



université de bretagne  
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*Mention : Microbiologie*

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

**Charlotte BALIERE**

Laboratoire LSEM Ifremer centre de Brest

# LES *ESCHERICHIA COLI* POTENTIELLEMENT PATHOGENES DANS L'ENVIRONNEMENT LITTORAL : CAS DES STEC ET DES EPEC



Établissement public du ministère  
chargé du développement durable

Thèse soutenue le 28 Janvier 2016  
devant le jury composé de :

- **Rapporteur : Mme. Maïte Muniesa, Professeur,** Université de Barcelone, Espagne
- **Rapporteur : Mr. Hubert Brugère, Professeur** Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse
- **Examinatrice : Mme. Gwenaelle Le Blay, Professeur,** Université de Bretagne Occidentale, Brest
- **Examinateur : Mr. Stéphane Bonacorsi, Professeur, Praticien Hospitalier,** Service de Microbiologie, CNR associé *Escherichia coli*, Paris
- **Examinatrice : Mme. Anne-Marie Pourcher, Directeur de recherche,** IRSTEA, Unité de Recherche Gestion Environnement et traitement biologique des déchets, Rennes
- **Directeur de thèse : Mr. Alain Rincé, Professeur,** Université de Caen, Normandie
- **Co-directrice de thèse : Mme. Michèle Gourmelon,**







## REMERCIEMENTS

*Aux membres du jury,*

*A Madame le Professeur Maite Muniesa et Monsieur le Professeur Hubert Brugère pour avoir accepté d'examiner cette thèse en qualité de rapporteur. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour le temps passé à l'étude de ces travaux et pour l'intérêt que vous y avez porté.*

*A Madame le Professeur Gwenaëlle Le Blay qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.*

*A Madame le Directeur de recherche Anne-Marie Pourcher pour avoir accepté de faire partie de ce jury en qualité d'examinatrice.*

*A Monsieur le Professeur Stéphane Bonacorsi pour avoir accepté de faire partie de ce jury en qualité d'examineur, pour sa disponibilité et ses conseils avisés.*

*A Madame le Docteur Michèle Gourmelon et Monsieur le Professeur Alain Rincé pour leur encadrement pendant cette thèse, leur confiance et leur disponibilité.*

*Un grand merci tout particulièrement à Michèle Gourmelon pour ton aide et pour ton investissement sans limite dans la rédaction des publications et la correction du manuscrit. Merci pour ta confiance et pour m'avoir donné l'opportunité de collaborer avec plusieurs équipes. Ton soutien tant qu'encadrante nous a permis de pouvoir présenter des travaux de qualité.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer dans ce projet, Delphine Thévenot-Sergentet, Josée Harel, Philippe Vogeleer, Jorge Blanco, Ghizlane Dahbi, Sabine Delannoy et Patrick Fach, pour leur disponibilité et leurs conseils pour mener à bien ce projet.*

*Mille mercis à Madame Patricia Mariani-Kurkdjian pour avoir partagé cette aventure avec moi et pour être toujours présente à mes côtés. Une pensée également pour Monsieur le Professeur Edouard Bingen.*

*Un grand merci à toute l'équipe du service de Microbiologie de l'Hôpital Robert Debré pour leur accueil si chaleureux et pour ces quelques années supplémentaires passées avec vous. Vous êtes tous chouettes ! Merci tout particulièrement à Céline, Elsa et Audrey.*

*Je tiens à remercier vivement l'ensemble de l'équipe du laboratoire LSEM pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur et pour tous nos échanges.*

*Un merci tout particulier à l'équipe LSEM de Plouzané, Joelle, Manue, Solen, Véro, Dominique, Michèle, Jean-Claude et Marie-Paule pour leur accueil et tous les moments partagés dans le labo, sur le terrain mais également en dehors du travail.*

*Merci à Noémie, Céline, Cyrielle et Natasha pour nos bons moments passés sur Brest et dans le labo.*

*Merci aux copines, Louise et Nolwenn qui ont partagé ce morceau de chermín avec moi.*

*Un grand merci à ma famille, à mes parents, Brigitte et Dominique, pour leur soutien et leur présence. Vous êtes toujours là...*

*Un énorme merci à ma sœur, Clémence, pour ton soutien et pour le travail que tu as accompli dans ce projet. Je ne pouvais pas espérer mieux que de partager cette expérience d'aussi près avec toi.*

*A Mamie Huguette*

# Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	15
CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
I. <i>ESCHERICHIA COLI</i> COMMENSAL ET PATHOGENE.....	23
A. Généralités concernant l'espèce <i>E. coli</i> .....	23
B. Notion d'habitat primaire et d'habitat secondaire.....	24
C. Organisation et dynamique du génome.....	26
D. <i>E. coli</i> pathogène : définition des pathovars.....	28
E. <i>E. coli</i> commensal et pathogène : notion de classification.....	33
1. <b>Classification selon le sérotype</b> .....	<b>33</b>
2. <b>Classification selon les phylogroupes</b> .....	<b>34</b>
3. <b>Classification selon les séropathotypes</b> .....	<b>39</b>
II. <i>E. COLI</i> ENTEROPATHOGENE (EPEC) ET <i>E. COLI</i> PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC).....	40
A. Présentation des EPEC.....	40
B. Présentation des STEC.....	41
C. Pathologies humaines et animales.....	44
1. <b>Symptômes liés aux infections par des EPEC</b> .....	<b>44</b>
2. <b>Symptômes liés aux infections par des STEC</b> .....	<b>44</b>
D. Les facteurs de virulence.....	47
1. <b>Les Shiga-toxines</b> .....	<b>47</b>
2. <b>Locus of enterocyte effacement (LEE)</b> .....	<b>54</b>
3. <b>Autres gènes de virulence</b> .....	<b>56</b>
4. <b>Notion de risque moléculaire</b> .....	<b>60</b>
E. Réservoirs des EPEC.....	61
F. Réservoirs des STEC.....	61
G. Mode de transmission.....	66
III. <i>ESCHERICHIA COLI</i> DANS L'ENVIRONNEMENT LITTORAL.....	70
A. Définition de l'environnement littoral.....	70

B.	Réglementation sanitaire en zone littorale.....	71
1.	<b>Les indicateurs de contamination fécale : <i>E. coli</i> et les entérocoques.....</b>	<b>71</b>
2.	<b>Classification des zones de baignade .....</b>	<b>72</b>
3.	<b>Classification des zones conchylicoles .....</b>	<b>73</b>
C.	Contamination et décontamination des coquillages .....	75
D.	Sources et apports de <i>E. coli</i> dans l'environnement littoral .....	77
1.	<b>Sources d'origine urbaine.....</b>	<b>78</b>
2.	<b>Sources d'origine agricole .....</b>	<b>79</b>
3.	<b>Sources environnementales : les animaux sauvages .....</b>	<b>81</b>
E.	<i>E. coli</i> de la source à l'environnement littoral .....	81
	MEMOIRE EXPERIMENTAL .....	85
	AXES DE RECHERCHE.....	87
	Chapitre 1 : CONTEXTE ET DESCRIPTION DES SITES D'ETUDES.....	89
A.	Site sélectionné en Région Bretagne .....	89
B.	Sites sélectionnés en Région Basse-Normandie .....	91
C.	Les paramètres suivis au cours de l'étude globale .....	93
D.	Organisation des prélèvements et des analyses.....	93
	Chapitre 2 : DETECTION ET ISOLEMENT DES <i>E. COLI</i> PRODUCTEURS DE SHIGA- TOXINES APPARTENANT AUX CINQ SEROTYPES MAJEURS DANS L'ENVIRONNEMENT LITTORAL .....	95
A.	Contexte de la première partie de l'étude .....	95
B.	Publication N°1 .....	99
	Chapitre 3 : PREVALENCE ET CARACTERISATION DES <i>E. COLI</i> PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES ET DES <i>E. COLI</i> ENTEROPATHOGENES DANS DES ZONES CONCHYLICOLES FRANCAISES ET LEUR BASSINS VERSANTS .....	101
A.	Contexte de la deuxième partie de l'étude.....	101
B.	Publication N°2 .....	105
	Chapitre 4 : PROFIL DE VIRULENCE DES <i>E. COLI</i> PRODUCTEURS DE SHIGA- TOXINES ET DES <i>E. COLI</i> ENTEROPATHOGENES ISOLES EN ZONES CONCHYLICOLES FRANCAISES .....	107
A.	Contexte de la troisième partie de l'étude .....	107
B.	Publication N°3 .....	111



