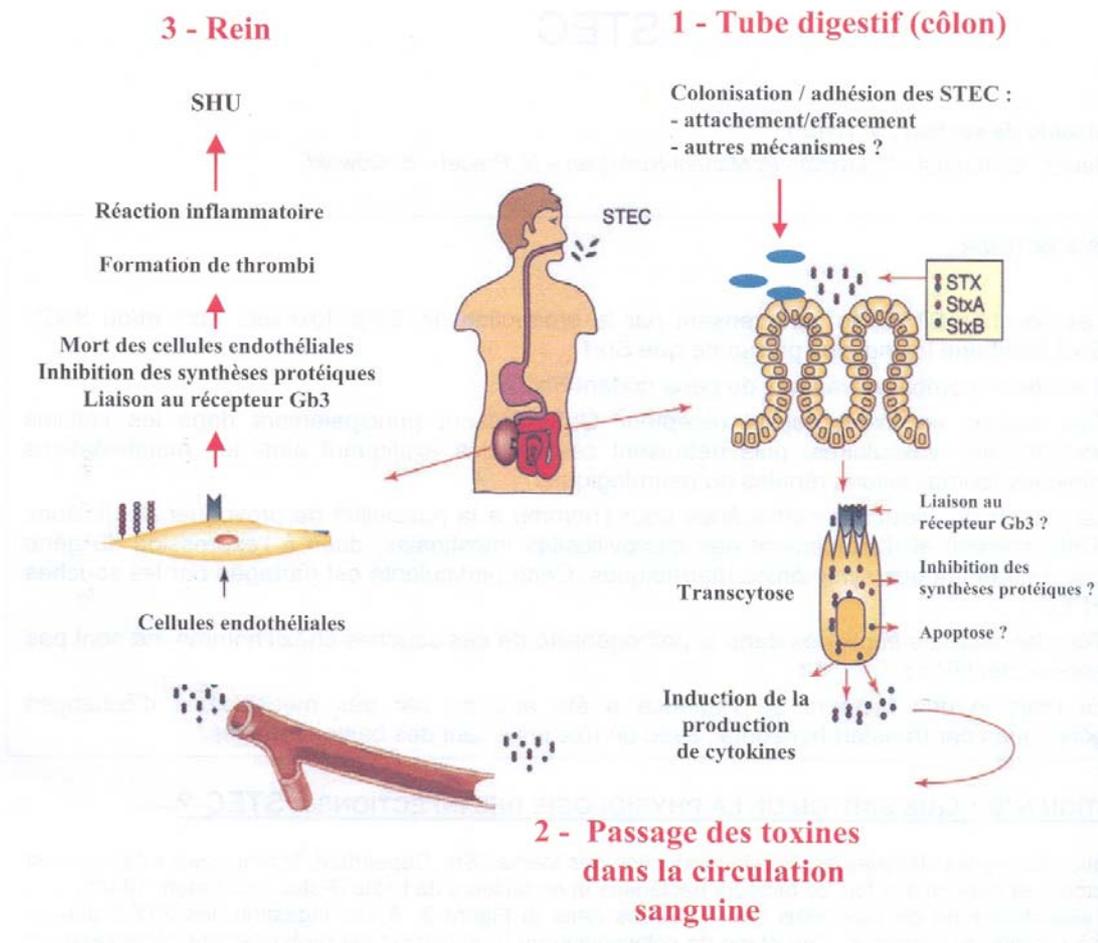


Figure 3 : Principales étapes du processus infectieux des STEC (AFSSA, 2003)

1.5.2. Les autres facteurs de virulence

Parmi les autres facteurs de virulence, on peut citer :

- les facteurs d'attachement et d'effacement aux microvillosités intestinales

Certaines souches STEC vont conduire à des lésions spécifiques des entérocytes dites d'attachement-effacement (A/E) au niveau du caecum et du colon. Elles se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal dans la zone de contact entre la bactérie et la cellule cible. Un piédestal, constitué d'actine cellulaire sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon très étroite est alors constitué (Fig. 4 ; De Vinney *et al.*, 2001).

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE (locus d'effacement de *E. coli* ; Fig. 4) codant pour un système de sécrétion de type III et trois classes de protéines sécrétées par l'intermédiaire de celui-ci :

- Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) code pour une protéine de la membrane externe de 94 kDa, l'intimine. Cette protéine est impliquée dans l'adhésion étroite aux entérocytes qui conduit à une accumulation de microfilaments d'actine, plus ou moins dépolymérisés, aux zones de contact cellules – bactéries, causant des lésions d'attachement et d'effacement dans la muqueuse intestinale. Le gène *eae* est plus fréquemment retrouvé chez les souches *E. coli* O157 : H7 que les autres *E. coli* non O157, et tout particulièrement dans les souches isolées en pathologie humaine. Cinq variants majeurs de l'intimine ont été identifiés ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$; Oswald *et al.*, 2000). De nouveaux variants ont été décrits depuis par Zhang *et al.* (2002b).
- Le gène *tir* code pour le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor), une protéine de 78 kDa injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce à un système de sécrétion de type III. Tir s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte.
- Les gènes *esp* (EPEC-secreted protein) codent pour une seringue moléculaire (*espA*, *espB*, *espD*) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Tir, map, *espF*, *espG*, *espH* ...).
- Le système de sécrétion de type III : les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de type III dont les gènes sont également portés par le LEE. Ce système est codé par les gènes *sep* (secretion of *E. coli* protein) et *esc* (*E. coli* secretion).

- les entérohémolysines

Un nouveau phénotype hémolytique dû à l'entérohémolysine E-hlyA a été mis en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin *et al.*, 1988). La protéine de structure E-hlyA est codée par le gène *ehxA* de l'opéron *ehxCABD* (Schmidt *et al.*, 1995). Ce gène présente une homologie de 61 % avec le gène *hlyA* codant l' α -hémolysine d'*E. coli*. L'activité cytolytique de la toxine E-hlyA est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane cytoplasmique et à sa capacité à former des pores engendrant une lyse osmotique des cellules. L'activité E-hlyA est moins puissante que celle de l' α -hémolysine. Son mécanisme d'action serait lié à la libération de fer engendrée par les hématies lysées qui permettrait ainsi un meilleur développement des bactéries. Le gène *ehxA* a été localisé sur les plasmides de haut poids moléculaire de 18 à 48 % de STEC, appartenant à des sérotypes différents.

- autres facteurs

Une sérine protéase Esp, appartenant à une sous-classe de la famille des IgA protéases, capable de cliver le facteur V de coagulation humain et la pepsine A est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénicité. D'autres facteurs pourraient encore intervenir tels que la catalase peroxydase périplasmique KatP.

Les gènes codant les principaux facteurs de virulence connus sont portés par les éléments mobile du génome : les gènes codant les toxines Stx (*stxA*, *stxB*) par des bactériophages, les gènes codant les fonctions d'attachement/effacement par l'îlot de pathogénicité LEE ; les gènes *espP*, *katP*, *ehxA* sont plasmidiques (Fig. 4).

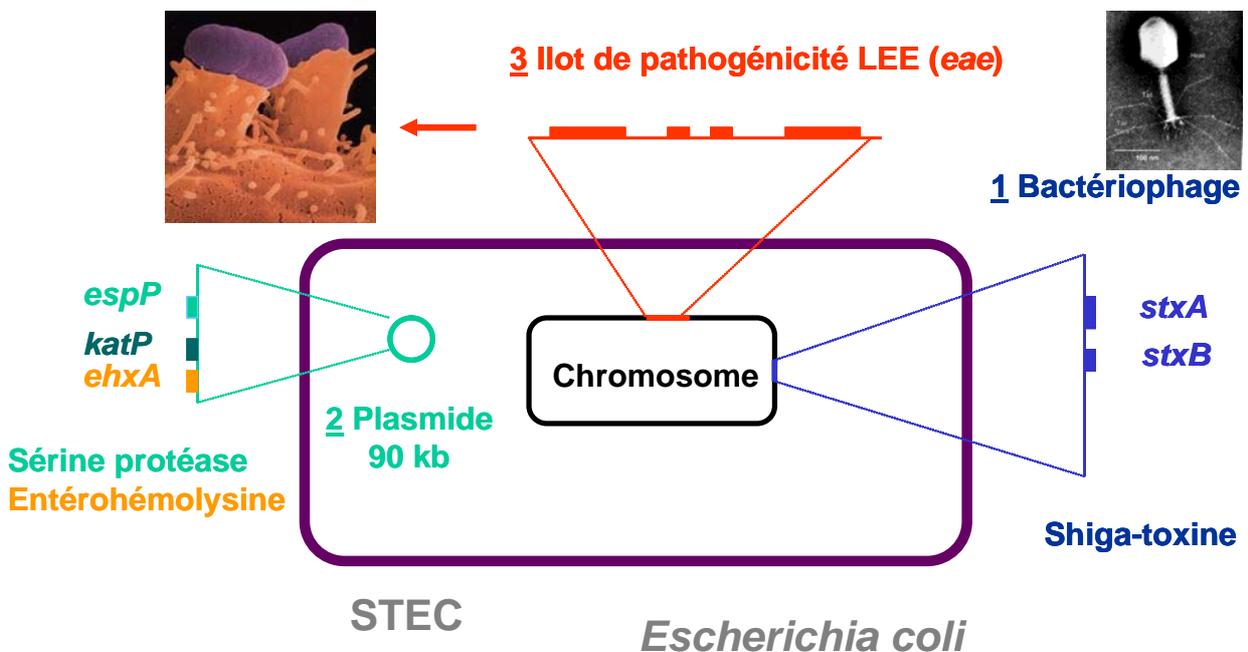


Figure 4 : Localisation des principaux facteurs de virulence dans une bactérie STEC (d'après AFSSA, 2003 ; photo *E. coli*/cellules digestives (http://www.finlaylab.biotech.ubc.ca/research_projects/E.coli.html))

2. Les objectifs de l'étude

L'objectif général de cette étude était d'évaluer la présence des bactéries STEC, entre autres *E. coli* O157 : H7, dans le milieu marin, principalement au niveau des coquillages. Le choix de rechercher les STEC et les *E. coli* O157 a été retenu pour mettre en évidence les STEC non O157 et les *E. coli* O157 non producteurs de Shiga-toxines.

Après avoir déterminé le protocole le plus adapté pour détecter ces bactéries dans des échantillons de l'environnement, les STEC et les *E. coli* O157 : H7 ont été recherchés dans des coquillages contaminés naturellement. Des coquillages ont été prélevés dans 6 zones conchylicoles françaises exploitées ou non et classées en B (voir en annexe la classification des zones conchylicoles appliquée au cours de l'étude) réparties sur les différentes façades maritimes françaises. Il est important de préciser que ces coquillages doivent être purifiés 48 heures en bassin avant d'être commercialisés. Par ailleurs, nous avons implanté des coquillages dans une zone interdite à la conchyliculture (en aval d'une station d'épuration et de zones à activités agricoles) de façon à avoir, si possible, un témoin positif (site susceptible d'être contaminé de façon importante par des bactéries d'origine fécale).

3. Matériels et méthodes

Au cours de cette étude, les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines ont été recherchés de deux façons :

- recherche des *E. coli* O157 par leurs propriétés biochimiques et immunologiques,
- recherche des gènes *stx*, codant pour les Shiga-toxines par PCR dans les bouillons d'enrichissement et isolement des souches possédant ces gènes par hybridation sur colonie.

Après une étape de mise au point du protocole, ces bactéries ont été recherchées dans des coquillages ou des eaux de l'environnement.

3.1. Mise au point du protocole : optimisation de la préparation des échantillons

Les premiers essais réalisés au laboratoire sur des eaux (eaux en sortie de station d'épuration ou effluents d'origine agricole) et sur des coquillages (huîtres) avaient montré que des composés présents dans ces échantillons naturels pouvaient interférer sur la recherche des gènes *stx* ou des *E. coli* O157 (par exemple, inhibition des réactions de PCR même pour des extraits d'ADN dilués au 1/100 ; résultats non montrés). Des essais ont été ensuite conduits sur des coquillages artificiellement contaminés afin de définir les protocoles les plus adaptés.

3.1.1. Préparation des enrichissements pour une recherche des *E. coli* O157

Lors de la recherche des *E. coli* O157 présents dans les bouillons d'enrichissement de coquillages, une première étape consiste à les concentrer à l'aide de billes paramagnétiques recouvertes d'anticorps O157 (IMS ; Immunoséparation magnétique ; Dynal).

Afin de définir le protocole limitant les interférences par les débris et autres bactéries lors de l'IMS, des essais ont été conduits avec des CLI artificiellement contaminés par une souche *E. coli* O157:H7 *stx* négative (EC 261 ; bactéries prélevées en phase stationnaire après 18 h de culture à 37°C en bouillon trypticase soja (TD) sous agitation ; la concentration finale en bactéries du bouillon étant $7,4 \cdot 10^8$ /ml). L'équivalent de 25 g de chairs et liquides intervalvaires (CLI) broyés a été dilué au 1/10 dans de l'eau peptonée tamponnée (EPT) en présence de la souche ou non. Ainsi, trois enrichissements ont été réalisés :

- un enrichissement témoin, sans apport d'*E. coli* O157,
- un enrichissement avec un apport initial de 7,4 UFC (unité formant colonie) d'*E. coli* O157 / 100 g de CLI,
- un enrichissement avec un apport initial de 745 UFC/ 100 g de CLI.

Après une incubation de 6 h à 37°C, les surnageants des bouillons d'enrichissement ont été prélevés : 1) directement, 2) après centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes ou 3) après filtration sur 8 µm et 0,22 µm. Dans ce dernier cas, les bouillons d'enrichissement ont, tout d'abord, été filtrés sur 8 µm pour éliminer les plus gros débris puis les filtrats ont été passés sur des membranes de 0,22 µm de porosité. Les bactéries retenues sur ce dernier filtre ont été remises ensuite en suspension dans un volume équivalent de tampon phosphate salé (Phosphate buffer saline ; PBS).

Les *E. coli* O157 ont été ensuite recherchés selon le protocole décrit dans le paragraphe ci-après (4.2.2).

3.1.2. Préparation des enrichissements pour une recherche des gènes *stx* par PCR

Des chairs et liquides intervalvaires de coquillages commercialisés ont été broyés puis contaminés artificiellement par une souche *E. coli stx2e* positive (EVL.02.1). Les bactéries étaient en phase stationnaire : 18 h de culture à 37°C en bouillon TD sous agitation ; concentration finale en bactéries 3,8 10⁹ UFC /ml. L'équivalent de 25 g de CLI broyés a été dilué au 1/10 dans de l'EPT en présence ou non de la souche. Trois bouillons d'enrichissement ont été ainsi obtenus :

- un enrichissement témoin, sans apport d'*E. coli* portant le gène *stx*,
- un enrichissement avec un apport initial de 3,8 10³ UFC d'*E. coli stx* positif / 100 g de CLI,
- un enrichissement avec un apport initial de 3,8 10⁶ UFC/ 100 g de CLI.

Après une incubation de 24 h à 37°C, les phases supérieures des bouillons d'enrichissement ont été prélevées, 1) soit directement, 2) soit après passage à travers le filtre d'un sac Stomacher, 3) soit après centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes ou enfin 4) soit après filtration sur membranes de 8 µm et de 0,22 µm. Les ADN ont ensuite été extraits et les gènes *stx* recherchés par PCR selon le protocole décrit ci-après.

3.2. Recherche des STEC et des *E. coli* O157 : H7 dans les coquillages et dans des eaux de l'environnement

Pour les analyses concernant les coquillages, les *E. coli* O157 : H7 ont été recherchés par IMS et isolés sur milieux spécifiques dans les lots de coquillages analysés de juillet 2002 à janvier 2004. Les STEC ont été isolés par hybridation sur colonie à partir des enrichissements positifs lors de la recherche des gènes *stx* par PCR dans l'ensemble des lots de coquillages analysés.

Pour les analyses concernant les eaux, seuls les STEC ont été recherchés par détection des gènes *stx* par PCR après enrichissement et isolement des souches par hybridation sur colonie.

3.2.1. Prélèvements des échantillons

Sept sites de prélèvement de coquillages ont été sélectionnés sur les différentes façades maritimes françaises (Fig. 5) ; chaque site ayant été analysé au minimum à sept reprises.

Les coquillages ont été prélevés soit par les laboratoires côtiers (réseau REMI, Ifremer) pour les échantillons : 1, 2, 3, 5 et 6, soit par le laboratoire de microbiologie (EMP/MIC, Ifremer) pour les échantillons 4 et 7. Les coquillages étaient issus de zones conchylicoles exploitées ou non et classées en B sauf pour le point 7, zone interdite à la conchyliculture (classe D ; coquillages implantés en sortie de station d'épuration et en aval de zones agricoles et donc susceptibles d'être contaminés de façon importante par des bactéries d'origine fécale). Les coquillages en classe B ne doivent pas être contaminés par plus de 4600 *E. coli* par 100 g de CLI dans 90 % des lots analysés et doivent être purifiés pendant 48 heures avant commercialisation (Directive 91/492/EEC ; Anon. 1991).

Soixante-douze lots de coquillages naturellement contaminés ont été collectés. Les coquillages analysés étaient des huîtres (*Crassostrea gigas*) pour les points : 3, 4, 7, des moules : *Mytilus galloprovincialis* pour le point 6 et *Mytilus edulis* pour les échantillons 1, 2, 5 et des coques (*Cerastoderma edule* L) pour le point 3. Lors de chaque prélèvement, 50 à 250 moules, 20 à 25 huîtres ou environ 150 coques ont été collectées. Les moules ont été collectées sur les côtes de la Manche (sites 1, 2 et 7), de l'Océan Atlantique (site 5) et de la Méditerranée (site 6)

Les coquillages prélevés ont été acheminés au laboratoire de microbiologie à Brest le plus rapidement possible en glacière réfrigérée ; les analyses ont été réalisées dans les 48 heures suivant le prélèvement.

Chaque lot collecté a été réparti en 3 lots de coquillages permettant : 1) la recherche des STEC ou des *E. coli* O157 dans les chairs totales, 2) la recherche des STEC et *E. coli* O157 dans les hépato-pancréas disséqués, et 3) le dénombrement total des *E. coli* dans les chairs totales.

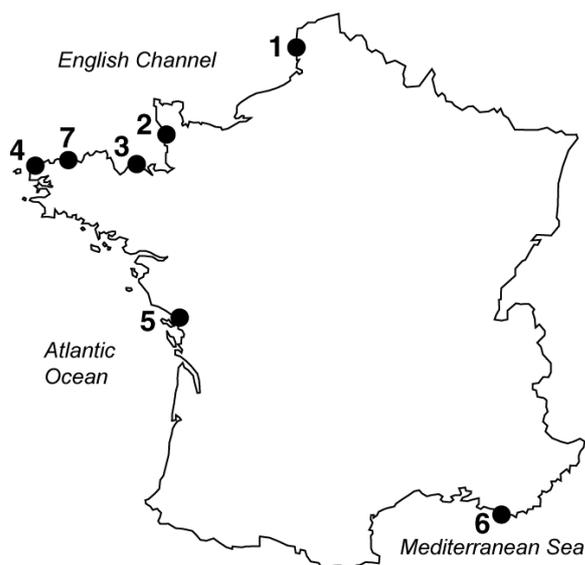


Figure 5 : Localisation des points de prélèvements de coquillages (sites 1, 2, 3, 4, 5, 6 : zones conchylicoles classées en B ; 7 : en aval d’une station d’épuration) et des eaux (site 2).

Au cours de 2 campagnes de prélèvement (le 26 novembre 2003 et le 1^{er} juin 2004 ; site 2), des eaux susceptibles d’être à l’origine de la contamination des coquillages en aval ont été également prélevées.

3.2.1.1. Obtention des bouillons d’enrichissement à partir des coquillages et des eaux

Les coquillages ont été ouverts après lavage des coquilles. Les chairs et liquides intervalvaires obtenus ont été prélevés et broyés directement pour une analyse sur les chairs totales ou disséqués pour une analyse sur les hépato-pancréas.

Les coquillages concentrant principalement les bactéries et les virus au niveau des glandes digestives, une analyse de ces organes permet de diminuer le seuil de détection et la concentration des inhibiteurs pouvant interférer lors des réactions de PCR (Hervio-Heath *et al.*, 2002 ; Le Guyader *et al.*, 2000).

Les CLI ont été broyés au Waring Blender (Waring Products Division, New Hartford, CT, Etats-Unis) 3 fois pendant 30 s après dilution au 1/2 ou au 1/3 dans de l’eau peptonée tamponnée. L’équivalent de 25 g de CLI a ensuite été dilué au 1/10 dans de l’EPT et incubé à 37 °C pendant 6 h (recherche des *E. coli* O157) ou 20 à 24 heures (recherche des STEC).

Les hépato-pancréas (Hp) obtenus par dissection des chairs de coquillages ont été broyés au Polytron (Kinematica AG, Luzern, Suisse) 3 fois 20 s et un enrichissement a été réalisé

à partir de chaque lot de coquillages (le poids des hépato-pancréas peut varier, selon la période de l'année, de 3 à 10 % du poids des chairs et liquides intervalvaires des coquillages ; résultats observés au cours de cette étude). Les broyats ont été dilués en EPT (dilution au 1/10) et incubés 6 ou 20 à 24 heures à 37 °C.

Les eaux ont été filtrées sur membrane Nucleopore (D. Dutscher S. A., Brumath, France) 0,22 µm (250 ml ou 1 l respectivement lors de la campagne de Novembre 2003 et lors de celle de Juin 2004). Les bactéries retenues sur les filtres ont été reprises en EPT. Les suspensions ont été ensuite incubées 20-24 h à 37°C.

3.2.2. Isolement des *E. coli* O157 par IMS (ISO 16654)

La recherche des *E. coli* O157 a été réalisée dans les lots de coquillages reçus au laboratoire jusqu'à fin janvier 2004 (soient 54 lots analysés sur les CLI et 54 autres sur les Hp).

Une étape d'immunoséparation magnétique avec des billes paramagnétiques recouvertes d'anticorps O157 (Dynal ; Anon., 2001) a été réalisée afin de concentrer les *E. coli* O157 à partir des bouillons d'enrichissement.

Après 6 heures d'incubation à 37 °C, un millilitre de l'enrichissement (CLI et Hp) a été mis au contact de billes recouvertes d'anticorps O157, soit directement, soit après une étape de filtration. Dans ce dernier cas, les bouillons d'enrichissement ont, tout d'abord, été filtrés sur 8 µm pour éliminer les plus gros débris puis les filtrats sur 0,22 µm. Les bactéries retenues sur ce dernier filtre ont été remises ensuite en suspension dans un volume équivalent de PBS.

Un millilitre de bouillon d'enrichissement filtré ou non a été mis en contact de billes anti-*E. coli* O157 pendant 30 minutes sous agitation douce. Les complexes bactéries-billes ont été récupérés à l'aide d'un aimant, lavés trois fois par du tampon phosphate salé, PBS-Tween 0,05 %, puis repris dans 100 µl du même tampon. Ils ont ensuite été étalés sur milieux spécifiques (CT-SMAC, *E. coli* O157 : H7 ID et pour les échantillons susceptibles d'être fortement contaminés en *E. coli*, CT- *E. coli* O157 : H7 ID, strip (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) par la technique d'isolement par épuisement. Les géloses ont été ensuite incubées de 20 à 24 h à 37°C. Les colonies caractéristiques ont été repiquées sur gélose TD. La présence ou non de l'antigène O157 a été confirmée par un test d'agglutination au latex antiO157 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Grande-Bretagne) et l'identité

des colonies, *E. coli* ou non, a été déterminée biochimiquement par galerie API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Après 6 heures d'incubation à 37 °C, un millilitre de l'enrichissement (CLI et Hp) a été mis au contact de billes recouvertes d'anticorps O157, soit directement, soit après une étape de filtration (voir précédemment 4.2.2). Après 3 lavages dans du PBS-tween 0,05 %, les bactéries concentrées sur les billes ont été isolées sur milieux spécifiques (CT-SMAC, *E. coli* O157 : H7 ID et pour les échantillons susceptibles d'être fortement contaminés en *E. coli*, CT- *E. coli* O157 : H7 ID, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Après une incubation de 20 à 24 h à 37°C, les colonies caractéristiques ont été repiquées sur gélose TBX ou TD. La présence ou non de l'antigène O157 est confirmée par un test d'agglutination au latex antiO157 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Grande-Bretagne) et l'identité des colonies, *Escherichia coli* ou non, a été déterminée biochimiquement par galerie API 20E (BioMérieux, Marcy L'étoile, France).

3.2.3. Recherche des gènes *stx* par PCR

La présence des gènes *stx* a été recherchée par PCR selon les conditions de Read *et al.*, (1992) dans les coquillages et les eaux. Une partie conservée du gène *stx* (sous-unité A) est mise en évidence en utilisant des amorces dégénérées. La majorité des gènes *stx* est ainsi mise en évidence. Ce choix se justifie par le fait que seul le gène *stx2ev*, rencontré une seule fois, dans une souche isolée avant 1977, n'est pas mis en évidence parmi les gènes *stx* testés dans l'étude de Bastian *et al.*, (1998). Un fragment de 323 pb du gène *stx* codant pour la sous-unité A des Shiga-toxines : Stx1, Stx2 et variants Stx1 ou Stx2 est ainsi mis en évidence. La PCR selon les conditions de Read *et al.* (1992) a été précédemment utilisée sur d'autres matrices ou échantillons de l'environnement (Bouvet *et al.*, 2001 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2002).

Après une incubation de 20-24 h à 37°C, les bouillons d'enrichissement ont été prélevés et analysés directement ou après filtration sur membranes de 8 µm et de 0,22 µm.

Les acides nucléiques ont été extraits après lavages des bactéries (2 par du PBS-tween 2 % et 3 par du PBS - centrifugation à 12 000 g pendant 3 minutes). Les culots bactériens ont été repris dans 400 µl de résine Instagène (BioRad, Hercule, Etats-Unis) pour les échantillons analysés directement et dans 100 µl pour les échantillons filtrés. Les bactéries ont été lysées par chauffage à 56°C pendant 30 minutes puis à 100°C pendant 15 minutes ; les ADNs ont été ensuite prélevés dans les surnageants obtenus après centrifugation de la

solution lysée (12 000 g, à 4°C pendant 10 minutes). Les extraits ont été conservés à –80°C.

Dix microlitres d'extrait d'ADNs ont été ajoutés au mélange réactionnel contenant 5 µl de tampon 10 X (fourni avec l'enzyme ; Tris-HCl 100 mmol l⁻¹, MgCl₂ 15 mmol l⁻¹ ; KCl 500 mmol l⁻¹, pH 8.3 ; Roche Diagnostics, Meylan, France), 200 µmol l⁻¹ de chaque 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, 1,6 µmol l⁻¹ de chaque amorce et 1 U de Taq Polymerase (Roche Diagnostics) pour un volume final de 50 µl. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur Peltier Thermal Cycler (PTC 200 ; MJ Research, Waltham, MA, Etats-Unis) au cours de 40 cycles. Après une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 40 cycles constitués d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, d'une étape d'hybridation à 49°C pendant 30 s et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s ont été effectués. Une élongation finale de 7 minutes à 72°C a été réalisée après le dernier cycle. Les produits de PCR (15 µl) ont ensuite été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (BET).

3.2.4. Isolement des STEC à partir des bouillons d'enrichissement PCR *stx* positif

La recherche des souches et leur caractérisation ont été réalisées à l'Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle (ENVL) à partir des bouillons d'enrichissement PCR *stx* positifs. Les colonies de bactéries *stx* positives ont été identifiées par hybridation sur membrane. Les souches ont été ensuite caractérisées.

3.2.4.1. Description des sondes

Une souche *E. coli* O157 : H7 ATCC 43895 possédant le gène *stx1* et le gène *stx2* a été utilisée pour préparer la sonde *stx*.

L'ADN de cette souche a été extrait par la méthode phénol-chloroforme et une PCR utilisant les amorces *stx* a été réalisée. Les amplifiats ont été séparés et excisés d'un gel d'agarose à 2 %, puis purifiés avec utilisation du kit Agarose Gel DNA Extraction (Roche Applied Science, Meylan, France). Le marquage à la digoxigénine a été réalisé en prenant le kit DIG-High-Prime (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur.

3.2.4.2. Hybridation sur colonie

Les échantillons enrichis ayant donné un message *stx* positif par PCR ont été traités de la manière suivante :

Cent microlitres d'une dilution 10^{-4} et 10^{-5} des échantillons enrichis ont étéensemencés sur gélose Trypticase soja ou MacConkey (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Après une incubation à 37°C, la dilution présentant le plus grand nombre de colonies isolées a été retenue pour la phase d'hybridation et la boîte d'isolement refroidie à 4°C pendant 30 minutes. La pré-hybridation a été réalisée en utilisant 10 ml d'une solution (5 X SSC, réactif de blocage, 1,5 % (p/v), N-lauroylsarcosine, 0,1% (p/v), SDS, 0,02 % (p/v)) à 60°C pendant 2 heures. L'hybridation a été conduite pendant 18 à 20 h à 60°C avec 5 ml d'une solution d'hybridation contenant 100 ng des sondes labellisées fraîchement dénaturées. Les membranes ont été lavées 2 fois pendant 5 minutes dans un tampon (2 X SSC, SDS, 0,1 % (p/v)) à la température du laboratoire puis 2 fois pendant 20 minutes dans un tampon (0,1 X SSC, SDS, 0,1% (p/v)) à 60°C. La détection immunologique a été réalisée conformément aux instructions du fabricant (DIG-High Prime, Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne).