Chapitre 5 : EVALUATION DE LA CINETIQUE DE CONTAMINATION ET DE DECONTAMINATION DE COQUILLAGES AU CONTACT DE SOUCHES STEC .....	113
A. Contexte de la quatrième partie de l'étude .....	113
B. Matériels et méthodes.....	114
C. Résultats.....	117
D. Discussion.....	119
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131
ANNEXES .....	169
LISTE DES PUBLICATIONS .....	177
LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES.....	178
LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES .....	178

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

A/E	Attachement/Effacement	EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasif
AA	Aggregative adherence	EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogène
AAF	Aérobic-anaérobic facultatif	EPECa	<i>E. coli</i> entéropathogène atypique
<i>aap</i>	accumulation-associated protein	EPECT	<i>E. coli</i> entéropathogène typique
ADN	Acide désoxyribonucléique	EPT	Eau peptonée tamponnée
AEEC	Attaching and Effacing <i>E. coli</i>	Esc	<i>E. coli</i> secretion protein
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	Esp	<i>E. coli</i> secreted protein
<i>aggA/R</i>	AraC-like transcriptional activator A/R	ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxigène
AgH	Antigène flagellaire H	ExPEC	<i>E. coli</i> extra-intestinaux
AgK	Antigène capsulaire K	<i>fyuA</i>	ferric yersiniabactin uptake
AgO	Antigène somatique O	<i>hlyA</i>	alpha-hemolysin
AIDA	Adhesin involved in diffuse adhesion	<i>ial</i>	invasion-associated locus
AIEC	<i>E. coli</i> à adhérence invasive	Iha	IrgA homologue adhesin
ARN	Acide ribonucléique	IMS	Immuno-Magnetic Separation
ARS	Agence Régionale de la Santé	InPEC	<i>E. coli</i> intestinaux
$a_w$	la disponibilité en eau	<i>ipaH</i>	invasion plasmid antigen H
<i>bfp</i>	bundle-forming pilus gene	IrgA	Iron-regulated gene homologue A
CDC	Centre for Disease Control and prevention	<i>irp2</i>	Iron responsible protein 2
Cdt	Cytolethal distending toxin protein	ISO	International Organization for Standardization
Ces	Chaperone for <i>E. coli</i> secreted protein	kDa	Kilo dalton
CF	Facteur de colonisation	LABEO	Laboratoire d'analyse de la Manche
CG	Copies de Génome	LAL	Localized adherence-like
CH	Colite Hémorragique	LDC	Lysine décarboxylase
CLI	Chairs et liquides intervalvaires	LEE	Locus of Enterocyte Effacement
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique	<i>lifA</i>	Lymphocyte inhibitory factor
UFC	Unité Formant Colonie	Lpf	Long polar fimbriae
DA	Diffuse-adherence	LSEM	Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse	LT	Heat-labile toxin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MAT	Microangiopathie thrombotique
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing	MLST	Multi-Locus Sequence Typing
EAEC/EAgg	<i>E. coli</i> entéroagrégatif	nd	Non déterminé
EAHEC	<i>E. coli</i> entéro-agrégant hémorragique	NESP	National Enteric Surveillance Program
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	NGS	Next Generation Sequencing
<i>ecfI</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing gene positive conserved fragment 1	<i>nle</i>	Non LEE-encoded effector
<i>efa</i>	EHEC factor for adherence	ODC	Ornithine décarboxylase
EFSA	European Food Safety Authority	OI	Genomic O island
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
EHECa	<i>E. coli</i> entérohémorragique atypique	ORF	Open Reading Frame
EHECt	<i>E. coli</i> entérohémorragique typique	<i>paa</i>	porcine attaching-and effacing associated factor gene
EHESP	Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique	<i>pagC</i>	PhoP-activated gene C
<i>ehxA</i>	enterohemolysin A	Pb	Paire de base
		pEAF	Plasmide codant pour le facteur EPEC adhesion factor
		PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
		<i>pic</i>	Serine protease gene
		PTT	Purpura Thrombotique Thrombocytopenique

RBE	Ressources Biologiques et Environnement
REMI	REseau de surveillance Microbiologique de l'Ofremer
Saa	STEC autoagglutinating adhesine
sep	Secretion of <i>E. coli</i> protein
SG2M	Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SPATE	Serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae
SSTT	Système de sécrétion de type III
ST	Heat-stable toxin
ST	Sequence type
STEC	<i>E. coli</i> producteur de Shiga toxines
STEP	Station d'épuration
Stx	Shiga-toxine
subA	cytotoxine subtilase gene
TBX	Trypton-Bile-X-glucuronidase
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
Tir	Tyrosine phosphorylated protein
TSA	Trypticase-caséine-soja
TSM	Traceurs de Sources Microbiennes
UFC	Unité formant colonie
USDA/FSIS	U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service
VNC	Viable non-cultivable
-Glu	-glucuronidase



## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Cycle de vie de <i>E. coli</i> (d'après Ishii et Sadowski 2008) .....	26
<b>Figure 2</b> : Représentation de la composition du génome moyen de <i>E. coli</i> (d'après van Elsas <i>et al.</i> , 2011). .....	27
<b>Figure 3</b> : Vue d'ensemble des phénomènes d'acquisition et de délétion de gènes chez <i>E. coli</i> appartenant aux différents pathovars (d'après Croxen <i>et al.</i> , 2013). .....	29
<b>Figure 4</b> : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse simultanée de six gènes chromosomiques de ménage ( <i>trpA</i> , <i>trpB</i> , <i>pabB</i> , <i>putP</i> , <i>icd</i> et <i>polB</i> ) utilisant la méthode de parcimonie (méthode statistique non-paramétrique) sur une collection de 98 souches commensales et pathogènes de <i>E. coli/Shigella</i> , enraciné avec une souche <i>E. fergusonii</i> (Escobar-Paramo <i>et al.</i> , 2004). .....	38
<b>Figure 5</b> : Adhésion des EPEC typiques aux entérocytes caractérisée par le développement des lésions d'attachement et d'effacement. 1. Adhésion initiale due aux <i>pili</i> BFP, 2. Fixation étroite de la bactérie due à la sécrétion des protéines codées par le LEE, 3. Formation du piédestal par la polymérisation de filaments d'actine. BFP : <i>bundle-forming pilus</i> . (d'après Kaper <i>et al.</i> , 2004). .....	40
<b>Figure 6</b> : Adhérence des STEC aux entérocytes caractérisée par le développement des lésions d'attachement et d'effacement, puis d'un piédestal et la production de Shiga-toxines (Stx). (d'après Kaper <i>et al.</i> , 2004). .....	42
<b>Figure 7</b> : Système de classification des AEEC/EPECt/EPECa/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches de <i>E. coli</i> . EPEC: enteropathogenic <i>E. coli</i> . EHEC: enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> . STEC: Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> . AEEC: Attaching and effacing <i>E. coli</i> . LEE: Locus of enterocyte effacement. pEAF : plasmid EPEC adhesion factor. <i>stx</i> : Shiga-toxin gene. SHU: Syndrome Hémolytique et Urémique (d'après Naylor <i>et al.</i> , 2005). .....	43
<b>Figure 8</b> : Evolution d'une infection à O157 :H7 chez un enfant (d'après Tarr <i>et al.</i> , 2005). HUS : Hemolytic Uremic Syndrom. ....	45
<b>Figure 9</b> : Processus infectieux des STEC (AFSSA 2003). .....	46
<b>Figure 10</b> : Structure de l'opéron codant les Shiga-toxines (AFSSA 2003). .....	48
<b>Figure 11</b> : Mécanisme d'action des Shiga-toxines. 1) Fixation, 2) Internalisation, 3) Transport rétrograde, 4) Clivage et Action (d'après Pacheco et Sperandio 2012) .....	49
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique d'un bactériophage <i>stx</i> dans sa configuration tête-queue (d'après Schmidt <i>et al.</i> , 2001) .....	53
<b>Figure 13</b> : Organisation schématique du LEE des EHEC/EPEC. <i>esc</i> : <i>E. coli</i> secretion ; <i>sep</i> : secretion of <i>E. coli</i> protein ; <i>esp</i> : <i>E. coli</i> secreted protein ; <i>ces</i> : chaperone for <i>E. coli</i> secreted protein ; <i>orf</i> ou <i>rorf</i> : Open Reading Frame (d'après Garmendia <i>et al.</i> , 2005) .....	54
<b>Figure 14</b> : Gènes de virulence de <i>E. coli</i> associés aux O-Islands 122, 36, 71 et 57. ....	60

<b>Figure 15</b> : Flux potentiels de <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC) et de <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC) et voies potentielles de contamination de l'environnement et de l'Homme. En gris : voie regroupant les effluents, en vert : voie végétale, en bleu clair: voie hydrique, en bleu foncé : voie contact directe ou indirecte, en orange : voie consommation (d'après AFSSA 2003) .....	69
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de l'environnement littoral.....	70
<b>Figure 17</b> : Exigences réglementaires microbiologiques issues du classement des zones conchylicoles [Règlement (CE) n° 854/2004 et arrêté du 06/11/2013 fixant les conditions sanitaires de transfert et de traçabilité des coquillages vivants] .....	74
<b>Figure 18</b> : Schéma de l'anatomie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (gauche) et de la moule <i>Mytilus edulis</i> (droite) .....	75
<b>Figure 19</b> : Photo de bassin de dépuración d'huîtres .....	77
<b>Figure 20</b> : Influence du niveau de pluviométrie sur la pénétration et le ruissellement de fumier épandu sur le sol (d'après Blaustein <i>et al.</i> , 2016).....	81
<b>Figure 21</b> : Chaîne de contamination des <i>E. coli</i> de la source au coquillage. Identification des facteurs abiotiques (jaune) et biotiques (vert) présents au niveau de chaque compartiment agissant sur la survie des <i>E. coli</i> . STEP : station de dépuración .....	82
<b>Figure 22</b> : Carte présentant le bassin versant de la baie de la Fresnaye (site 1), situé en région Bretagne et la localisation des points de prélèvements sélectionnés pour l'étude. Le nombre de porcs, de bovins, de volailles et d'habitants présents estimés au niveau des quatre sous-bassins versants principaux et du point de prélèvement en mer sont indiqués (source J. Cheve, Ifremer, Dinard).....	90
<b>Figure 23</b> : Carte présentant les deux sites sélectionnés en Région Basse-Normandie : le Havre de Regnéville (site 2) et le Havre de la Vanlée (site 3), avec l'identification des points de prélèvements sélectionnés pour l'étude. Nombre d'habitants (hab.) présents dans les villes alentours.....	92
<b>Figure 24</b> : Organisation du suivi de la cinétique de contamination et de décontamination d'huîtres au contact d'une souche de <i>E. coli</i> ( <i>E. coli</i> stx1 ou <i>E. coli</i> stx2 ou <i>E. coli</i> 1 ou <i>E. coli</i> 2) .....	116
<b>Figure 25</b> : Niveaux moyens des concentrations en <i>E. coli</i> stx1, <i>E. coli</i> 1, <i>E. coli</i> stx2 et <i>E. coli</i> 2 mesurés dans les huîtres au cours des phases de contamination (T0 à T5h) et de décontamination (T5h à T24h). Représentation du seuil de détection de la méthode de numération par impédancemétrie (ligne).....	118
<b>Figure 26</b> : Niveaux moyens des concentrations en <i>E. coli</i> stx1, <i>E. coli</i> 1, <i>E. coli</i> stx2 et <i>E. coli</i> 2 mesurés dans l'eau de mer au cours des phases de contamination (T0 à T5h) et de décontamination (T5h à T24h).....	119
<b>Figure 27</b> : Répartition des souches de <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC) et <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC) et <i>E. coli</i> entérohémorragique (EHEC) isolées à partir des échantillons environnementaux prélevés (coquillage en orange, sédiment en gris, eaux en bleu clair et foncé) entre Février 2013 et Janvier 2015 sur le site 1 : Baie de la Fresnaye (A), le site 2 : Havre de Regnéville et le site 3 : Havre de la Vanlée (B). huîtres :L et F ; moules :G et M et coques :E. eaux de rivière :A, B, C, I, H. sédiments :K et D.....	124

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>Tableau 1</b> : Principaux paramètres influençant la survie des bactéries dans l'environnement (d'après van Elsas <i>et al.</i> , 2011 et Campos <i>et al.</i> , 2013).....	25
<b>Tableau 2</b> : Sélection de génomes séquencés de souches de <i>E. coli</i> commensaux et pathogènes. ....	28
<b>Tableau 3</b> : Description des pathovars de <i>E. coli</i> .....	30
<b>Tableau 4</b> : Mise en évidence des phylogroupes de <i>E. coli</i> en fonction des combinaisons de gènes recherchés.....	34
<b>Tableau 5</b> : Répartition des principaux groupes phylogénétiques de <i>E. coli</i> chez l'Homme, les animaux et dans l'environnement. ....	36
<b>Tableau 6</b> : Classification des sérotypes <i>E. coli</i> en sérotypotypes (d'après Gyles 2007, EFSA 2013) .....	39
<b>Tableau 7</b> : Incidence des variants <i>stx</i> sur l'Homme et détection préférentielle des différents variants des gènes <i>stx1</i> et <i>stx2</i> codant pour les Shiga-toxines. ....	51
<b>Tableau 8</b> : Sélection d'études évaluant la répartition des variants et sous-variants du gène <i>eae</i> (codant l'antigène) sur des souches LEE-positives, au niveau de différentes sources. ....	56
<b>Tableau 9</b> : Sélection d'études révélant le taux de portage des EPEC dans différents réservoirs et proportion de souches EPECa et EPECt isolées .....	63
<b>Tableau 10</b> : Sélections d'études révélant le taux de portage des <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans différents réservoirs et le nombre de souches <i>E. coli</i> entérohémorragiques typiques majeurs (EHEC) isolées. ....	64
<b>Tableau 11</b> : Liste d'épidémies et d'infections liées aux <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC) et aux <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC) et identification de la voie de transmission.....	67
<b>Tableau 12</b> : Réglementation sanitaire microbiologique des eaux intérieures et des eaux côtières et de transition selon la directive 2006/7/CE.....	72
<b>Tableau 13</b> : Facteur de bioaccumulation de l'indicateur de contamination fécale <i>E. coli</i> dans les huîtres et les moules. nd : non déterminé. ....	76
<b>Tableau 14</b> : Concentrations en <i>E. coli</i> présentes au niveau des fèces humaines et de différentes sources urbaines.....	79
<b>Tableau 15</b> : Concentrations en <i>E. coli</i> dans les fèces d'animaux d'élevage (d'après Cox <i>et al.</i> , 2005, Smati <i>et al.</i> , 2015).....	80
<b>Tableau 16</b> : Concentration en <i>E. coli</i> dans les effluents de porcs, de bovins et de volaille .....	80





## **CONTEXTE DE L'ÉTUDE**

Le littoral est un lieu où s'exercent de fortes activités urbaines, agricoles, économiques et touristiques. De ces activités, découle une forte pression sur le milieu qui fragilise ces espaces où les activités humaines sont très variées (conchyliculture, pêche récréative et baignade).