3.2.4.3. Identification et caractérisation des souches

Toutes les souches isolées ont été confirmées comme étant des *E. coli* en utilisant les galeries API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Le sérotypage (antigène O, lipopolysaccharide et antigène H, flagelle) des souches isolées a été réalisé par l'équipe de Lothar Beutin (Robert Koch Institute, Berlin, Allemagne) selon les conditions décrites dans les publications de Beutin *et al.* (1996), de Machado *et al.* (2000) et d'Orskov et Orskov (1984). L'identification des *E. coli* O157 a été réalisée par le test d'agglutination au latex (*E. coli* O157 Test Kit Oxoid).

Les propriétés biochimiques telles que la fermentation du sorbitol en 24 h et l'activité β -glucuronidase ont été recherchées pour les souches STEC isolées. La cytotoxicité de ces souches pour les cellules Véro a été recherchée selon le protocole de Beutin *et al.* (1998) et Beutin *et al.* (1999).

La présence des gènes de virulence *stx1*, *stx2*, *stx2e*, *eae*, *ehx* et *uidA* a été recherchée chez les souches isolées selon une adaptation des techniques de Cebula *et al.* (1995), Paton et Paton (1998), Reid *et al.* (1999), Johnson *et al.* (1990). Certaines souches *stx* positives étaient négatives lors de la recherche des gènes *stx1* et *stx2* selon les conditions de Cebula *et al.* (1995). Aussi, d'autres amorces ont été utilisées pour caractériser ces souches *stx* positives (d'autres amorces *stx1* : Sharma *et al.*, 1999 ; Ibekwe *et al.*, 2002 ; Nielsen et

Andersen, 2003 ; amorces *stx1c* : Zhang *et al.*, 2002 et amorces *stx1d* : Bürk *et al.*, 2003).

Les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le tableau 1.

Tableau 1 : Description des amorces utilisées pour la recherche de l'ensemble des gènes *stx*, des gènes *stx1* et *stx2*, des variants *stx1c* et *stx1d* et des gènes *ehx*, *eae* et *uidA*. Dans le cas des amorces dégénérées, Y correspond à un T ou un C et R à A ou un G.

Amorces	Séquences (5' → 3')	Gène	Taille des amplicons (pb)	Référence
ES149	CGAAATYCYCTCTGTATYTG YC	<i>stx</i>	323	Read <i>et al.</i> , 1992
ES151	GARCR AAATAATTTATATGT			
LP30	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	<i>stx1</i>	348	Cebula <i>et al.</i> , 1995
LP31	CACCAGCAATGTAACCGCTG			
LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	<i>stx2</i>	584	Cebula <i>et al.</i> , 1995
LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC			
VS1	CATAGTGGAACCTCACTGACGCAGT	<i>stx1</i>	88	Sharma <i>et al.</i> , 1999
VS2	TTTGCCGAAAACGTAAAGCTTCA			
Stx1-F	GACTGCAAAGACGTATGTAGATTCG	<i>stx1</i>	150	Ibekwe <i>et al.</i> , 2002
Stx1-R	ATCTATCCCTCTGACATCAACTGC			
Vt1-F	GGATAATTTGTTTGCAGTTGATGTC	<i>stx1</i>	107	Nielsen and Andersen 2003
Vt1-R	CAAATCCTGTACATATAAATTATTTTCGT			
VTEa	CCTTA ACTAAAAGGAATATA	<i>stx2e</i>	230	Jonhson <i>et al.</i> , 1990
VTEb	CTGGTGGTGTATGATTAATA			
stx1c-F	TTTT CACATGTTACCTTTCCT	<i>stx1c</i>	498	Zhang <i>et al.</i> , 2002
stx1c-R	CATAGAAGGAAACTCATTAGG			
Vt1AvardF	CTTTTCAGTTAATGCGATTGCT	<i>stx1d</i>	192	Bürk <i>et al.</i> , 2003
Vt1AvardR	AACCCCATGATATCGACTGC			
VTEa	CCTTA ACTAAAAGGAATATA	<i>stx2e</i>	230	Jonhson <i>et al.</i> , 1990
VTEb	CTGGTGGTGTATGATTAATA			
hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	<i>ehx</i>	534	Paton <i>et al.</i> , 1998
hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
eae P1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	<i>eae</i>	917	Reid <i>et al.</i> , 1999
eae P2	CCAGACGATACGATCCAG			
PT-2	GCGAAA ACTGTGGAATTGGG	<i>uidA</i>	252	Cebula <i>et al.</i> , 1995
PT-3	TGATGCTCCATAACTTCCTG			

3.2.5. Séquencage des amplicons

Tout d'abord, des produits PCR obtenus avec les amorces ES149 et ES151 à partir des bouillons d'enrichissement préparés à partir de chairs totales de coquillages ont été séquencés afin de savoir si le protocole était applicable à la matrice coquillage. Des produits PCR obtenus avec les amorces VT1AvarF-VT1AvarR avec les souches isolées (IF Ec LR2, IF Ec AB8SF, IF Ec AB8Hp) ont été aussi séquencés. Enfin, les produits PCR obtenus avec les amorces VT1AF-VT1BR2var (Tableau 1) ont été séquencés dans les deux directions en utilisant différents couples d'amorces intermédiaires afin d'obtenir la séquence complète des gènes *stx* des souches STEC isolées.

Les produits PCR obtenus ont été poolés et déposés sur gel d'agarose à 2 % (agarose à faible point de fusion ; agarose low-melting, Nusieve GTG agarose, BMA, Rockland, Etats-Unis). Après 1 h 30 de migration à 110 V, les bandes correspondant aux fragments attendus ont été découpées et purifiées sur colonne (Qiaquick gel extraction, Qiagen, France) selon les instructions du fournisseur. Le séquencage des ADNs a été réalisé par un séquenceur automatisé selon une adaptation de la méthode de Sanger avec un marquage fluorescent de l'ADN (Genome Express, Grenoble, France).

Les séquences nucléotidiques des gènes (variants *stx1*) présents dans les souches IF Ec AB8SF, IF Ec AB8Hp et IF Ec LR2 ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros AY986980, AY986981 et AY986982.

3.2.6. Analyse de l'indicateur de contamination fécale *Escherichia coli*

Parallèlement aux recherches de STEC, une analyse de l'indicateur de contamination fécale *E. coli* dans les lots de coquillages a été réalisée par la technique NPP en tubes (Anon., 2000 ; point 5) ou par la méthode par impédancemétrie (Anon., 2002 ; Dupont *et al.*, 2004 ; points 1, 2, 3, 4, 6 et 7). Ces analyses ont été réalisées par les laboratoires côtiers de l'Ifremer.

L'indicateur *E. coli* a été dénombré dans les eaux selon la technique en microplaque (EN ISO 9308-3 ; Anon., 1998).

4. Résultats

4.1. Mise au point du protocole IMS/culture et PCR *stx* sur coquillages artificiellement contaminés

4.1.1. Recherche des *E. coli* O157 par IMS

Les bouillons d'enrichissement préparés avec des CLI contaminés par une souche *E. coli* O157:H7 ont été analysés, directement ou après filtration ou centrifugation, par la technique d'IMS. Les suspensions obtenues par IMS ont été ensuite étalées sur géloses spécifiques (O157 : H7 ID et CT-SMAC).

Dans les échantillons analysés directement, des colonies caractéristiques d'*E. coli* ont été retrouvées sur ces deux géloses : colonies de coloration bleu-vert sur O157:H7 ID, et colonies incolores avec un centre marron sur CT-SMAC et pour les deux concentrations en *E. coli* O157 des CLI (Tab. 2).

Les étapes de centrifugation ou de filtration ont permis de limiter les interférences par les débris de coquillages lors de l'IMS et de diminuer le nombre de colonies non recherchées (toutefois, au cours de cet essai, les CLI provenant de coquillages commercialisés étaient peu contaminés par d'autres bactéries ; Tab. 2). L'analyse après filtration des bouillons a permis de retrouver les colonies caractéristiques pour les deux concentrations en *E. coli* O157 : H7. La centrifugation des bouillons a conduit à une perte plus importante des bactéries donnant des colonies caractéristiques sur milieux spécifiques (Tab. 2).

Tableau 2 : Dénombrement des colonies caractéristiques d'*E. coli* O157 après isolement sur géloses spécifiques des suspensions obtenues par IMS à partir des bouillons d'enrichissement des CLI artificiellement contaminés par une souche *E. coli* O157.

Concentra- tions en <i>E. coli</i> O157 dans les CLI avant enrichissement (UFC/100 g de CLI)	Préparation des bouillons d'enrichissement après une incubation de 6 h à 37°C	Gélose CT-SMAC		Gélose O157 :H7 ID	
		Colonies caractéristiques (incolore à centre marron)	Autres colonies	Colonies caractéristiques (bleu-vert)	Autres colonies
0	Analyse directe	0	5	0	7
0	Filtration	0	0	0	0
0	Centrifugation	0	0	0	0
7,4	Analyse directe	14	4	3	3
7,4	Filtration	2	0	8	1
7,4	Centrifugation	0	0	2	0

745	Analyse directe	Environ 300*	0	Environ 300*	1
745	Filtration	Environ 170*	0	Environ 180*	0
745	Centrifugation	85	0	Environ 120*	0

* nombreuses colonies confluentes.

Suite à ces résultats, l'analyse par IMS/culture des échantillons naturellement contaminés a été réalisée sur les bouillons d'enrichissement directement et après filtration.

4.1.2. Recherche des STEC par PCR *stx*

La recherche des gènes *stx* par PCR à partir des échantillons de CLI dopés par une souche possédant un gène *stx* (EVL.02.1) a conduit aux résultats suivants (Fig. 5) :

- absence de détection du gène *stx* par PCR sur les bouillons d'enrichissement analysés directement ou après un simple passage à travers le filtre d'un sac stomacher (Fig. 4). Ces extraits d'ADN dopés par de l'ADN de souche *stx* positive se sont révélés également négatifs (extraits non dilués à dilués au 1/100) ; ces résultats s'expliquent par une inhibition des réactions de PCR par des composés présents dans les extraits d'ADN.

- détection du gène *stx* par PCR sur les bouillons d'enrichissement après les étapes de filtration ou de centrifugation pour tous les échantillons dopés (contamination des coquillages : $3,8 \cdot 10^3$ et $3,8 \cdot 10^6$ / 100 g de CLI) ; pour la centrifugation, une légère inhibition (signal plus faible) est toutefois observée dans le cas des échantillons non dilués (Fig. 6).

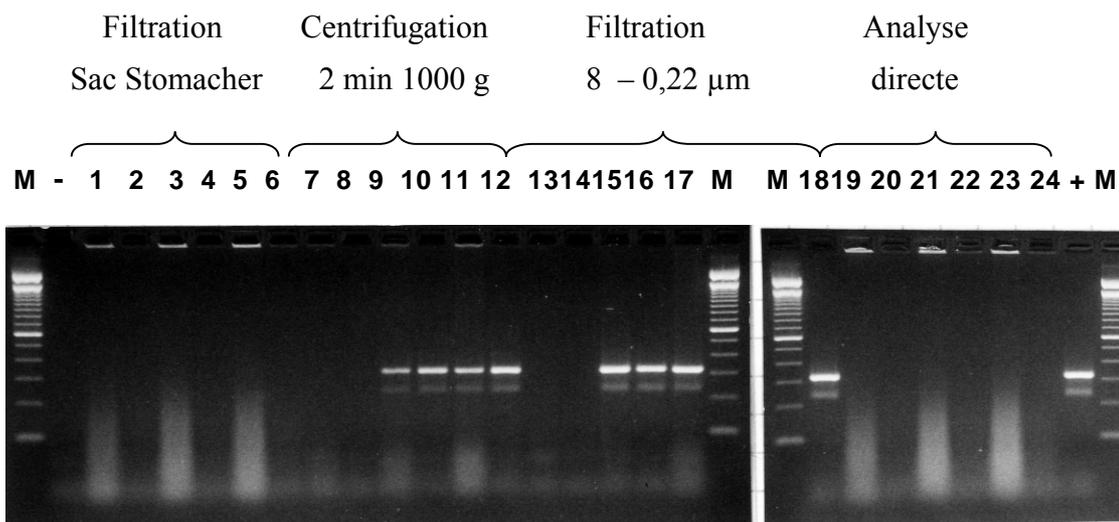


Figure 6 : Influence de la préparation des bouillons d'enrichissement sur la sensibilité de la PCR.

Pistes : M, marqueurs de poids moléculaire (100 bp DNA ladder) ; piste - : témoin négatif ; pistes 1- 6 : PCR à partir des bouillons d'enrichissement passés à travers le filtre d'un sac stomacher ; pistes 7-12 : PCR à partir des surnageants obtenus après centrifugation des bouillons à 1000 g pendant 2 minutes ; pistes 13-17 et 18 : PCR à partir des bouillons filtrés sur 8 et 0,22 µm ; pistes 19-24 : PCR à partir des bouillons analysés directement ; piste + : témoin positif.

Pistes 1-2, 7-8, 13-14, 19-20 : CLI sans apport de *E. coli* ; 3-4, 9-10, 15-16, 21-22 : CLI avec apport de 3800 UFC/100 g de CLI ; 5-6, 11-12, 17-18, 23-24 : CLI avec apport de $3,8 \cdot 10^6$ UFC/100 g de CLI. Les extraits d'ADN ont été testés non dilués (ND ; nombres impairs) et dilués au 1 / 10 (nombres pairs).

Suite à ces résultats, la recherche des gènes *stx* par PCR dans les échantillons naturellement contaminés a été réalisée sur les bouillons d'enrichissement directement et après filtration.

4.2. Analyse des coquillages

4.2.1. Recherche des *E. coli* O157 : H7

Lors de la recherche spécifique par IMS O157 et culture sur milieux spécifiques, une seule souche *E. coli* O157 a été isolée à partir des bouillons d'enrichissement des CLI et des hépato-pancréas analysés provenant des lots de coquillages collectés de juillet 2002 à janvier 2004. La souche provenait des CLI de moules, prélevées le 08 septembre 2003 au

niveau du site 7 (coquillages en aval d'une station d'épuration ; impropres à la consommation).

Des réactions croisées (colonies caractéristiques sur milieux spécifiques et tests au latex O157 positifs) ont été observées avec *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Shewanella putrefaciens* et *Enterobacter cloacae* présents dans les coquillages.

4.2.2. Recherche des STEC par PCR

4.2.2.1. Recherche des gènes *stx*

Sur les 72 lots de coquillages analysés, 31 se sont avérés contenir des gènes *stx* (Tab. 3) ; soient 40 des 144 (27,8 %) bouillons d'enrichissement obtenus à partir des CLI et des Hp. Sur les enrichissements PCR *stx* positive, 32 (24,6 %) provenaient de zones conchylicoles classées en B (sites 1, 2, 5 et 6 ; 130 enrichissements) et 8 (57 %) du site 7, interdit à la conchyliculture (coquillages implantés en sortie de station d'épuration ; 14 enrichissements).