La réduction de la contamination du milieu littoral par des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'Homme est un enjeu sanitaire majeur pour la pérennité de certains usages littoraux tels que la conchyliculture, la pêche à pied ou la baignade.

Les rejets urbains et agricoles chargés en microorganismes d'origine fécale sont susceptibles de contenir des bactéries potentiellement pathogènes pour l'Homme tels que les *Salmonella spp.*, les *Campylobacter spp.*, les *Listeria spp.*, ainsi que des *Escherichia coli* pathogènes (tels que les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines, STEC). Via les rivières, ces bactéries pathogènes peuvent se retrouver en zone littorale et contaminer l'eau de mer et les coquillages filtreurs et fouisseurs qui s'y trouvent (Wilson *et al.*, 1996, Pommeypuy *et al.*, 2004, Westrell *et al.*, 2010).

Les coquillages contaminés sont parfois impliqués dans des Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC). En France, entre 1996 et 2010, parmi les 11 261 TIAC déclarées, 5 % ont été attribuées à la consommation de coquillages contaminés. Les salmonelles ont été mises en cause dans 8 % des TIAC liées aux coquillages, les autres cas étant liés à la présence de norovirus (54 %) (virus entériques), *Staphylococcus aureus* (4 %), *Vibrio parahaemolyticus* (3 %) (bactérie marine), *Clostridium perfringens* (1 %) ou à la présence de toxines et pour 17 % des cas l'agent en cause n'a pas été identifié (Vaillant *et al.*, 2012).

Actuellement en France, très peu d'études sur la présence de bactéries pathogènes dans l'environnement littoral ont été décrites en dehors de la déclaration obligatoire des TIAC liées à la consommation de coquillages.

Le Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie (LSEM), au sein duquel cette thèse a été réalisée, est rattaché au département Ressource Biologie et Environnement (RBE) et à l'unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M), situé sur le site Ifremer de Plouzané (Finistère). Il s'emploie à étudier la présence des pathogènes humains (virus et bactéries) dans les coquillages destinés à la consommation humaine. Le laboratoire étudie également les paramètres environnementaux favorisant les contaminations et travaille sur l'identification de l'origine des sources de contamination par l'utilisation de marqueur de contamination fécale (marqueurs *Bacteroidales*).

Ce travail de thèse a été initié dans le cadre du projet de recherche Riskmanche (Interreg IVA, Septembre 2012 à Mars 2015), dont l'objectif principal était d'acquérir plus de connaissances sur la présence et la diversité de microorganismes potentiellement pathogènes (virus entériques, bactéries entériques et bactéries marines) dans des coquillages et dans des eaux du littoral français et du littoral anglais et sur le risque sanitaire potentiel associé à la présence de ces microorganismes dans l'environnement côtier.

Dans le cadre de ce projet, mon travail de thèse a reposé essentiellement sur la recherche et la caractérisation de souches de *E. coli* pathogènes de type STEC et de *E. coli* entéropathogènes (EPEC) responsables de pathologies digestives (diarrhées aqueuses et colites hémorragiques) ou extra-digestives (Syndrome Hémolytique et Urémique et Purpura Thrombotique Thrombocytopenique).

Naturellement présent au niveau du tube digestif des bovins mais également d'autres animaux à sang chaud, les STEC se retrouvent facilement dans les déjections animales, dans les fumiers, les pâturages, les rivières et les eaux usées urbaines et agricoles. Les EPEC sont préférentiellement retrouvés au niveau du tube digestif de l'Homme mais ils sont aussi détectés au niveau des animaux et sont véhiculés par les eaux usées urbaines, agricoles et environnementales. Situé en aval des zones urbaines et agricoles, le littoral est le réceptacle de nombreuses sources potentielles de contamination pouvant conduire les STEC et les EPEC jusqu'aux coquillages.

Une première étude effectuée de 2002 à 2004, au laboratoire LSEM, avait mis en évidence la présence de STEC dans des coquillages du littoral français (huîtres, moules et coques) (Gourmelon *et al.*, 2006) mais l'effet des apports potentiels de contamination par les bassins versants n'avaient pas été pris en compte et aucune caractérisation approfondie des souches isolées n'avait été faite afin d'évaluer leur pouvoir pathogène.

En ce qui concerne les EPEC, aucune étude, à notre connaissance, ne s'est encore intéressée à leur présence au niveau de l'environnement littoral.

Ces aspects ont été pris en compte dans les actions de recherche menées lors de cette thèse :

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la présence et la diversité des STEC et des EPEC dans l'environnement littoral et les bassins versants en amont, sur une période d'étude donnée, en prenant en considération les données environnementales à différentes périodes de l'année et les données liées aux activités en amont. Pour cela, trois questions ont été posées :

- les STEC et les EPEC sont-ils présents au niveau des compartiments qui constituent l'environnement littoral : coquillages, sédiment, eau de mer et eaux douces présentes au niveau des bassins versants ?

- et si présents, quels types de STEC et de EPEC sont présents au niveau de l'environnement littoral et sont-ils proches de ceux retrouvés en santé humaine ?

Enfin,

- les STEC se comportent-ils de la même manière que les *E. coli* utilisés comme indicateur de contamination fécale dans l'environnement littoral?

Pour répondre à ces questions, trois zones de production conchylicole françaises ont été étudiées mensuellement pendant deux ans. Les souches STEC et EPEC isolées au cours de cette étude ont été caractérisées à l'aide de plusieurs approches culturales, immunologiques et moléculaires. Enfin, des expérimentations en microcosmes d'eau de mer ont été mises en place pour étudier le comportement de souches STEC au niveau de coquillages.

Afin de comprendre les approches expérimentales mises en place pour répondre aux questions posées dans ce travail, la première partie de ce rapport se propose de définir ce que sont les *E. coli* commensaux et pathogènes. La deuxième partie décrit, d'un point de vue épidémiologique, les *E. coli* pathogènes sélectionnés dans ce travail, à savoir les STEC et les EPEC. Enfin, la troisième partie s'emploie à définir la présence des *E. coli* dans l'environnement littoral.



# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---



## I. *ESCHERICHIA COLI* COMMENSAL ET PATHOGENE

### A. Généralités concernant l'espèce *E. coli*

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli*, bactérie isolée à partir de selles de nourrissons, qu'il nomma tout d'abord *Bacterium coli commune*. Ce n'est que 70 ans plus tard que le nom de *Escherichia coli* (*E. coli*) est réellement retenu en hommage aux travaux de T. Escherich (Cowan *et al.*, 1954).

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, appartenant à la classe des  $\gamma$ -protéobactéries. En plus de l'espèce *E. coli*, il existe au sein du genre *Escherichia* cinq autres espèces : *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier. Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). *E. coli* est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -Glu). La majorité des souches fermentent le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157:H7 qui ne fermentent pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre (King *et al.*, 2014) et qui sont dépourvus de l'activité  $\beta$ -Glu. Ces caractéristiques particulières sont utilisées pour sa recherche et son isolement dans l'environnement et l'alimentation (ISO 16654:2001).

*E. coli* constitue une espèce bactérienne sous-dominante du microbiote aérobie-anaérobie facultatif intestinale de l'Homme et des animaux. Cette bactérie représente 80 à 90 % des coliformes thermotolérants ou coliformes fécaux (capables de fermenter le lactose à 44,5°C) qui constituent un sous-groupe des coliformes totaux.

Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Tenailon *et al.*, 2010).

## B. Notion d'habitat primaire et d'habitat secondaire

### Habitat primaire

*E. coli* appartient à la microflore commensale de l'Homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et oiseaux) mais également des reptiles (Gordon et Cowling 2003). Le tractus digestif constitue son habitat primaire. Cette bactérie est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations environ  $> 10^6$  UFC (Unité Formant Colonie)/ g de contenu intestinal (Ducluzeau et Raibaud 1985). *E. coli* se niche plus particulièrement dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif qui constitue une niche écologique propice à son développement de par ses conditions de température, d'humidité et de disponibilité en nutriment. La flore bactérienne intestinale aérobie-anaérobie facultative est représentée par *E. coli* à hauteur de  $7,9 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/ g fèces chez l'Homme, de  $6,9 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/ g de fèces chez les animaux d'élevages (volailles, porc, mouton, vache) et de  $6,2 \pm 0,8 \log_{10}$  UFC/ g de fèces chez les animaux sauvages (sanglier, cerf, lapin) (Smati *et al.*, 2015).

### Habitat secondaire

*E. coli* est rejeté dans l'environnement *via* les fèces à une concentration d'environ  $10^8$  UFC/ g de fèces (Smati *et al.*, 2015). Il se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages.

L'environnement qui dans cette étude correspond à tout ce qui est à l'extérieur de l'hôte, constitue l'habitat secondaire des *E. coli*. Il est contrairement à l'habitat primaire plutôt défavorable à leur survie. Dans l'environnement, la bactérie *E. coli* est soumise à plusieurs types de pression, biotiques (prédation et compétition de flore) et abiotiques (lumière, température, oligotrophie et salinité) (Tableau 1).

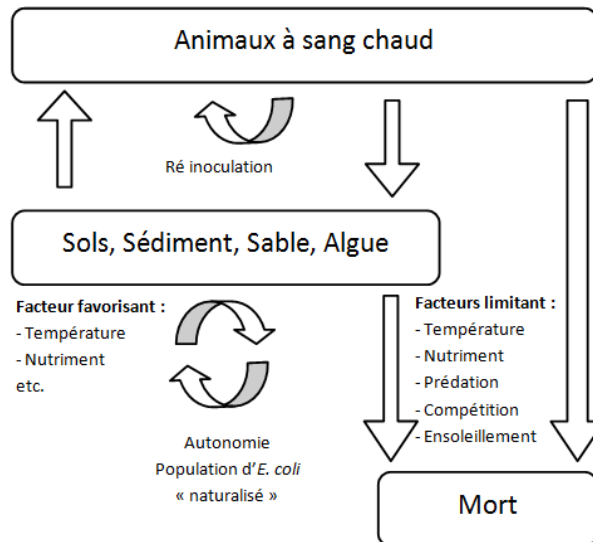
*E. coli* perd plus ou moins rapidement sa capacité à être cultivé sur milieu de culture et par conséquent, ne peut plus être détecté par les méthodes classiques de dénombrement des *E. coli*. Il évolue vers un état viable mais non-cultivable (VNC) (Darcan *et al.*, 2009). Cependant, il peut conserver une certaine activité métabolique (Pommeypuy *et al.*, 1996). Dans des conditions favorables, il peut retrouver sa capacité à se multiplier (Li *et al.*, 2014).



**Tableau 1** : Principaux paramètres influençant la survie des bactéries dans l'environnement (d'après van Elsas *et al.*, 2011 et Campos *et al.*, 2013)

<b>Facteur</b>	<b>Description</b>
<b>Biotique</b>	
<b>Prédation</b>	Bactéries entériques exogènes utilisées comme source de nutriment par les populations indigènes
<b>Compétition</b>	Compétition pour l'accès aux nutriments avec des populations indigènes
<b>Oligotrophie</b>	Accessibilité aux sources en nutriment, sédimentation
<b>Abiotique</b>	
<b>Radiations solaires</b>	Dépendantes des saisons et de la zone géographique. Niveau de pénétration des rayons dans l'eau conditionné par les paramètres de diffusion et d'absorption du fluide
<b>Température</b>	Variation positive ou négative sur la survie de certains microorganismes. Dépendante des saisons
<b>Pluviométrie</b>	Conditionne le taux d'humidité. Impacte les débits des rivières, conduit à la dilution des polluants drainés, participe à la remise en suspension de la matière organique
<b>Texture du sol</b>	Sableux, vaseux, sec, humide, dur ou mou
<b>pH</b>	Milieu acide dû au compostage, à la fermentation ou aux traitements chimiques
<b>Salinité</b>	Responsable du choc osmotique, surtout observé en eau de mer

La population de *E. coli* dans l'habitat secondaire se renouvelle par les apports de bactéries provenant de l'habitat primaire. Une minorité de *E. coli* est capable de coloniser et de persister dans l'environnement hors de son hôte (Walk *et al.*, 2007). Cette population de *E. coli* dite colonisatrice de l'environnement est qualifiée de population naturalisée (Ishii *et al.*, 2006) ou de coliformes du microbiote environnemental (Walk *et al.*, 2007) (Figure 1). Si cette population naturalisée s'établit dans le temps, elle devient une nouvelle communauté microbienne autochtone.



**Figure 1** : Cycle de vie de *E. coli* (d'après Ishii et Sadowski 2008)

Ce processus d'adaptation ou de naturalisation dans l'environnement secondaire a été observé au niveau de coliformes fécaux environnementaux avec l'identification de *E. coli* ayant développé la capacité à produire une capsule pour se protéger des agressions extérieures (Power *et al.*, 2005). La présence importante de gènes associés au mécanisme de formation de biofilms dans des souches de *E. coli* environnementales *versus* les souches fécales suggère également une adaptation des souches de *E. coli* pour une meilleure survie dans l'environnement (Tymensen *et al.*, 2015). De même, pour résister à la pression exercée par le manque d'eau dans certains sols et au choc osmotique provoqué par la présence de sel en eau de mer, les souches de *E. coli* ont développé une capacité à produire des solutés organiques type tréhalose pour résister à la dessiccation et à la salinité (Zhang et Van 2012).