Echantillons	Dates	Coquillages	<i>E. coli</i>	PCR <i>stx</i> ¹	Partie du coquillage <i>stx</i> +	Bouillon d'enrichissement	Souches isolées
1b	13.01.03	Moules	4030	+	CLI Hp	D, F F	non
1d	01.07.03	Moules	14000	+	CLI Hp	F D, F	non
1g	08.03.04	Moules	390	+	CLI	F	non
1h	10.05.04	Moules	900	+	CLI Hp	D, F D, F	non
2a	23.09.02	Moules	189	+	CLI Hp	F D, F	oui, 1 souche
2d	17.07.03	Moules	120	+	CLI	D, F	oui, 2 souches
2g	26.11.03	Moules	4900	+	CLI	D, F	non
2h	08.12.03	Moules	300	+	Hp	F	non
2i	20.01.04	Moules	1100	+	Hp	D, F	non
2k	10.03.04	Moules	< 100	+	Hp	F	non
2l	05.05.04	Moules	2500	+	CLI Hp	D, F D, F	non
2m sud	01.06.04	Moules	2300	+	CLI Hp	D, F D, F	non
2n nord	04.08.04	Moules	< 100	+	Hp	D, F	non
3g	13.10.03	Huîtres	820	+	CLI	D, F	non
3g'	13.10.03	Coques	4100	+	CLI	D, F	non
3h	08.12.03	Huîtres	140	+	Hp	F	non
3h'	08.12.03	Coques	1700	+	CLI	F	non
3i'	09.02.04	Coques	620	+	Hp	F	non
3j'	03.05.04	Coques	200	+	Hp	D, F	non
4h	02.10.03	Huîtres	1400	+	CLI Hp	D, F D, F	oui, 2 souches oui, 1 souche
4k	17.05.04	Huîtres	420	+	CLI	D	non
				(faible)			
5b	06.01.03	Moules	1300	+	CLI	F	oui, 1 souche
5f	08.12.03	Moules	1 300	+	Hp	F	non
5h	10.05.04	Moules	40	+	CLI	D, F	non
6a	16.02.02	Moules	321	+	CLI	F	non
7a	01.10.02	Huîtres	160000	+	CLI Hp	D, F D, F	non
7b	11.02.03	Huîtres	Nd	+	CLI Hp	D, F D, F	non
7c	12.05.03	Huîtres	4900	+	CLI	D, F	non
7d	07.07.03	Huîtres	2500	+	Hp	F	non
7e	08.09.03	Moules	3100	+	CLI	F	non
7f	03.02.04	Huîtres	330	+	Hp	D, F	non

Tableau 3 : Echantillons PCR *stx* positif : 31/72 lots de coquillages prélevés dans l'environnement

¹ selon Read *et al.* (1992). 1 : site de prélèvement de coquillages ; a : 1^{er} prélèvement, b : 2nd prélèvement ; c : 3^{ème} prélèvement ; nd : non déterminé ; D : analyse directe ; F : analyse après filtration des bouillons d'enrichissement ; + : détection du gène ; - : absence de détection.

Les résultats obtenus ont montré que la filtration des bouillons d'enrichissement avant extraction des ADNs améliorait la détection des gènes *stx* dans les coquillages. En effet, 39 (27,1 %) des 144 bouillons d'enrichissement analysés après filtration étaient positifs par PCR *stx* contre seulement 26 (18 %) des 144 bouillons analysés directement (Tab. 3). Les résultats positifs lors de l'analyse des bouillons après filtration et négatifs lors de leur analyse directe s'expliquent par le fait que des inhibiteurs de PCR étaient présents dans les extraits d'ADNs (hypothèse confirmée par les résultats négatifs obtenus pour les mêmes extraits dopés par de l'ADN de souche *E. coli stx* positive). Cette étape de filtration permet d'éviter quelques faux négatifs en limitant les interférences par des composés autres que des bactéries.

Le séquençage du fragment amplifié par cette PCR *stx* (8 produits PCR testés) a confirmé qu'il correspondait à une région du gène *stx* codant pour une Shiga-toxine. Six fragments (provenant des CLI et des Hp des lots 2a, 7a, 1b) provenaient d'une partie du gène *stx1* tandis que les deux autres (provenant des CLI des lots 6a et 5b) d'une partie du gène *stx2*.

Les résultats positifs par PCR *stx* ont été obtenus dans des bouillons d'enrichissement provenant de CLI (12 lots), des hépato-pancréas disséqués (10 lots) ou des 2 à la fois (9 lots).

4.2.2.2. Recherche de souches STEC

Des souches STEC ont été isolées par la technique d'hybridation sur colonie à partir de certains bouillons d'enrichissement PCR *stx* positifs de CLI ou d'hépatopancréas (lots de coquillages issus des sites 2, 4 et 5).

4.2.2.3. Caractérisation des souches isolées de coquillages

Les souches isolées au cours de cette étude ont été caractérisées.

Le sérotypage des souches STEC isolées a montré que les souches IF Ec PB1, IF Ec PB4 appartenaient au sérotype *E. coli* O38 : H26, les souches IF Ec AB8SF, IF Ec AB8Hp au sérotype *E. coli* O149 : H1 et la souche IF Ec LR2 au sérotype *E. coli* O100 : H21. Ce dernier sérotype a déjà été isolé dans des prélèvements d'origine porcine dans d'autres

études (comm. pers. L. Beutin). Il est intéressant de noter que les *E. coli* O38 : H26 et *E. coli* O149 : H1 sont des sérogroupes non encore connus comme souches STEC.

Les souches sont toutes mobiles, fermentent le sorbitol et possèdent une β glucuronidase (sauf la souche *E. coli* O157 :H7 pour les 2 dernières propriétés ; Tab. 4).

Tableau 4 : Caractérisation des souches isolées à partir de lots de coquillages.

Date	Site	Nom de la souche	Description des échantillons positifs					Gènes						
			Coquillages	CLI ou Hp	<i>E. coli</i> / 100 g	Sérotype	SOR	Hémo-lysine	GUD	mobilité	VCA	<i>stx</i> (type)	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>
23.09.02	2	IF Ec PB1	Moules	CLI	189	O38:H26	P	N	P	P	P	P (<i>stx1</i>)	N	N
06.01.03	5	IF Ec LR2	Moules	CLI	1 300	O100:H21	P	N	P	P	P	P (<i>stx1d</i>)	N	N
17.07.03	2	IF Ec PB4	Moules	CLI	120	O38:H26	P	N	P	P	P	P (<i>stx1</i>)	N	N
02.10.03	4	IF Ec AB8SF	Huîtres	CLI	1 400	O149:H1	P	N	P	P	P	P (<i>stx1d</i>)	N	N
02.10.03	4	IF Ec AB8Hp	Huîtres	Hp	1 400	O149:H1	P	N	P	P	P	P (<i>stx1d</i>)	N	N
08.09.03	7	IF Ec SP5	Huîtres	CLI	3 100	O157:H7	N	P (Ehly)	N	P	N	N	P	P

Hp, hépato-pancreas disséqués; CLI, chair et liquide intervalvaire; SOR : fermentation du sorbitol ; GUD : production de β -glucuronidase ; VCA : test cellulaire Cellule Véro ; N, négative; P, positive; Ehly, hémolysine mise en évidence après une étape d'incubation de 22 heures.

La recherche du type de gène *stx* (*stx1*, *stx2* ou variant) a conduit aux résultats suivants :

Les souches IF Ec PB1, IF Ec PB4 possédaient un gène *stx1* (signal positif avec les amorces *stx1* de Cebula *et al.*, 1995 en PCR classique et de Sharma *et al.*, 1999, en PCR en temps réel). Les souches IF Ec LR2-CLI, IF Ec AB8SF, IF Ec AB8Hp possédaient un variant du gène *stx1* : *stx1d* décrit que récemment par Bürk *et al.*, (2003 ; résultat PCR confirmé par séquençage). Ce gène *stx1d* n'est pas mis en évidence par les amorces *stx1* de Cebula *et al.* (1995). L'analyse des séquences nucléotidiques des souches *stx1d* positives montrent qu'elles sont identiques (100 % d'homologie) entre elles et qu'elles ont une homologie de 99 % avec les gènes *stx1d* (souche MHI 813 ; Bürk *et al.*, 2003), *stx1v52* et *stx1v51* (souches 92-1251 et 92-1252 ; Ohmura-Hoshino *et al.*, 2003). La comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques des sous-unités A et B des Shiga-toxines des

souches isolées dans cette étude et de celles décrites par Bürk *et al.* (2003) et Ohmura-Hoshino *et al.* (2003) montre que 1) la séquence nucléotidique de *stx1A* diffère d'1 pb (paire de base de *stx1dA*, d'1 pb de *stx1v52A* et de 3 pb de *stx1v51A* (positions 357 ; 477 ; 477, 546 et 693 en 5', respectivement), 2) la séquence nucléotidique de *stx1B* diffère de 2 pb de *stx1dB*, 1 pb de *stx1v52B* et de 1 pb de *stx1v51B* (positions 122 et 221 ; 122 ; 122 en 5', respectivement) et 3) que les acides aminés déduits de ces séquences sont identiques (Bürk *et al.*, 2003 ; Ohmura-Hoshino *et al.*, 2003).

Aucune souche ne possédait le variant *stx2e*.

La cytotoxicité des souches isolées à partir des lots de coquillages analysés a été testée sur des cultures cellulaires de cellules Vero. Les souches portant un gène *stx* ont montré un effet cytotoxique sur ces cellules tandis que la souche *E. coli* O157 : H7 IF Ec SP5 qui possédait les gènes *eae* et *hly* mais qui était négative pour les gènes *stx* n'a pas produit d'effet cytotoxique (Tab. 4).

Ces résultats montrent donc la présence possible de souches STEC possédant le gène *stx1* ou un variant du gène *stx1* dans des lots de coquillages issus de zones conchylicoles classées en B. Ces souches ne possèdent pas d'autres gènes de virulence (*eae*, *hly* ou *stx2*) et ont donc un pouvoir de virulence plus faible que les souches isolées en pathologie.

4.3. Comparaison de la présence des STEC et de l'indicateur de contamination fécale (*E. coli*)

4.3.1. Coquillages analysés au cours de l'étude

Les concentrations en *E. coli* ont été également déterminées dans les lots de coquillages afin d'obtenir une information sur la contamination d'origine fécale des coquillages analysés. Elles ont varié de < 18 à 160 000 / 100 g de CLI (Tab. 5). Les échantillons PCR *stx* positive correspondaient à des coquillages contaminés par < 100 à 160 000 *E. coli* / 100 g de CLI (Tab. 5) et les échantillons négatifs à des coquillages contaminés par moins de 18 à 4900 / 100 g de CLI (Tab. 5). L'ensemble des données en *E. coli* sont en Annexe 2 (Tab. 6).

Des PCR *stx* positives ont été obtenues dans 11,7 % des enrichissements provenant de lots de coquillage faiblement contaminés (<230 *E. coli* par 100 g de CLI; 7 des 60 bouillons d'enrichissement testés), dans 33,8 % des enrichissements provenant de lots moyennement contaminés (entre 230 et 4 600 *E. coli* par 100 g de CLI ; 25 des 74 bouillons

d'enrichissement testés) et dans 70 % des enrichissements provenant de lots fortement contaminés (> 4 600 *E. coli* par 100 g de CLI ; 7 des 10 testés). Aussi, la probabilité d'obtenir des résultats positifs augmente avec le nombre total d'*E. coli* dans les coquillages. Cependant, ces gènes ont été également rencontrés dans des lots faiblement contaminés (< 230 *E. coli* / 100 g de CLI ; lots 2d, 2k, 2n, 3h, 3j', 5h, Tab. 3).

Les souches isolées au cours de cette étude provenaient de lots faiblement contaminés (IF Ec PB4, IF Ec PB1) ou moyennement contaminés (IF Ec LR2, IF Ec AB8SF, IF Ec AB8Hp, IF Ec SP5; Tab. 3-4). Aussi, dans cette étude, il n'y a pas été mis en évidence une relation entre la présence de bactéries STEC viables et le nombre total d'*E. coli* cultivable dans les coquillages.

Tableau 5 : Détection des STEC, des gènes *stx* et des concentrations en *E. coli* des coquillages analysés.

Sites (classe- ment*)	Type de coquilla ges	Enrichisse- ments de CLI stx-positive/ nb total d'enrichisse- ments de CLI	Enrichisse- ments d'Hp stx-positive/ nb total d'enrichisse- ments d'Hp	Enrichisse- ments <i>stx</i> - positive/ nb total d'enrichisse- ments	<i>E. coli</i> par 100 g of CLI			
					Moyenne géométri- que	Variation	Nombre d'échan- tillons	Isolement de STEC (nb de souches)
Site 1 (B)	Moules	4/8	3/8	7/16 (43.8)	619.2	<100 – 14 000	8	N
Site 2 (B)	Moules	5/16	7/16	12/32 (37.5)	372.4	<100 – 4 900	16	P (2)
Site 3 (B)	Huîtres	1/10	1/10	2/20 (10)	324.6	<100 – 2 800	10	N
	Coques	2/4	2/4	4/8 (50)	964.2	200 – 4 100	4	N
Site 4 (B)	Huîtres	2/11	1/11	3/22 (13.6)	498.3	<100 – 1 400	11	P (2)
Site 5 (B)	Moules	2/8	1/8	3/16 (18.8)	116.1	<18 – 1 300	8	P (1)
Site 6 (B)	Moules	1/8	0/8	1/16 (6.3)	267.8	<100 – 4 900	8	N
Site 7 (D)	Huîtres	4/7	4/7	8/14 (57.1)	2 419.3	<100 – 160 000	7	P (1)

* les coquillages correspondant à la catégorie B ont été collectés dans des zones conchylicoles ou des zones naturelles exploitées ou non. Les lots de 1 à 6 sont issus de sites conchylicoles ou de zones naturelles classés en B, les lots 7 sont issus d'un site interdit à la conchyliculture (coquillages implantés en aval d'une station d'épuration).

CLI : chairs et liquides intervalvaires, Hp : hépato-pancréas ; N : négatif, P : positif.

4.4. Analyse des eaux

Les 2 campagnes de prélèvement (au printemps et en hiver) au niveau du site 2 ont conduit à la détection de gènes *stx* dans les eaux échantillonnées en amont des coquillages. Ces gènes *stx* étaient présents dans la majorité des eaux analysées (15/17 ; volume d'eau analysé \geq 250 ml), et dans des eaux de nature différente (eaux usées, canaux, eaux saumâtres).

En novembre 2003, les enrichissements réalisés à partir des eaux étaient positifs sur l'ensemble des sites exceptés la flaqué d'eau de mer (E8) et un résultat très faiblement positif sur l'eau douce E6 (Tab. 6).