### C. Organisation et dynamique du génome

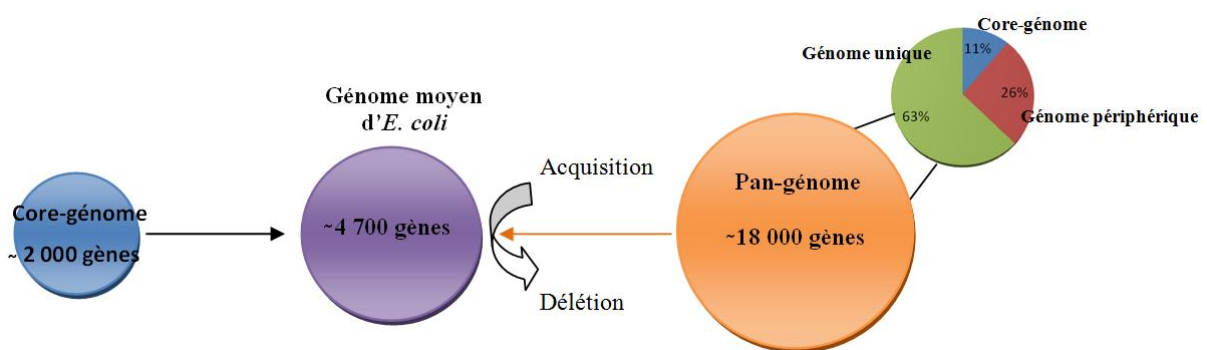
*E. coli* est l'espèce bactérienne la plus étudiée à ce jour. C'est au sein de cette espèce qu'il existe le plus de génomes disponibles, entièrement séquencés et annotés : environ 3 690 génomes de *E. coli* étaient disponibles dans GenBank, en Novembre 2015. *E. coli* K12 MG1655, dont le génome a été totalement séquencé en 1997 (Blattner *et al.*, 1997) est la souche la plus étudiée.

L'ensemble des gènes de l'espèce *E. coli* constitue le pan-génome de cette espèce bactérienne où actuellement plus de 18 000 gènes ont été répertoriés (van Elsas *et al.*, 2011). Le nombre de gènes présent chez *E. coli* varie d'une souche à l'autre en fonction de l'acquisition ou de la délétion de certains gènes. Le pan-génome de *E. coli* se compose de trois parties (Figure 2) :

- **le core-génome** ou le génome universel qui regroupe les gènes communs à toutes les souches, c'est la partie stable du génome. Le core-génome code les fonctions vitales de la cellule et il est considéré comme étant la colonne vertébrale de l'information génétique

nécessaire pour l'accomplissement des fonctions vitales de la cellule (Dobrindt 2005). Cette partie regroupe environ 2 000 gènes et représente environ 11 % du pan-génome de *E. coli*.

- **le génome unique** regroupe les gènes spécifiques à une souche. C'est une partie variable, non commune à toutes les souches, qui code des protéines impliquées dans l'amélioration de la « fitness » de la bactérie (capacité d'ajuster son métabolisme en fonction des conditions environnementales, afin de survivre et de croître), dans des mécanismes de colonisation et d'adaptation de la bactérie aux différentes conditions environnementales rencontrées. Cette partie variable est considérée comme l'information génétique propre à chaque souche. Elle est composée pour une grande majorité de régions ORFs (*Open Reading Frame*) sans fonction évidente et est conditionnée par la présence d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les bactériophages ou les îlots de pathogénicité. Ces éléments sont intégrés dans le chromosome bactérien ou bien répliqués de manière indépendante grâce à la machinerie cellulaire (Dobrindt *et al.*, 2010). Cette partie regroupe environ 63 % du pan-génome.
- **le génome périphérique** ou volatil regroupe l'ensemble des gènes présents uniquement dans un sous-ensemble de souches. Cette partie est utilisée pour distinguer les souches entre elles et elle est notamment porteuse de l'information concernant les sérotypes. La fonction de la plupart des gènes dans cette catégorie est mal connue. Cette partie représente environ 26 % du pan-génome.



**Figure 2** : Représentation de la composition du génome moyen de *E. coli* (d'après van Elsas *et al.*, 2011).

Le génome moyen de *E. coli* varie entre 4 500 et 5 900 kilopaires de base (Kpb) selon qu'il s'agisse d'une souche commensale ou d'une souche pathogène. Plus précisément, la comparaison de 61 génomes de *E. coli* a montré que le nombre de gènes d'une souche pouvait varier de 4 087 pour le plus petit génome, correspondant à une souche commensale, à 5 429, correspondant à une souche pathogène de sérotype O157 :H7 (Lukjancenko *et al.*, 2010) (Tableau 2).

**Tableau 2** : Sélection de génomes séquencés de souches de *E. coli* commensaux et pathogènes.

<b>Souche <i>E. coli</i></b>	<b>Taille (Kpb)</b>	<b>Nombre de gène</b>	<b>Caractéristique</b>	<b>Numéro d'accèsion</b>	<b>Références</b>
<b>BL21 (DE3)</b>	4 557	4 087	<i>E. coli</i> commensal	AM946981	Lukjancenko <i>et al.</i> , 2010
<b>K12 MG1655</b>	4 639	4 149	<i>E. coli</i> commensal	U00096	Blattner <i>et al.</i> , 1997
<b>ONT:H10 101-1</b>	4 979	4 607	EAEC <sup>a</sup>	AAMK00000000	Rasko <i>et al.</i> , 2008
<b>O6 :H31</b>	5 215	4 704	ExPEC <sup>b</sup>	AAJU00000000	Rasko <i>et al.</i> , 2008
<b>O104 :H4</b>	5 270	5 092	Hybride EHEC <sup>c</sup> -EAEC : (épidémie Allemagne)	CP003289	Ahmed <i>et al.</i> , 2012
<b>O148 :H28 B7A</b>	5 300	4 648	EPEC <sup>d</sup>	AAJT00000000	Rasko <i>et al.</i> , 2008
<b>O103 :H2 E22</b>	5 528	5 105	EPEC <sup>e</sup>	AAJV00000000	Rasko <i>et al.</i> , 2008
<b>O157 :H7 Sakai</b>	5 594	5 230	EHEC (épidémie Japon)	BA000007	Hayashi <i>et al.</i> , 2001
<b>O157 :H7 EDL933</b>	5 620	5 312	EHEC (épidémie Etats-Unis)	AE005174	Perna <i>et al.</i> , 2001
<b>O157 :H7 EC4486</b>	5 933	5 429	EHEC	ABHS00000000	Lukjancenko <i>et al.</i> , 2010

<sup>a</sup>EAEC : *E. coli* entéroagréatif ; <sup>b</sup>ExPEC : *E. coli* extra-intestinaux ; <sup>c</sup>EHEC : *E. coli* entérohémorragique ; <sup>d</sup>EPEC : *E. coli* entérotoxigène ; <sup>e</sup>EPEC : *E. coli* entérotoxigène.

Le séquençage de nouveaux génomes de *E. coli* permet de mettre en évidence de nouvelles séquences caractéristiques de *E. coli* pathogènes ou naturalisés très utiles pour une meilleure connaissance des différents profils que cette bactérie peut avoir.

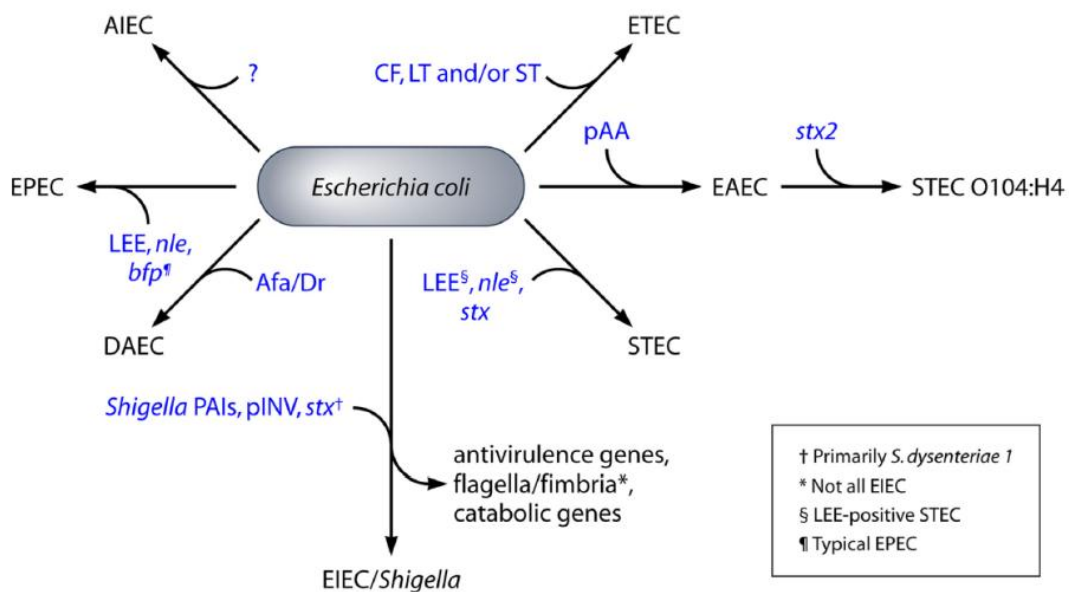
#### **D. *E. coli* pathogène : définition des pathovars**