En juin 2004, les gènes *stx* étaient présents dans les enrichissements des eaux E1, E2, E5, E6, E7 ; un faible signal était obtenu pour les eaux E3 et E9 (Tab. 6).

Les coquillages en aval de ces eaux étaient porteurs de gènes *stx* lors des 2 campagnes de prélèvement (Tab. 3).

Aucune souche STEC n'a été isolée à partir de ces eaux.

Tableau 6 : Concentrations de l'indicateur de contamination fécale, *E. coli*, et résultats des PCR *stx* commun selon les conditions de Read *et al.* (1992) après enrichissement des eaux prélevées sur le site 2. La température des eaux variait de 10,2 à 13,4 °C lors de la campagne du 26 novembre 2003 et de 14,1 à 16,9 °C lors de la campagne du 1^{er} juin 2004.

Eaux analysées	Date	Types d'eaux	<i>E. coli</i> / 100 ml d'eau	PCR <i>stx</i>
E1	26.11.03	Eau douce	4 669	+
E2	26.11.03	Eau saumâtre	1 450	+
E3	26.11.03	Eau douce Emissaire STEP	3 530	+
E4	26.11.03	Eau marine (sous bouchot)	676	+
E5	26.11.03	Eau brute STEP	2,11 10 ⁷	+
E6	26.11.03	Eau douce	577	+ (T faible)
E7	26.11.03	Eau douce	57 100	+
E8	26.11.03	Flaque d'eau de mer	480	-
E9	26.11.03	Eau douce	20 270	+

E1	01.06.04	Eau douce	200	+
E2	01.06.04	Eau saumâtre	1 010	+
E3	01.06.04	Eau douce Emissaire STEP	410	+ (faible)
E4	01.06.04	Eau marine (sous bouchot)	127	-
E5	01.06.04	Eau brute STEP	7,7 10 ⁶	+
E6	01.06.04	Eau douce	80	+
E7	01.06.04	Eau douce	860	+
E8		Absence de flaque		
E9	01.06.04	Eau douce	350	+ (faible)

En ce qui concerne l'indicateur de contamination fécale, des concentrations en *E. coli* très variables d'un site de prélèvement à l'autre ont été observées soit de 80 à 2,11 10⁷ / 100 ml d'eau.

Les eaux prélevées lors de la campagne de novembre 2003, faisant suite à une période de pluie importante, étaient généralement contaminées en *E. coli* de façon importante (Tab. 6). Lors de la campagne de juin 2004, les concentrations en *E. coli* étaient le plus souvent dix fois plus faibles (Tab. 6).

Des campagnes de prélèvements supplémentaires seraient utiles pour obtenir une information plus conséquente sur la présence des STEC ou des gènes codant pour les Shiga-toxines dans les eaux en amont des coquillages.

5. Discussions / Conclusion

L'un des objectifs de cette étude était tout d'abord d'établir le protocole le plus adapté pour la recherche des gènes codant pour les Shiga-toxines et les STEC dans les coquillages. Le protocole suivant a été retenu après étude sur des coquillages contaminés (au laboratoire et dans l'environnement) : les gènes *stx* et les bactéries ont été recherchés dans les chairs de coquillage et liquides intervalvaires et dans les hépatopancréas disséqués après une étape d'enrichissement. Les bouillons d'enrichissement obtenus ont été filtrés (conservation de la fraction comprise entre 0,2 et 8 μm) ou analysés directement, 1) par immunoséparation magnétique et culture sur géloses spécifiques (recherche des *E. coli* O157), 2) par extraction des acides nucléiques et recherche des gènes *stx* par PCR. A partir des bouillons d'enrichissement PCR *stx* positifs, les souches STEC ont été recherchées par hybridation sur membrane.

Bien que les analyses sur les coquillages concernent généralement les chairs totales (Guyon *et al.*, 2000 ; Dupont *et al.*, 2004), des études précédentes (Le Guyader *et al.*, 2000 ; Hervio-Heath *et al.*, 2002) ont recherché des pathogènes tels que les vibrios ou les virus entériques dans les hépato-pancréas disséqués plutôt que dans les chairs totales. En effet, les microorganismes se concentrent dans ces tissus et les hépato-pancréas contiennent moins d'inhibiteurs de réactions PCR que les chairs totales (Le Guyader *et al.*, 2000). Dans cette présente étude, les analyses dans les chairs totales et les hépato-pancréas ont conduit à des résultats similaires : les gènes *stx* ont été détectés dans 21 des 72 (29,2 %) bouillons d'enrichissement provenant des chairs totales et dans 19 des 72 (26,4 %) enrichissements à partir des hépato-pancréas. Dans seulement 9 des 72 (12,5 %) lots de coquillages, les enrichissements provenant des CLI et ceux provenant des Hp étaient à la fois positifs pour la détection des gènes *stx*. Ces résultats peuvent être attribués à l'hétérogénéité des mollusques bivalves au sein d'un même lot (présence de coquillages contaminés et non contaminés dans un même lot) plutôt qu'à une influence de la partie du coquillage analysée et à une perte des bactéries par l'analyse simplement des hépato-pancréas.

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que des coquillages collectés dans des environnements côtiers et estuariens, en France, peuvent être positifs lors de la recherche des gènes *stx*, indicateurs de la présence de STEC ou de phages codant pour les gènes de Shiga-toxines. Trente et un des 72 (43 %) lots de coquillages analysés se sont avérés contenir des gènes *stx*. Il faut toutefois rappeler que ces coquillages ne peuvent pas

être commercialisés directement (passage obligatoire en bassin de purification des coquillages en zone B avant commercialisation et consommation interdite pour les coquillages en D) et que la seule présence de gènes *stx* n'est pas suffisante pour évaluer le risque pour la santé humaine (nécessité d'isoler les souches bactériennes STEC).

Différents facteurs peuvent intervenir sur la contamination des coquillages par ces gènes *stx* :

- la nature du coquillage

Les gènes codant pour les Shiga-toxines ont été détectés dans les trois types de coquillages analysés : moules, huîtres et coques. Une comparaison de la contamination des huîtres et des coques sur une même localisation (site 3) a pu être réalisée à 4 reprises. Les coques étaient contaminées à chaque fois tandis que les huîtres n'étaient contaminées que dans la moitié des cas. Le mode de vie différent de ces coquillages pourrait expliquer cette différence de contamination. Les coques, organismes fouisseurs, seraient dans un milieu plus propice à la survie des microorganismes d'origine fécale (sédiments sableux ou vaseux) que les huîtres vivant dans l'eau de mer. Une autre explication possible est le plus grand nombre d'individus utilisés pour l'analyse sur les coques que sur les huîtres ; en effet, il est nécessaire d'analyser 35 à 50 coques pour obtenir la même quantité de chair totale (> 100 g de CLI) ou d'hépatopancréas que 7 à 10 huîtres. Les coques étaient plus souvent contaminées en *E. coli*, indicateur de contamination fécale que les huîtres ; toutefois, même pour une faible concentration en *E. coli* (200 /100 g CLI ; lot 3j' ; Tab. 3), les gènes *stx* ont été détectés dans les coques.

- le site de prélèvement

Les gènes *stx* ont été détectés dans les coquillages provenant des différents zones côtières testées soit dans les 6 sites classés en B ou apparentés (obtention d'un résultat positif au moins par site) et dans le site classé en D. La fréquence des lots de coquillages *stx* positifs varie selon les sites, les activités en amont et les conditions météorologiques. Par exemple, les pluies abondantes en augmentant le lessivage des sols et les ruissellements favorisent la contamination des coquillages en aval (cette étude ; Lee et Morgan, 2003). Les différents sites étaient généralement sous l'influence à la fois d'apports urbains et d'apports agricoles. Le site 3 correspondait à une zone de production en aval d'un bassin versant à fortes activités agricoles. Six lots sur les 14 lots de coquillages (2/8 huîtres et 4/4 coques) étaient positifs lors de la recherche des gènes *stx*. Des résultats similaires avaient été obtenus lors d'une précédente étude recherchant différentes bactéries à l'origine de

zoonoses, dont les STEC, dans des lots de coquillages collectés sur ce même site. Dix-neuf pour cent des échantillons de coquillages analysés étaient positifs lors de la recherche des gènes *stx* (7/36 ; à raison de 6 lots de coquillages prélevés lors de 6 campagnes de prélèvement faisant suite de préférence à des épisodes pluvieux ; étude sur 2 ans). Le fait que le site 6, en Méditerranée, soit principalement sous l'influence d'apports d'origine urbaine pourrait peut-être expliquer, pour une part, la détection des gènes codant pour les Shiga-toxines seulement dans un lot de coquillage sur les 8 analysés. Le réservoir principal des STEC étant les ruminants, et tout particulièrement les bovins (Hancock *et al.*, 2001 ; Le Jeune *et al.*, 2001), les apports d'origine agricole seraient plus susceptibles d'être contaminés par des STEC que les apports urbains. Sur le site 2 (Normandie) où les gènes *stx* ont été souvent détectés dans les coquillages (9/16 lots), deux campagnes de prélèvements d'eaux en amont et susceptibles d'être à l'origine d'une contamination des coquillages ont été réalisées : elles ont permis de montrer que dans la majorité des eaux analysées (eaux plus ou moins saumâtres provenant des havres, eaux usées : eaux brutes et eaux au niveau de l'émissaire, canaux), les gènes *stx* étaient détectés (après filtration des eaux et enrichissement). Ces résultats montrent donc la diversité des sources d'apport possible des gènes codant les Shiga-toxines aux coquillages sur le littoral. La présence de ces gènes *stx* ou de souches STEC dans des eaux provenant de station d'épuration (Blanch *et al.*, 2003 ; Grant *et al.*, 1996 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2004) ou d'origine agricole (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002) a été également décrite précédemment.

- la période d'année

Si on considère l'ensemble des données acquises au cours de l'étude, on peut noter que les gènes codant pour les Shiga-toxines ont été détectés toute l'année aussi bien en été, saison plus propice à l'excrétion des STEC par les animaux, que pendant les autres saisons où des pluies importantes peuvent, dans ce cas, favoriser un lessivage des sols et donc un apport à la côte.

- les concentrations en indicateur de contamination fécale *E. coli*

Il semble difficile de mettre en évidence une relation entre la contamination en gènes *stx* et la présence de l'indicateur *E. coli* au niveau des coquillages analysés (correspondant à des coquillages classés en B ou apparentés ; soit susceptibles d'être contaminés par des concentrations en *E. coli* comprises entre 230 et 4600 *E. coli* / 100 g CLI). Si pour les coquillages les plus fortement contaminés en *E. coli*, les gènes codant les Shiga-toxines sont le plus souvent présents, des lots de coquillages ayant des concentrations en *E. coli*

inférieures à 230 /100 g de CLI ont été retrouvés positifs pour les gènes *stx* : lots 2d, 2k, 3h, 3j', 5h (Tab. 3). Les lots avec des concentrations intermédiaires entre 230 et 4600 étaient contaminés dans 13 cas et non contaminés dans les 8 autres cas. La présence des gènes *stx* dans des coquillages peu contaminés en *E. coli* pourrait s'expliquer par le fait que ces coquillages sont sous une possible influence d'apports de contamination fécale (classement en B), que les gènes *stx* mis en évidence proviennent d'une faible quantité de bactéries STEC (recherche après enrichissement permettant de mettre en évidence de faibles quantités de bactéries cultivables), que les gènes *stx* proviennent de bactéries non cultivables (viables non cultivables ou mortes ; non considérées dans l'analyse *E. coli*) ou de phages porteurs de ces gènes (ces derniers ont été montrés comme ayant une meilleure survie en eaux douces que les bactéries ; non encore démontrée en milieu littoral).

La recherche de souches bactériennes productrices de Shiga-toxines à partir des enrichissements de coquillage PCR *stx* positifs a permis l'isolement de cinq souches à partir des lots de moules et d'huîtres collectés dans des zones conchylicoles classées en B ou apparentées (sites 2, 4 et 5). Sur les 40 bouillons d'enrichissement *stx*-positifs (sur les 144 analysés), seuls 5 bouillons ont permis d'isoler des souches STEC. Ce faible isolement de souches par rapport au nombre de lots de coquillages analysés *stx*-positifs pourrait s'expliquer par la présence de bactéries non cultivables (viables non cultivables ou mortes) ou de phages dans les échantillons. De plus, lors de l'application de la technique d'hybridation sur colonies à des coquillages collectés dans l'environnement, nous avons rencontré quelques difficultés : bactéries stressées par leur passage dans l'environnement difficilement cultivables, présence de nombreuses bactéries de l'environnement envahissant certaines géloses non spécifiques, présence de colonies de toute petite taille non retenues lors de la réalisation de l'empreinte ou complètement collées à la membrane.

Les souches isolées dans les coquillages analysés de juillet 2002 à juin 2004 ont été caractérisées génétiquement : les cinq souches STEC isolées possédaient un gène *stx1* ou un variant de ce gène. Le variant *stx1d* qui n'a été que récemment décrit par Bürk *et al.* (2003) a été mis en évidence dans 3 des souches. C'était la première fois qu'une souche STEC *stx1d* positive était isolée de coquillage. Les autres facteurs de virulence comme la Shiga-toxine Stx2, les facteurs d'attachement et d'effacement ou l'entérohémolysine n'ont pas été retrouvés dans ces bactéries. L'évaluation de la virulence de ces souches isolées dans l'environnement va donc dans le sens d'un faible pouvoir pathogène : 1) seule présence du gène *stx1* ou du variant *stx1d* (dont les Shiga-toxines ont une cytotoxicité beaucoup plus faible que celles codées par les gènes *stx2*), 2) absence du facteur

d'attachement et d'effacement, codé par le gène *eae*, important dans la pathogénicité des souches, et 3) cytotoxicité faible ou modérée obtenue lors du test sur cellules Vero.

Une seule souche *E. coli* O157 : H7, proche d'une souche entérohémorragique EHEC O157 de part ses marqueurs de virulence et ses caractères phénotypiques, a été retrouvée dans un des lots de coquillages analysés (issus du site non classé, en aval d'une station d'épuration). Cette souche est toutefois dépourvue des gènes codant pour les Shiga-toxines et donc d'activité cytotoxique. Il est probable que cette souche *E. coli* O157 ait perdu le (ou les) gène(s) *stx* qu'elle possédait, lors de son trajet de la source d'excrétion au coquillage ; les gènes *stx* sont, en effet, portés par des bactériophages qui sont des éléments génétiques très mobiles, à l'origine de la régulation et du transfert horizontal de ces gènes (Herold *et al.*, 2004). Une perte fréquente des gènes *stx* chez des souches EHEC O157 a été reportée par Karch *et al.* (1992). Des souches *E. coli* O157 *stx*-négative ont été isolées également dans des fromages au lait cru en Italie (Conedera *et al.*, 2004), dans des selles de genisse (Vernozy-Rozand *et al.*, 2000) ou dans des selles humaines (Schmidt *et al.*, 2001). La virulence de ces souches *E. coli* O157 :H7, non productrices de Shiga-toxines, pourrait être similaire à celle des *E. coli* O55 :H7, *E. coli* entéro-pathogènes, ayant conduit à des diarrhées non sanglantes chez des enfants en Amérique du Nord (Bokete *et al.*, 1997 ; Schmidt *et al.*, 1999).