Les souches de *E. coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires et d'induire des dommages cellulaires. L'étude des différents modes d'interactions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches de *E. coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), responsables d'infections urinaires, de méningites chez les nouveaux-nés ou de septicémies et les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies entériques (Dobrindt *et al.*, 2003, Dobrindt 2005, Kern Benaibout 2006).

Au sein de ces pathotypes, il existe une classification basée sur le phénotype de virulence de chaque souche prenant en considération les facteurs de virulence, l'environnement colonisé, les caractéristiques d'invasion et les pathologies induites (Müller *et al.*, 2007, Croxen *et al.*, 2013). Cette

classification permet de classer les *E. coli* intestinaux en plusieurs variants pathogènes appelés « pathovars » : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC ou EAEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) (Tableau 3).

*E. coli* peut devenir pathogène par l'acquisition, la délétion ou l'inactivation de certains éléments génétiques mobiles (transposon, phage, plasmide, etc.). A titre d'exemple, les STEC sont des *E. coli* ayant acquis, par un bactériophage, des gènes codant pour une toxine (la Shiga-toxine) (Figure 3).



**Figure 3 :** Vue d'ensemble des phénomènes d'acquisition et de délétion de gènes chez *E. coli* appartenant aux différents pathovars (d'après Croxen *et al.*, 2013).

**Tableau 3** : Description des pathovars de *E. coli*

Pathovars	Hôtes	Sites de colonisation	Maladie	Réservoirs et sources	Traitements	Adhésion	Marqueurs génétiques	Sérotypes ou sérogroupes majeurs	Références
<b>EPECt</b> <i>E. coli</i> entéropathogène typique				Humain	Réhydratation, antibiotique en cas de persistance des symptômes	Attachement et effacement	<i>eae, bfp</i>	O55 :[H6] <sup>b</sup> , O86 :H34 , O111 :[H2], O114 :H2, O119 :[H6], O127 :H6, O142 :H6, O142 :H34	Trabulsi <i>et al.</i> , 2002, Afset <i>et al.</i> , 2003, Chen et Frankel 2005, Varela <i>et al.</i> , 2015
<b>EPECa</b> <i>E. coli</i> entéropathogène atypique	Enfant < 5 ans, adulte	Intestin grêle	Diarrhée aqueuse abondante	Humain, animal			<i>eae</i> , absence de <i>bfp</i>	O26 :[H11], O55 :[H7], O55 :H34, O86 :H8, O111 :[H8], O111 :[H9], O111 :H25, O119 :H2, O125 :H6, O128 :H2	
<b>EHEC (STEC)</b> <i>E. coli</i> entérohémorragi que	Adulte, enfant	Iléon distal, colon	Diarrhée aqueuse, colite hémorragique, SHU	Humain, animal, aliment, eau	Hydratation, traitement symptomatique	Attachement et effacement <sup>a</sup>	<i>stx, eae</i> (présence ou absence selon les souches)	O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157, O91	Croxen <i>et al.</i> , 2013, Beutin et Fach 2014
<b>EIEC/Shigella</b> <i>E. coli</i>	Enfant < 5 ans, adulte,	Colon	Shigellose/dysen- terie bacillaire,	Humain, animal,	Réhydratation, antibiotique	Absence (invasif)	<i>ipaH, ial, stx</i>	O28, O29, O112, O124, O136, O143,	Van den Beld et Reubsæet 2012, Schroeder et Hilbi

<b>entéroinvasif</b>	voyageurs,  Patients immuno-déprimé		potentiel SHU	aliment, eau				O144, O152, O159, O164, O167 (HNM)	2008
<b>EAEC</b> <i>E. coli</i> <b>entéroagréatif</b>	Adulte  Enfant	Intestin grêle et/ou colon	Diarrhée du voyageur, SHU ( <i>stx</i> <sup>+</sup> )  Diarrhée persistante	Aliment, Adulte occasionnellement	Réhydratation, antibiotique  Réhydratation, antibiotique, potentiel probiotique	Formation en briques empilées et/ou invasif	<i>aggA, aggR, aap pic, pAA</i>	O3, O15, O44, O86, O77, O111, O127	Huang <i>et al.</i> , 2006, Harrington <i>et al.</i> , 2006, Johnson et Nolan 2009
<b>ETEC</b> <i>E. coli</i> <b>entérotoxigène</b>	Patient immuno-déprimé, enfant < 5 ans, voyageurs	Intestin grêle	Diarrhée aqueuse et persistante	Aliment, eau, humain, animal	Fluoroquinolones, Réhydratation, antibiotique	Facteur de colonisation (FC)	CF, LT, STa	O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159, O173	Qadri <i>et al.</i> , 2005
<b>DAEC</b> <i>E. coli</i> <b>adhérence diffuse</b>	Enfant (cas plus sévères entre 18 mois et 5 ans),  Adulte	Intestin (localisation incertaine)	Diarrhée aqueuse abondante  Peut contribuer au développement de la maladie de Crohn	inconnu	Réhydratation	Adhésion diffuse et/ou invasive	Gène de l'opéron <i>dra</i> (Afa/Dr)	O1, O4, O6, O17, O75, O77	Servin 2014

<b>AIEC</b>  <b><i>E. coli</i> à adhérence invasive</b>	Adulte et enfant	Intestin grêle	Maladie de Crohn	inconnu	Antibiotique, intervention chirurgicale	Absence (invasif)	Non identifié	O2, O6	Nash <i>et al.</i> , 2010
---	------------------	----------------	------------------	---------	---	-------------------	---------------	--------	---------------------------

<sup>a</sup> seulement pour les STEC LEE-positifs, pas pour les STEC LEE-négatifs

<sup>b</sup> : antigène H parfois absent ou non exprimé

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

*eae* : *E. coli attaching and effacing*

*bfp* : *bundle-forming pilus*

*stx* : *shiga-toxin*

*ipaH* : *invasion plasmid antigen H*

*ial* : *invasion-associated locus*

*aggA*, *aggR* : *AraC-like transcriptional activator A/R*

*aap* : *accumulation-associated protein*

*pic* : *serine protease*

*paa* : *virulence plasmid*

CF : *colonisation factor*

LT : *heat-labile toxin*

ST : *heat-stable toxin*

Afa/Dr : famille « *Dr blood group antigen adhesin* »