Peu d'études ont porté sur la détection de STEC ou de souches *E. coli* O157 dans l'environnement littoral (eaux marines ou coquillages). La plupart des travaux concernaient des coquillages mis sur le marché. Des approches différentes ont été retenues par les auteurs d'une étude à l'autre. Rampersad *et al.* (1999) et Kumar *et al.* (2001-2004) ont isolé des souches *E. coli*, puis les ont caractérisées (présence de l'antigène O157, détermination du sérotype et recherche des gènes de virulence). Guyon *et al.* (2000) et Mac Rae *et al.* (2003) ont limité leurs études aux souches STEC O157 en les recherchant par la méthode d'immunoséparation magnétique. Samadpour *et al.* (1994) ont recherché les souches STEC par hybridation sur colonies à partir d'enrichissements de différents aliments. Dupray *et al.* (1999) ont détecté les gènes *stx* dans des enrichissements de coquillages mais n'ont pas recherché les souches STEC dans les échantillons *stx*-positifs. Le faible taux d'isolement de souche *E. coli* O157 et STEC dans notre étude est en accord avec l'absence ou la faible présence de souches STEC ou *E. coli* O157 reportée dans d'autres études sur les coquillages (Kumar *et al.*, 2001-2004 ; Guyon *et al.*, 2000 ; MacRae *et al.*, 2003). Par exemple, aucune souche *E. coli* O157 n'a été isolée dans 192 lots de coquillages (huîtres, moules, palourdes, coques et coquilles Saint-Jacques ; étude sur 12

mois) de diverses provenances anglaises (MacRae *et al.*, 2003) et une seule souche (*E. coli* O157 : H- possédant les gènes *stx1*, *stx2c*, *eae*, *EHEC-hlyA*) a été isolée dans 150 lots d'huîtres commercialisées en France (Guyon *et al.*, 2000). Deux souches STEC non *E. coli* O157 ont été retrouvées dans des coquillages (48 lots de clams analysés ; Inde ; Sanath Kumar *et al.*, 2001). La faible fréquence de souches STEC ou *E. coli* O157 isolées de coquillages peut être expliquée par : 1) le faible nombre de ces bactéries dans l'environnement côtier, 2) la difficulté d'isoler des souches de coquillages avec une importante flore interférente.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont plutôt en faveur de souches STEC non O157. Le sérotypage de ces souches STEC isolées a conduit à des résultats intéressants : si le sérotype O100 : H21 était déjà connu comme sérotype STEC d'origine porcine (Comm. Pers. L. Beutin), les sérotypes O38 : H26 et O149 : H1 n'avaient, pour l'instant, jamais été décrits comme souches STEC.

Des souches possédant le même sérotype O38 : H26 et le même type de Shiga-toxine (celle codée par le gène *stx1*) ont été isolées à partir de coquillages provenant de la même localisation (site 2) en septembre 2002 (à partir des Hp) et en juillet 2003 (à partir des CLI). La contamination des coquillages par des bactéries d'origine fécale telles que les STEC étant due aux activités en amont (humaines et/ou agricoles) et/ou aux apports par les rivières arrivant sur le site, l'isolement de souches de mêmes sérotype et génotype à ces 2 dates pourrait être due à la persistance d'une souche STEC dans l'environnement en amont du site d'élevage des coquillages ou à l'excrétion de cette souche pendant cette période (environ 10 mois). Une évaluation des sources potentielles d'apport de STEC sur ce site pourrait donner de plus amples informations sur l'origine de ces souches.

Bien que les bactériophages, porteurs de l'information génétique pour la production des Shiga-toxines, capables d'infecter des souches *E. coli*, n'aient pas été recherchés dans ces lots de coquillages, il est très probable qu'ils soient également présents. En effet, la présence de tels bactériophages a été démontré dans l'environnement, soit dans des eaux usées de stations d'épuration (Muniesa et Jofre, 2000 ; Tanji *et al.*, 2003) soit dans des eaux de rivière (Muniesa *et al.*, 1999). Par exemple, Muniesa et Joffre (1998) ont évalué la prévalence de bactériophages portant le gène *stx2* dans des effluents d'origine urbaine ; des concentrations en phages infectieux pour *E. coli* O157 : H7 et porteurs de gène *stx2* comprises entre 1 et 10 par millilitre d'effluent ont été trouvées au cours de leur étude. Ces phages ont été recherchés également dans des effluents urbains provenant de différents

pays et étaient présents dans 9 des 10 effluents prélevés en France (Muniesa et Joffre, 2000). Leur présence n'a, pour l'instant, pas été recherchée dans l'environnement littoral. Ces bactériophages survivent plus longtemps dans l'environnement (eaux douces) que leurs bactéries hôtes ; des études *in situ* (analyse de la survie de bactéries et de phages présents dans des boudins à dialyse immergés en rivière pendant 7 jours) ont ainsi montré une perte de 2 à 3 unités logarithmiques pour les bactéries contre seulement une perte de 1 à 2 unités logarithmiques pour les phages à l'état libre. Bien que la conversion de souches *E. coli* par ces phages dans l'environnement n'ait pas été observée à l'heure actuelle, elle pourrait exister et constitue une question importante qu'il reste à élucider (Schmidt, 2001). L'isolement de nouveaux sérotypes STEC, et celui d'une souche *E. coli* O157, sans gène *stx*, dans ces lots de coquillages prélevés dans l'environnement seraient des éléments en faveur d'un possible transfert de gènes *stx* via les bactériophages d'une souche STEC à une autre souche *E. coli* ; toutefois, il n'est pas possible actuellement de savoir si ces transferts ont pu avoir lieu dans l'environnement littoral, dans les sources d'apports à la côte ou encore plus en amont chez l'homme ou l'animal.

Enfin, cette étude montre que dans le cas de prélèvements issus du milieu marin, il semble préférable de rechercher les STEC par la présence des gènes *stx* (par technique de PCR) plutôt que la présence de leur chef de file *E. coli* O157 : H7 (par la technique IMS) : *E. coli* O157 étant, d'après ces résultats, moins susceptible d'être rencontré en milieu marin que les autres souches STEC. Si toutefois un *E. coli* O157 possédant les gènes *stx* était présent dans l'environnement, la recherche des gènes *stx* par PCR, puis de la colonie par hybridation, serait susceptible de le mettre en évidence.

Les résultats, intéressants et originaux, acquis au cours de cette étude, soulèvent quelques questions auxquelles il serait intéressant de répondre dans une étude ultérieure :

- La survie des STEC dans les eaux douces, sources potentielles d'apport à la côte, et dans les eaux marines,
- La présence des phages porteurs des gènes codant pour les Shiga-toxines, hors de leurs cellules hôtes, dans les eaux et les coquillages,
- L'origine de la contamination en STEC et en phages au niveau des sites particulièrement exposés : au cours de cette étude, 2 sites parmi les 6 zones conchylicoles en B ou apparentées étudiées apparaissent particulièrement intéressants à

retenir (en raison de la détection des gènes *stx* et de l'isolement de souches STEC sur un ou plusieurs des lots analysés).

- La détermination de l'origine humaine ou animale de la contamination des coquillages et des sources d'apports en recherchant en parallèle, par exemple, des marqueurs hôte-spécifiques de *Bacteroides* (gènes codant pour l'ARN16S ; Bernhard et Field, 2000) pourrait apporter des informations très utiles sur les sources de contamination.

6. Permis d'imprimer

Nom et Prénom : Gourmelon Michèle

Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans l'environnement marin (coquillages)

Rennes, le

Le Président de thèse

Le Directeur de thèse

Vu et permis d'imprimer

Le Président
de l'Université de Rennes I

B. FORTIN

7. Références bibliographiques

- Ackman D., Marks S., Mack P., Caldwell M., Root T., Birkhead G., 1997. Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: Evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiology and Infection*, 119, 1-8.
- AFSSA, 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Coord. C. Vernozzy-Rozand, S. Roze. 220 p.
- Anon., 1991. Council Directive of 15 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs (91/492/EEC). *Official Journal of the European Communities*, no. L268 24.9.91, 1-14.
- Anon., 1998. ISO 9308-3 Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water - Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium. ISO, 20 p.
- Anon., 2000. NF V 08-600 Microbiologie des aliments – Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants – Technique du nombre le plus probable (microbiology of foods and foodstuffs products – Enumeration of presumptive *Escherichia coli* in living shellfish – MPN Technique). AFNOR, 16 p.
- Anon., 2001. ISO 16654 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO, 13 p.
- Anon., 2002. NF V 08-106 Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants – Technique indirecte par impédancemétrie directe (Enumeration of presumptive *Escherichia coli* in living shellfish – indirect technique using direct impedance measurement). AFNOR, 16 p.
- Bastian SN., Carle I., Grimont F., 1998. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 149, 457-472.
- Bernhard A.E., Field K.G., 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4571-4574.
- Bettelheim K. A., 2000. Role of non-O157 VTEC. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 38S-50S.
- Beutin L., Zimmermann S., Gleier K., 1996. Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)- producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 2812-2814.
- Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S., Scheutz F., 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 631-635.
- Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Gleier K., 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1099-1108.

- Beutin L., Strauch E., Fischer I., 1999. Isolation of *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. *The Lancet*, 353, 1498.
- Beutin L., Zimmermann S., Gleier K., 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany, *Emerging Infectious Diseases*, 4, 635-639.
- Blanch A. R., Garcia-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J., 2003. Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx2* gene from urban sewage. *Water science and Technology*, 47, 109-116.
- Bokete T.N., Whittam T.S., Wilson R.A., Clausen C.R., O'Callahan C.M., Moseley S.L., Frotsche T.R., Tarr P.I., 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. *J. Infect. Dis.*, 175, 1382-1389.
- Boudailliez B., Berquin P., Mariani-Kurkdjian P., Ilef D. D., Cuvelier B., Capek I., Tribout B., Bingen E., Piusan C., 1997. Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* 0111 - Associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*, 11, 36-39.
- Bouvet J., Bavai C., Rossel R., Le Roux A., Montet M. P., Ray Gueniot S., Mazuy C., Arquilliere C., Vernozy Rozand C., 2001. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 249-255.
- Bürk C., Dietrich R., Açar G., Moravek M., Bülte M., Märtlbauer E., 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2106-2112.
- Butt A.A., Aldridge K.E., Sanders C.V., 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infect Diseases*, 4, 201-212.
- Cebula T. A., Payne W. L., Feng P., 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 248-250.
- Chalmers R. M., Aird H., Bolton F. J., 2000. Waterborne *Escherichia coli* O157. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 124S-132S.
- Cody S. H., Glynn M. K., Farrar J. A., Cairns K. L., Griffin P. M., Kobayashi J., Fyfe M., Hoffman R., King A. S., Lewis J. H., Swaminathan B., Bryant R. G., Vugia D. J., 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Annals of Internal Medicine*, 130, 202-209.
- Conedera G., Dalvit P., Martini M., Galiero G., Gramaglia M., Goffredo E., Loffredo G., Morabito S., Ottaviani D., Paterlini F., 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 67-73.
- Conedera G., Chapman P. A., Marangon S., Tisato E., Dalvit P., Zuin A., 2001. A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 85-93.
- Cornick N. A., Booher S. L., Casey T. A., Moon H. W., 2000. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4926-4934.
- Cox P., Griffith M., Angles M., Deere D., Ferguson C., 2005. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5929-5934.

- Crowther J., Kay D., Wyer M.D., 2001. Relationships between microbial water quality and environmental conditions in coastal recreational waters: the Flyde coast, UK. *Water Research*, 35, 4029-4038.
- Crowther J., Kay D., Wyer M.D., 2002. Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: relationships with land use and topographic data. *Water Research*, 36, 1725-1734.
- DeVinney R., Puente J.L., Gauthier A., Goosney D., Finlay B.B., 2001. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Molecular Microbiology*, 41,1445-58.
- Duffy, G., 2003. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 94S-103S.
- Dupont J., Dumont F., Menanteau C., Pommepuy M., 2004. Calibration of the impedance method for rapid quantitative estimation of *Escherichia coli* in live marine bivalve molluscs. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 894-902.
- Dupray E., Caprais M.P., Derrien A., Monfort P., Covenant A., Penot J., Fach P., Dilasser F., Pérelle S., Grout J., Federighi M., Jugiau F., Rama F., 1999. Flux bactériens et qualité sanitaire des coquillages en baie de la Fresnaye. Dans : *Pollutions diffuses : du bassin versant au littoral*, Editions Ifremer, 169-178.
- Endo Y., Tsurugi K., Yutsudo T., Takeda Y., Ogasawara T., Igarashi K., 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *European Journal of Biochemistry*, 171, 45-50.
- Enriquez C., Nwachuku N., Gerba C. P., 2001. Direct exposure to animal enteric pathogens. Review on environmental health, 16, 117-131.
- Espié E., Grimont F., Vernozy-Rozand C., Vaillant V., De Valk H., 2003. An outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with mutton consumption. France, June 2002. Symposium VTEC, juin 2003, Edinbourg. Poster P-211.
- Feldhusen F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2, 1651-1660.
- Feng P., Lampel K. A., Karch H., Whittam T. S., 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Infectious Diseases*, 177, 1750-1753.
- Fenlon D. R., Ogden I. D., Vinten A., Svoboda I., 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 149S-156S.
- Fogarty L.R., Haack S.K., Wolcott M.J., Whitman R.L., 2003. Abundance and characteristics of the recreational water quality indicator bacteria *Escherichia coli* and enterococci in gull faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 865-878.
- Fortin N. Y., Mulchandani A., Chen W., 2001. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Analytical Biochemistry*, 289, 281-288.
- Grant S., Pendroy C., Mayer C., Bellin J., Palmer C., 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3466-3469.

- Griffin P. M., Tauxe R. V., 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews* 13, 60-98.
- Griffin P.M., Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Swerdlow D.L., 2003. Epidemiology of 283 outbreaks of *Escherichia coli* O157 : H7 infections in the 20th century, United states. Symposium VTEC, Edinbough, June 2003, Communication orale CO-2.
- Grimont F., 1998. Recherche de *Escherichia coli* pathogènes dans les selles. *Spectra biologie*, 17, 27-36
- Guyon R., Dorey F., Collobert J. F., Foret J., Goubert C., Mariau V., Malas J. P., 2000. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). *Sciences Des Aliments*, 20, 457-465.
- Haeghebaert S., De Parscau L., Le Fur J. M., Bouvet P., Guenoden R., Bastian S., Vaillant V., De Valk H., 2001a. Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique pédiatriques, département du Finistère, 1993-2000. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 37, 181-184.
- Haeghebaert S., Vaillant V., Bouvet P., Grimont F. et le réseau des néphrologues pédiatres, 2001b. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 1999. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 37, 177-180.
- Haeghebaert S., Le Querrec F., Gallay A., Bouvet P., Gomez M., Vaillant V., 2002a. Les toxi-infections alimentaires collectives, en France en 1999 et 2000. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 23, 105-109.
- Haeghebaert S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallay A., Espié E., Vaillant V., 2002b. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 23, 105-109.
- Hancock D., Besser T., Lejeune J., Davis M., Rice D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 71-78.
- Herold S., Karch H., Schmidt H., 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion. *International Journal of Food Microbiology*, 294, 115-121.
- Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M., Pommepuy M., 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Bacteriology*, 92, 1123-1135.
- Hiramatsu R., Matsumoto M., Miwa Y., Suzuki Y., Saito M., Miyazaki Y., 2002. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 922-925.
- Ibekwe A.M., Watt P.M., Grieve C.M., Sharma V.K., Lyons S.R., 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4853-4862.
- JO, 1988. TIAC : déclaration, investigation, conduite à tenir. *Journal officiel de la République française* n°1487. Juin 1988.
- Johnson, W.M., Pollard, D.R., Lior, H., Tyler, S.D. and Rozee, K.R. (1990) Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 28, 2351-2353.

- Jones K., Obiri-Danso K., 1999. Non-compliance of beaches with the EU directives of bathing water quality: evidence of non-point sources of pollution in Morecambe Bay. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85, 101S-107S.
- Karch H., Meyer T., Rüssmann H. and Heesemann J., 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infection and Immunity*, 60, 3464-3467.
- Kumar H. S., Karunasagar I., Karunasagar I., Teizou T., Shima K., Yamasaki S., 2004. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. *FEMS Microbiologic Letters*, 233, 173-178.
- Kumar H. S., Otta S., Karunasagar I., 2001. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 334-338
- Le Guyader F., Haugarreau L., Miossec L., Dubois E., Pommepey M., 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 3241-3248.
- Lee R. L., Younger A.D., 2002. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 50, 177-183.
- Lee R.J., Morgan O.C., 2003. Environmental factors influencing the microbiological contamination of commercially harvested shellfish. *Water Science Technology*, 47, 65-70.
- LeJeune J. T., Besser T. E., Hancock D. D., 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3053-3057.
- Li X., Guyot K., Dei-Cas E., Mallard J.P., Ballet J.J., Brasseur P., 2006. *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *International Journal of Food Microbiology*, 108, 321-325.
- Lipp E. K., Rose J. B., 1997. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 16, 620-640.
- Machado J., Grimont F., Grimont P.A.D., 2000. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Research in Microbiology*, 151, 535-546.
- MacRae M., Strachan N.J.C, Jacklin M., Ogden I.D., 2003. Methods to isolate and incidence of *Escherichia coli* O157 in UK Shellfish. *Présentation affichée, 5th International Symposium on Shiga toxin - producing E. coli infections, congrès VTEC, Edinburgh.*
- Makino S., Kobori H., Asakura H., Watarai M., Shirahata T., Ikeda T., Takeshi K., Tsukamoto T., 2000. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiology and Infection*, 125, 55-61.
- Mead P. S., Slutsker L., Dietz V. *et al*, 1999. Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.
- Michino H., Araki K., Minami S., Takaya S., Sakai N., Miyazaki M., Ono A., Yanagawa H., 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150, 787-796.
- Miyagi K., Omura K., Ogawa A., Hanafusa M., Nakano Y., Morimatsu S., Sano K., 2001. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. *Epidemiology and Infection*, 126, 129-133.

- Muniesa M., Jofre J., 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga Toxin 2 gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2443-2448.
- Muniesa M., Jofre J., 2000. Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the *stx 2* gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiologic Letters*, 183, 197-200.
- Muniesa, M., Lucena, F., Jofre, J., 1999. Comparative survival of free Shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5615-5618.
- Nakao H., Kimura K., Murakami H., Maruyama T., Takeda T., 2002. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34, 289-297.
- Nielsen E. M., Andersen M. T., 2003. Detection and characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2884-2893.
- O'Brien A.D., LaVeck G.D., Thompson M.R., Formal S.B., 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal Infectious Diseases*, 146, 763-769.
- O'Brien A.D., Newland J.W., Miller S.F., Holmes R.K., Smith H.W., Formal S.B., 1984. Shiga-like toxin converting phages from *E. coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*, 226, 694-696.
- Ogden I. D., Fenlon D. R., Vinten A. J. A., Lewis D., 2001. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 111-117.
- Ohmura-Hoshino, M., Ho, S.T., Kurazono, H., Igarashi, K., Yamasaki, S. and Tadeka, Y., 2003. Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga toxin 1 from bovine *Escherichia coli* strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin. *Microbiology and Immunology*, 47, 717-725.
- Orskov F., Orskov I., 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*, 14, 43-112.
- Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic *Escherichia coli* : characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68, 64-71.
- Panisello PJ, Rooney R, Quantick PC, Stanwell-Smith R., 2000. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology*, 59,221-234.
- Paton, A. W. et Paton J.C., 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx(1)*, *stx(2)*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E-coli hlyA*, *rfb(O111)*, and *rfb(O157)*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 598-602.
- Paunio M., Pebody R., Keskimaki M., Kokki M., Ruutu P., Oinonen S., Vuotari V., Siitonen A., Lahti E., Leinikki P., 1999. Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157: H7. *Epidemiology and Infection*, 122, 1-5.
- Pommepuy M., Hervio-Heath D., Caprais M.P., Gourmelon M., Le Saux J.C., Le Guyader M., 2005. Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. Dans : *Oceans and health pathogens in the marine environment*, ed. Belkin S., Colwell R.R., pp. 331-359, New York, Etats-Unis.

- Potasman I., Paz A., Odeh M., 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Shellfish-Associated Infectious Outbreaks*, 35, 921-927.
- Rampersad F. S., Laloo S., La Borde A., Maharaj K., Sookhai L., Teelucksingh J., Reid S., McDougall L., Adesiyun A. A., 1999. Microbial quality of oysters sold in Western Trinidad and potential health risk to consumers. *Epidemiology and Infection*, 123, 241-250.
- Randall L. P., Wray C., Davies R. H., 1999. Survival of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 under simulated farm conditions. *The Veterinary Record*, 145, 500-501.
- Read S. C., Clarke R. C., Grandis S. A. d., Hii J., McEwen S., Gyles C. L., 1992. Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 153-161.
- Reid S.D., Betting D.J., Whitlam T.S., 1999. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2719-2722.
- Riley L. W., Remis R. S., Helgerson S. D., Mac Gee H. B., Wells J. G., Davis B. R., Herbert R. J., Johnson L. M., Margrett N. T., Blake P. A., Cohen L. A., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine*, 308, 681-685.
- Samadpour M., Ongerth J. E., Liston J., Tran N., Nguyen D., Whittam T. S., Wilson R. A., Tarr P. I., 1994. Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1038-1040.
- Schmidt H., Beutin L., Karch H., 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157 strain EDL933. *Infection and Immunity*, 63, 1055-1061.
- Schmidt H., Scheef J., Huppertz H., Frosch M., Karch H., 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H- strains that do not produce Shiga Toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3491-3496.
- Schmidt H., 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Research in Microbiology* 152, 687-695.
- Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L. H., Karch H., 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1205-1208.
- Scoging A.C., 2003. Illness associated with seafood. *Can. Med. Assoc. J.*, 147, 1344-1347.
- Sharma V. K., Dean-Nystrom E. A., Casey T. A., 1999. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxigenic *E. coli*. *Molecular and Cellular Probes*, 13, 291-302.
- Smith H.W., Green P., Parsell Z., 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria : transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *Journal of General Microbiology*, 129, 3121-3137.
- Sumner J., Ross T., 2002 A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 55-59.

- Tanji Y., Mizoguchi K., Yoichi M., Morita M., Kijima N., Kator H., Unno H., 2003. Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157:H7 in a wastewater treatment plant. *Water Research*, 37, 1136-1142.
- Tuttle J., Gomez T., Doyle M. P., Wells J. G., Zhao T., Tauxe R. V., Griffin P. M., 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and Infection*, 122, 185-192.
- Vernozy-Rozand C., Feng P., Montet M. P., Ray-Gueniot S., Villard L., Bavai C., Meyrand A., Mazuy C., Atrache V., 2000. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 in heifers' faecal samples using an automated immunoconcentration system. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 217-222.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Ray-Gueniot S., BoutrandLoei S., Meyrand A., Richard Y., 1998. Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples. *Journal of Food Protection*, 61, 917-920.
- Vernozy-Rozand C., Montet M., Lequerrec F., Serillon E., Tilly B., Bavai C., Ray-Gueniot S., Bouvet J., Mazuy-Cruchaudet C., Richard Y., 2002. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 473-478.
- Vernozy-Rozand C., Montet M.P., 2001. *Escherichia coli* O157 : H7. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 135 p.
- Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Bertin Y., Trably F., Girardeau J.P., Martin C., Livrelli V., Beutin L., 2004. Serotyping, stx2 subtyping, and characterisation of the locus of enterocyte effacement island of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2556-2559.
- Wallace J. S., Cheasty T., Jones K., 1997. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 399-404.
- Wallace, B.J., Guzewich, J.J., Cambridge, M., Altekruze, S. and Morse, D.L., 1999. Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994. *American Journal of Preventive Medicine*, 17, 48-54.
- Yam W. C., Chan C. Y., Ho Bella S. W., Tam T. Y., Kueh C., Lee T., 1999. Abundance of clinical enteric bacterial pathogens in coastal waters and shellfish. *Water Research*, 34, 51-56.
- Zhang W., Bielaszewska M., Kuczius T., Karch H., 2002. Identification, characterisation and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1441-1446.
- Zidane M., Pommepey M., 2003. Les coquillages et leur implication dans les TIAC en France, 1991-2001. Rapport Ifremer.

8. Abréviations

ADN : Acide desoxyribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

CLI : Chairs et liquides intervalvaires

CT-SMAC : Gélose Mac Conkey au sorbitol avec apport de céfixime et tellurite

Dapi : Diamidino phénylindole

E. coli : *Escherichia coli*

EPT : Eau peptonée tamponnée

Hp : Hépto-pancréas

IG : Résine Instagène

IMS : Immunoséparation magnétique

MG : Moyenne géométrique

PBS : Tampon phosphate salé (Phosphate Buffer Saline)

PCR : Polymerase Chain Reaction

STEC : *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines

TIACs : Toxi-infections alimentaires collectives

UFC : Unité formant colonie

VTEC : *Escherichia coli* vérotoxique

DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales

DDSV : Direction Départementale des Services Vétérinaires, DDSV

InVS : Institut de Veille Sanitaire

Annexes

Annexe 1 : Classement des zones conchylicoles (Anon., 1991)

Directive européenne 91/492/CEE du 15 juillet 1991

Arrêté d'application du 21 mai 1999

Nombre d' <i>Escherichia coli</i> dans 100 g C L I				
Classe	230	1000	4600	46000
A	$\geq 90\%$	$\leq 10\%$	0%	
B	$\geq 90\%$		$\leq 10\%$	0%
C	$\geq 90\%$			$\leq 10\%$
D				$> 10\%$

CLI : chair et liquide intervalvaire

A : vente directe

B : vente après purification ou reparcage

C : vente après reparcage de longue durée

D : vente interdite

Annexe 2 : Concentrations en *E. coli* des coquillages

Lots de coquillage	Date	Types de coquillage	<i>E. coli</i> / 100 g CLI	PCR <i>stx</i>
1a	07.10.02	Moules	53	-
1b	13.01.03	Moules	4030	+
1c	08.04.03	Moules	490	-
1d	01.07.03	Moules	14000	+
1e	15.09.03	Moules	< 100	-
1f	01.12.03	Moules	420	-
1g	08.03.04	Moules	390	+
1h	10.05.04	Moules	900	+
2a	23.09.02	Moules	189	+
2b	20.01.03	Moules	163	-
2c	02.04.03	Moules	< 100	-
2d	17.07.03	Moules	120	+
2e	25.09.03	Moules	< 100	-
2f	08.10.03	Moules	1200	-
2g	26.11.03	Moules	4900	+
2h	08.12.03	Moules	300	+
2i	20.01.04	Moules	1100	+
2j	24.02.04	Moules	< 100	-
2k	10.03.04	Moules	< 100	+
2l	05.05.04	Moules	2500	+
2m nord	01.06.04	Moules	1400	-
2m sud	01.06.04	Moules	2300	+
2n nord	04.08.04	Moules	< 100	+
2n sud	04.08.04	Moules	237	-
3a	09.09.02	Huîtres	321	-
3b	06.01.03	Huîtres	< 100	-
3c	04.02.03	Huîtres	100	-
3d	03.04.03	Huîtres	< 100	-
3e	16.07.03	Huîtres	1400	-
3f	08.09.03	Huîtres	2800	-
3g	13.10.03	Huîtres	820	+
3g'	13.10.03	Coques	4100	+
3h	08.12.03	Huîtres	140	+
3h'	08.12.03	Coques	1700	+
3i	09.02.04	Huîtres	900	-
3i'	09.02.04	Coques	620	+
3j	03.05.04	Huîtres	< 100	-
3j'	03.05.04	Coques	200	+
4a	08.07.02	Huîtres	700	-
4b	02.10.02	Huîtres	490	-
4c	28.01.03	Huîtres	950	-
4d	14.04.03	Huîtres	1300	-
4e	28.04.03	Huîtres	400	-

4f	16.07.03	Huîtres	320	-
4g	24.09.03	Huîtres	670	-
4h	02.10.03	Huîtres	1400	+
4i	21.01.04	Huîtres	< 100	-
4j	08.03.04	Huîtres	220	-
4k	17.05.04	Huitres	420	+ (faible)
5a	09.09.02	Moules	139	-
5b	06.01.03	Moules	1300	+
5c	07.04.03	Moules	< 18	-
5d	07.07.03	Moules	20	-
5e	15.09.03	Moules	45	-
5f	08.12.03	Moules	1 300	+
5g	24.02.04	Moules	217	-
5h	10.05.04	Moules	40	+
6a	16.09.02	Moules	321	+
6b	27.01.03	Moules	< 100	-
6c	22.04.03	Moules	< 100	-
6d	16.07.03	Moules	4900	-
6e	23.09.03	Moules	< 100	-
6f	01.12.03	Moules	250	-
6g	02.02.04	Moules	570	-
6h	10.05.04	Moules	118	-
7a	01.10.02	Huîtres	160000	+
7b	11.02.03	Huîtres	Nd	+
7c	12.05.03	Huîtres	4900	+
7d	07.07.03	Huîtres	2500	+
7e	08.09.03	Moules	3100	+
7f	03.02.04	Huîtres	330	+
7g	17.05.04	Huîtres	<100	-

Tableau 7 : Concentrations en *E. coli* des coquillages analysés au cours de l'étude. ¹ le chiffre correspond au site de prélèvement et la lettre au numéro de prélèvement. Les lots de 1 à 6 sont issus de sites conchylicoles classés en B, les lots 7 sont issus d'un site interdit à la conchyliculture (coquillages implantés en aval d'une station d'épuration).

Annexe 3 : Séquences des gènes *stx1* de 3 des souches isolées au cours de l'étude et déposées dans la banque de données GenBank

LOCUS AY986980 1295 bp DNA linear BCT 13-JAN-2006

DEFINITION Escherichia coli strain IF Ec AB8SF shiga-like toxin type 1 subunit A variant (*stx1A*) and shiga-like toxin type 1 subunit B variant (*stx1B*) genes, complete cds.

ACCESSION AY986980

VERSION AY986980.1 GI:66271626

KEYWORDS .

SOURCE Escherichia coli

ORGANISM Escherichia coli
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1295)

AUTHORS Gourmelon,M., Montet,M.P., Lozach,S., Le Mennec,C., Pommepey,M., Beutin,L. and Vernozy-Rozand,C.

TITLE First isolation of Shiga toxin 1d producing Escherichia coli variant strains in shellfish from coastal areas in France

JOURNAL J. Appl. Microbiol. 100 (1), 85-97 (2006)

PUBMED 16405688

REFERENCE 2 (bases 1 to 1295)

AUTHORS Gourmelon,M., Montet,M.P., Lozach,S., Le Mennec,C., Pommepey,M., Beutin,L. and Vernozy-Rozand,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-MAR-2005) EMP/MIC, IFREMER, BP70, Plouzane 29280, France

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1295
/organism="Escherichia coli"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="IF Ec AB8SF"
/serovar="O149:H1"
/db_xref="taxon:562"

gene 11..958
/gene="stx1A"

CDS 11..958
/gene="stx1A"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="shiga-like toxin type 1 subunit A variant"
/protein_id="AAY43852.1"
/db_xref="GI:66271627"
/translation="MKIMIFRALTFFFVIFSVNAIAKEFTLDFSTAKKYVDSLNVIRS
AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDIMGLEPEEERFNNLRLIVERNNLYVTG
FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTRAVTSLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS
YLDLMSYSGTSLTQSVARAMLRVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAED
VDLTLNWGRLLSSILPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVARMTP
DEFPSMCPDGSGRGITHNKILWDSSTLGAILIRRTISS"

gene 968..1237
/gene="stx1B"

CDS 968..1237
/gene="stx1B"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="shiga-like toxin type 1 subunit B variant"
/protein_id="AAY43853.1"
/db_xref="GI:66271628"
/translation="MKKVLIIAVLSFLSASVLAAPDCVTGKVEYTKYNDTDFTVKV
ADKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTTACHNGGGFSEVIFR"

ORIGIN

1 attgtgtaat atgaaaataa tgatttttag ggcgctaaca tttttcttcg ttatcttttc
61 agttaatgcy attgctaagg agtttacctt agatttctca acagcaaaga agtatgttga
121 ttcgctgaat gtcattcgct ctgcaatagg tacgccatta cagactatct catcgggagg
181 tacatcttta ctgatgattg atagtggcac aggcgataat ttatttgcag tcgatatcat
241 ggggttagaa ccagaggaag agcggtttaa caatctacga ctgattgttg aacgaaataa
301 tttatatgtg acaggatttg ttaacaggac aaacaatggt ttttatcgct ttgctgattt
361 ttcacatggt acctttcctg gtacaagagc ggttacattg tctggtgaca gtagctatac
421 cacgttacag cgtgttgcyg ggatcagtcg tacggggatg cagataaatc gccattcgct

```

481 gactacttct tatctggatt tgatgtcgta tagcggaaacc tcaactgacgc agtctgtagc
541 aagagcaatg ttacggtttg ttactgtgac agctgaagct ttgctgtttc gccaaatcca
601 gaggggattt cgtacaacac ttgatgatct cagtggacgt tcttatgtaa tgactgctga
661 agatggtgat cttacattga attggggaag actgagtagt attctgcccg actatcatgg
721 acaagactcc gttcgtggtg gaagaatttc ttttgggagt attaatgcaa ttctgggaag
781 cgtggcatta atattaaatt gccatcatca tgcacacga gttgccagaa tgacacctga
841 tgagtttctt tctatgtgcc cgacagatgg aagtgggctg gggattactc acaataaaat
901 attgtgggac tcatctacac tgggggcaat tttgattcgc agaactatca gtagttgagg
961 gggtaaaatg aaaaaagtat tattaatagc tgtttcactt tcatttcttt cagcaagtgt
1021 tctggcagcg ccagattgtg taaccggaaa ggtggagtat acaaaatata atgatgacga
1081 tactttttacg gttaaagtgg cagataaaga attatttact aacagatgga atcttcagtc
1141 tcttcttcta agtgcacaaa ttacggggat gacggtaact attaagacta ctgcttgtca
1201 taatggaggg ggattcagcg aggttatttt tcggttgattc agaatagccc tgtgaagagc
1261 acagggaggt tcatcaatgt taaatatgtc aattc

```

```

LOCUS       AY986981                1295 bp    DNA        linear    BCT 13-JAN-2006
DEFINITION  Escherichia coli strain IF Ec AB8Hp shiga-like toxin type 1 subunit
            A variant (stx1A) and shiga-like toxin type 1 subunit B variant
            (stx1B) genes, complete cds.
ACCESSION   AY986981
VERSION     AY986981.1  GI:66271629
KEYWORDS    .
SOURCE      Escherichia coli
  ORGANISM  Escherichia coli
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1295)
AUTHORS     Gourmelon,M., Montet,M.P., Lozach,S., Le Mennec,C., Pommepeuy,M.,
            Beutin,L. and Vernozy-Rozand,C.
TITLE       First isolation of Shiga toxin 1d producing Escherichia coli
            variant strains in shellfish from coastal areas in France
JOURNAL     J. Appl. Microbiol. 100 (1), 85-97 (2006)
PUBMED      16405688
REFERENCE   2 (bases 1 to 1295)
AUTHORS     Gourmelon,M., Montet,M.P., Lozach,S., Le Mennec,C., Pommepeuy,M.,
            Beutin,L. and Vernozy-Rozand,C.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (24-MAR-2005) EMP/MIC, IFREMER, BP70, Plouzane 29280,
            France
FEATURES    Location/Qualifiers
     source          1..1295
                   /organism="Escherichia coli"
                   /mol_type="genomic DNA"
                   /strain="IF Ec AB8Hp"
                   /serovar="O149:H1"
                   /db_xref="taxon:562"
     gene            11..958
                   /gene="stx1A"
     CDS             11..958
                   /gene="stx1A"
                   /codon_start=1
                   /transl_table=11
                   /product="shiga-like toxin type 1 subunit A variant"
                   /protein_id="AAY43854.1"
                   /db_xref="GI:66271630"
                   /translation="MKIMIFRALTFFFVIFSVNAIAKEFTLDFSTAKKYVDSLNVIRS
                   AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDIMGLEPEEERFNNLRLIVERNNLYVTG
                   FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTRAVTSLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS
                   YLDLMSYSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRFTLDDLSGRSYVMTAED
                   VDLTLNWGRLLSSILPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVARMTF
                   DEFPSMCPDGSGRGITHNKILWDSSTLGAILIRRTISS"
     gene            968..1237
                   /gene="stx1B"
     CDS             968..1237
                   /gene="stx1B"
                   /codon_start=1
                   /transl_table=11

```

/product="shiga-like toxin type 1 subunit B variant"
 /protein_id="AAY43855.1"
 /db_xref="GI:66271631"
 /translation="MKKVLIIAVSLSFLSASVLAAPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKV
 ADKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTTACHNGGGFSEVIFR"

ORIGIN

```

1 attgtgtaat atgaaaataa tgatttttag ggcgctaaca tttttcttcg ttatcttttc
61 agttaatgcg attgctaagg agtttacctt agatttctca acagcaaaga agtatgttga
121 ttcgctgaat gtcattcgct ctgcaatagg tacgccatta cagactattt catcgggagg
181 tacatcttta ctgatgattg atagtggcac aggcgataat ttatttgacg tcgatatcat
241 ggggttagaa ccagaggaag agcggtttaa caatctacga ctgattgttg aacgaaataa
301 tttatatgtg acaggatttg ttaacaggac aaacaatgtt ttttatcgct ttgctgattt
361 ttcacatggt acctttcctg gtacaagagc ggttacattg tctggtgaca gtagctatac
421 cacgttacag cgtgttgccg ggatcagtcg tacggggatg cagataaatc gccattcgct
481 gactacttct tatctggatt tgatgtccta tagcgggaacc tcaactgacg agtctgtagc
541 aagagcaatg ttacggtttg ttactgtgac agctgaagct ttgctgtttc gccaaatcca
601 gaggggattt cgtacaacac ttgatgatct cagtggacgt tcttatgtaa tgactgtga
661 agatgttgat cttacattga attggggaag actgagtatg attctgcccg actatcatgg
721 acaagactcc gttcgtgttg gaagaatttc ttttgggagt attaatgcaa ttctgggaag
781 cgtggcatta atattaaatt gccatcatca tgcacacga gttgccagaa tgacacctga
841 tgagtttctt tctatgtgcc cgacagatgg aagtgggctg gggattactc acaataaaat
901 attgtgggac tcatctacac tgggggcaat tttgattcgc agaactatca gtagttgagg
961 gggtaaaatg aaaaaagtat tattaatagc tgtttcactt tcatttcttt cagcaagtgt
1021 tctggcagcg ccagattgtg taaccgaaa ggtggagtat acaaaatata atgatgacga
1081 tactttttacg gttaaagtgg cagataaaga attatttact aacagatgga atcttcagtc
1141 tcttcttcta agtgcacaaa ttacggggat gacggtaact attaagacta ctgcttgc
1201 taatggaggg ggattcagcg aggttatttt tcgttgattc agaatagccc tgtgaagagc
1261 acagggaggt tcatcaatgt taaatatgtc aattc

```

LOCUS AY986982 1295 bp DNA linear BCT 13-JAN-2006
 DEFINITION Escherichia coli strain IF Ec LR2 shiga-like toxin type 1 subunit A variant (stx1A) and shiga-like toxin type 1 subunit B variant (stx1B) genes, complete cds.
 ACCESSION AY986982
 VERSION AY986982.1 GI:66271632
 KEYWORDS .
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM Escherichia coli
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1295)
 AUTHORS Gourmelon,M., Montet,M.P., Lozach,S., Le Mennec,C., Pommepuy,M., Beutin,L. and Vernozy-Rozand,C.
 TITLE First isolation of Shiga toxin 1d producing Escherichia coli variant strains in shellfish from coastal areas in France
 JOURNAL J. Appl. Microbiol. 100 (1), 85-97 (2006)
 PUBMED 16405688
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1295)
 AUTHORS Gourmelon,M., Montet,M.P., Lozach,S., Le Mennec,C., Pommepuy,M., Beutin,L. and Vernozy-Rozand,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-MAR-2005) EMP/MIC, IFREMER, BP70, Plouzane 29280, France
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1295
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="IF Ec LR2"
 /serovar="O100:H21"
 /db_xref="taxon:562"
 gene 11..958
 /gene="stx1A"
 CDS 11..958

```

/gene="stx1A"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="shiga-like toxin type 1 subunit A variant"
/protein_id="AAY43856.1"
/db_xref="GI:66271633"
/translation="MKIMIFRALTFFFVIFSVNAIAKEFTLDFSTAKKYVDSLNVIRS
AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDIMGLEPEEERFNNLRLIVERNNLYVTG
FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTRAVTSLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS
YLDLMSYSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAED
VDLTLNWGRLLSSILPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVARMP
DEFPSMCPDGDGSGRGITHNKILWDSSTLGAILIRRTISS"
gene      968..1237
          /gene="stx1B"
CDS       968..1237
          /gene="stx1B"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="shiga-like toxin type 1 subunit B variant"
          /protein_id="AAY43857.1"
          /db_xref="GI:66271634"
          /translation="MKKVLLIAVSLSFLSASVLAAPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKV
ADKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTTACHNGGGFSEVIFR"
ORIGIN
1  attgtgtaat  atgaaaataa  tgatttttag  ggcgctaaca  tttttcttcg  ttatcttttc
61  agttaatgcg  attgctaagg  agtttacctt  agatttctca  acagcaaaga  agtatgttga
121  ttcgctgaat  gtcattcgct  ctgcaatagg  tacgccatta  cagactatth  catcgggagg
181  tacatcttta  ctgatgattg  atagtggcac  aggcgataat  ttatttgag  tcgatatcat
241  ggggttagaa  ccagaggaag  agcggtttaa  caatctacga  ctgattgttg  aacgaaataa
301  tttatatgtg  acaggatttg  ttaacaggac  aaacaatgtt  ttttatcgct  ttgctgattt
361  ttcacatggt  acctttcctg  gtacaagagc  ggttacattg  tctggtgaca  gtagctatac
421  cacgttacag  cgtgttgcgg  ggatcagtcg  tacggggatg  cagataaatc  gccattcgct
481  gactacttct  tatctggatt  tgatgtcgta  tagcggaacc  tcaactgacg  agtctgtagc
541  aagagcaatg  ttacggtttg  ttactgtgac  agctgaagct  ttgctgtttc  gccaaatcca
601  gaggggattt  cgtacaacac  ttgatgatct  cagtggacgt  tcttatgtaa  tgactgctga
661  agatgttgat  cttacattga  attggggaag  actgagtagt  attctgcccg  actatcatgg
721  acaagactcc  gttcgtggtg  gaagaatctc  ttttgggagt  attaatgcaa  ttctgggaag
781  cgtggcatta  atattaaatt  gccatcatca  tgcacacaga  gttgccagaa  tgacacctga
841  tgagtttctt  tctatgtgcc  cgacagatgg  aagtgggctg  gggattactc  acaataaaat
901  attgtgggac  tcatctacac  tgggggcaat  tttgattcgc  agaactatca  gtagttgagg
961  gggtaaaatg  aaaaaagtat  tattaatagc  tgtttcactt  tcatttcttt  cagcaagtgt
1021  tctggcagcg  ccagattgtg  taaccggaaa  ggtggagtat  acaaaaatata  atgatgacga
1081  tacttttacg  gttaaagtgg  cagataaaga  attatttact  aacagatgga  atcttcagtc
1141  tcttcttcta  agtgcacaaa  ttacggggat  gacggtaact  attaagacta  ctgcttgca
1201  taatggaggg  ggattcagcg  aggttattht  tcggttgattc  agaatagcc  tgtgaagagc
1261  acagggaggt  tcatcaatgt  taaatatgtc  aattc

```

Annexe 4 : Publication