*E. coli* est une espèce bactérienne avec un génome présentant une forte plasticité conduisant, par exemple, à l'apparition de nouveaux pathovars. Récemment, une souche hybride EAEC et STEC a été isolée chez des patients en 2011, en Allemagne (Frank *et al.*, 2011) et en France (King *et al.*, 2012). L'importante épidémie en Allemagne a touché 4 321 personnes dont 900 patients qui ont développé un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) et a causé plus de 50 décès (Frank *et al.*, 2011). Cette souche a été identifiée comme étant un *E. coli* de sérotype O104:H4, possédant les gènes caractéristiques des EAEC (gènes *aggA*, *aggR*, *pic* et *aap*) et celui codant pour la Shiga-toxine de type 2 typique des STEC (gène *stx2*), faisant apparaître un nouveau pathovar dénommé *E. coli* entéro-agrégant-hémorragique, EAHEC (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011). D'autres souches de *E. coli* hybrides EAHEC ont également été décrites dans d'autres études : *E. coli* de sérotype O111:H2 en France (Morabito *et al.*, 1998) et *E. coli* de sérotype O111:H21 en Irlande (Dallman *et al.*, 2012). Récemment, d'autres souches de *E. coli* hybrides ont été recensées ; trois souches de *E. coli* (hybride STEC/EPEC) de sérotypes O101:H33, O2:H25 et O2:H27, possédant les gènes codant la Shiga-toxine des STEC et une toxine ST (*heat-stable toxin*) caractéristique des EPEC (Nyholm *et al.*, 2015), une souche de *E. coli* (hybride EPEC/EPEC) possédant le gène *eae* des EPEC et le gène codant la toxine LT (*heat-labile toxin*) caractéristique des EPEC (Dutta *et al.*, 2015) et enfin une souche de *E. coli* de sérotype O80:H2 possédant à la fois des caractéristiques des *E. coli* ExPEC et des STEC (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2014).

## **E. *E. coli* commensal et pathogène : notion de classification**

Malgré la diversité des génomes de *E. coli* et les nombreuses variations dues aux phénomènes d'acquisition et de délétion de gènes, plusieurs approches moléculaires ont permis d'élaborer une signature génétique permettant de classer l'espèce *E. coli* indépendamment des notions de *E. coli* commensal et pathogène.

### **1. Classification selon le sérotype**

Comme toutes les autres entérobactéries, *E. coli* possède trois antigènes majeurs. L'antigène somatique O (Ag O) est un composant du lipopolysaccharide qui entre dans la composition de la membrane externe des bacilles Gram négatif. Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le cluster de gènes *rfb*. L'antigène flagellaire H (AgH) est de nature protéique et entre dans la construction du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. Il est généralement codé par le gène *fliC*. Cependant, certaines souches perdent leur mobilité et sont classées comme non mobiles (NM ou H-). L'antigène capsulaire K (Ag K) est une protéine de surface. La méthode généralement utilisée pour la classification des *E. coli* par sérotypage est basée sur le schéma décrit par Kauffmann (1947), qui associe ces différents antigènes transmis verticalement par les *E. coli* à la génération suivante (Nataro et Kaper 1998).

La méthode immunologique de typage par agglutination sur lame à l'aide d'immunsérums spécifiques est un moyen rapide mais non exhaustif de typer les souches (Guinée *et al.*, 1981). La détection par biologie moléculaire des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AgO (*wzx* et *wzy*) et du gène *fliC* pour l'AgH est un autre moyen d'identifier le sérotype des souches. Selon ce schéma de classification, il existerait plus de 174 sérogroupes O, 80 sérogroupes K et 56 sérogroupes H différents avec plus de 9 000 combinaisons possibles (Karmali *et al.*, 2010).

## 2. Classification selon les phylogroupes

Un phylogroupe se définit par l'étude phylogénétique qui s'intéresse à la classification des individus en groupes selon l'identification de critères moléculaires communs. En 1984, les travaux d'Ochman et Selander ont permis de répartir les souches de *E. coli* en quatre grands groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) par l'analyse du polymorphisme électrophorétique de 11 enzymes métaboliques de 2 600 souches isolées chez l'Homme et des animaux et provenant des différents continents (Ochman et Selander 1984). Ces travaux ont été confirmés par la suite avec des techniques de génotypage comme le ribotypage puis affinés par Multi-Locus Sequence Typing (MLST) et le séquençage génomique de nombreuses souches mettant en évidence la présence des quatre groupes phylogénétiques majeurs A, B1, B2 et D précédemment décrits ainsi que trois groupes mineurs nommés C, E et F. (Jauregui *et al.*, 2008, Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Cette classification ne cesse de s'affiner avec l'apparition de nouveaux sous-phylogroupes (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>22</sub>, B<sub>23</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>) (Smati *et al.*, 2013) et de clades ou branches (clades I à V) (Clermont *et al.*, 2011, Clermont *et al.*, 2013) (Tableau 4).

**Tableau 4** : Mise en évidence des phylogroupes de *E. coli* en fonction des combinaisons de gènes recherchés.

Phylogroupes	Méthodes	Gènes cibles	Références
<b>A, B1, B2 et D</b>	PCR	<i>chuA</i> <sup>a</sup> , <i>yjaA</i> <sup>b</sup> fragment d'ADN TSPE4.C2 <sup>c</sup>	Clermont <i>et al.</i> , 2000
<b>A, B1, B2, D, E et F</b>	PCR	<i>chuA</i> <sup>a</sup> , <i>yjaA</i> <sup>b</sup> fragment d'ADN TSPE4.C2 <sup>c</sup> , <i>arpA</i> <sup>d</sup>	Clermont <i>et al.</i> , 2013
<b>Clades I à V</b>			
<b>A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>22</sub>, B<sub>23</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub></b>	PCR	<i>chuA</i> <sup>a</sup> , <i>yjaA</i> <sup>b</sup> fragment d'ADN TSPE4.C2 <sup>c</sup>	Smati <i>et al.</i> , 2013
<b>A, B1, B2, C, E et D</b>	Typage moléculaire /Séquençage	<i>trpA</i> <sup>e</sup> , <i>trpB</i> <sup>e</sup> , <i>pabB</i> <sup>f</sup> , <i>putP</i> <sup>g</sup> , <i>icd</i> <sup>h</sup> , <i>polB</i> <sup>i</sup>	Escobar-Páramo <i>et al.</i> , 2004

<sup>a</sup> codant une protéine impliquée dans le transport de l'hème, <sup>b</sup> codant une protéine de fonction inconnue, <sup>c</sup> codant une lipase estérase, <sup>d</sup> codant une protéine régulatrice, <sup>e</sup> gène de l'opéron tryptophane, <sup>f</sup> codant une p-aminobenzoate synthase, <sup>g</sup> codant une proline perméase, <sup>h</sup> codant une isocitrate déshydrogénase, <sup>i</sup> codant la polymérase Pol II.

La prévalence et la répartition des *E. coli* appartenant aux phylogroupes principaux A, B1, B2 et D chez les mammifères est conditionnée par les caractéristiques de l'hôte (alimentation, morphologie du tube digestif et masse corporelle) et par les facteurs environnementaux (climat et géo-localisation) (Tenaillon *et al.*, 2010).

A partir des études recensées dans le Tableau 5, l'étude de Gordon *et al.*, en 2015 qui porte sur un nombre plus élevé de souches de *E. coli* que les autres, a mis en évidence une majorité de souches de phylogroupe B2 chez l'Homme. En parallèle, la revue de plusieurs études réalisée par Tenaillon *et al.*, en 2010 a également mis en évidence une prévalence plus marquée des phylogroupes B2 et A chez l'Homme.

Chez les animaux, les phylogroupes B1 et A sont les plus souvent retrouvés au sein du tube digestif des animaux qu'ils soient d'élevage (bovins, porcs, volaille, chèvres, moutons) ou sauvages (oiseaux, sangliers, mouflons) comme il avait déjà été démontré dans l'étude de Escobar-Paramo *et al.*, en 2006.

Dans l'environnement (eau, effluents et sols), les phylogroupes B1 et A semblent être les plus fréquemment retrouvés.

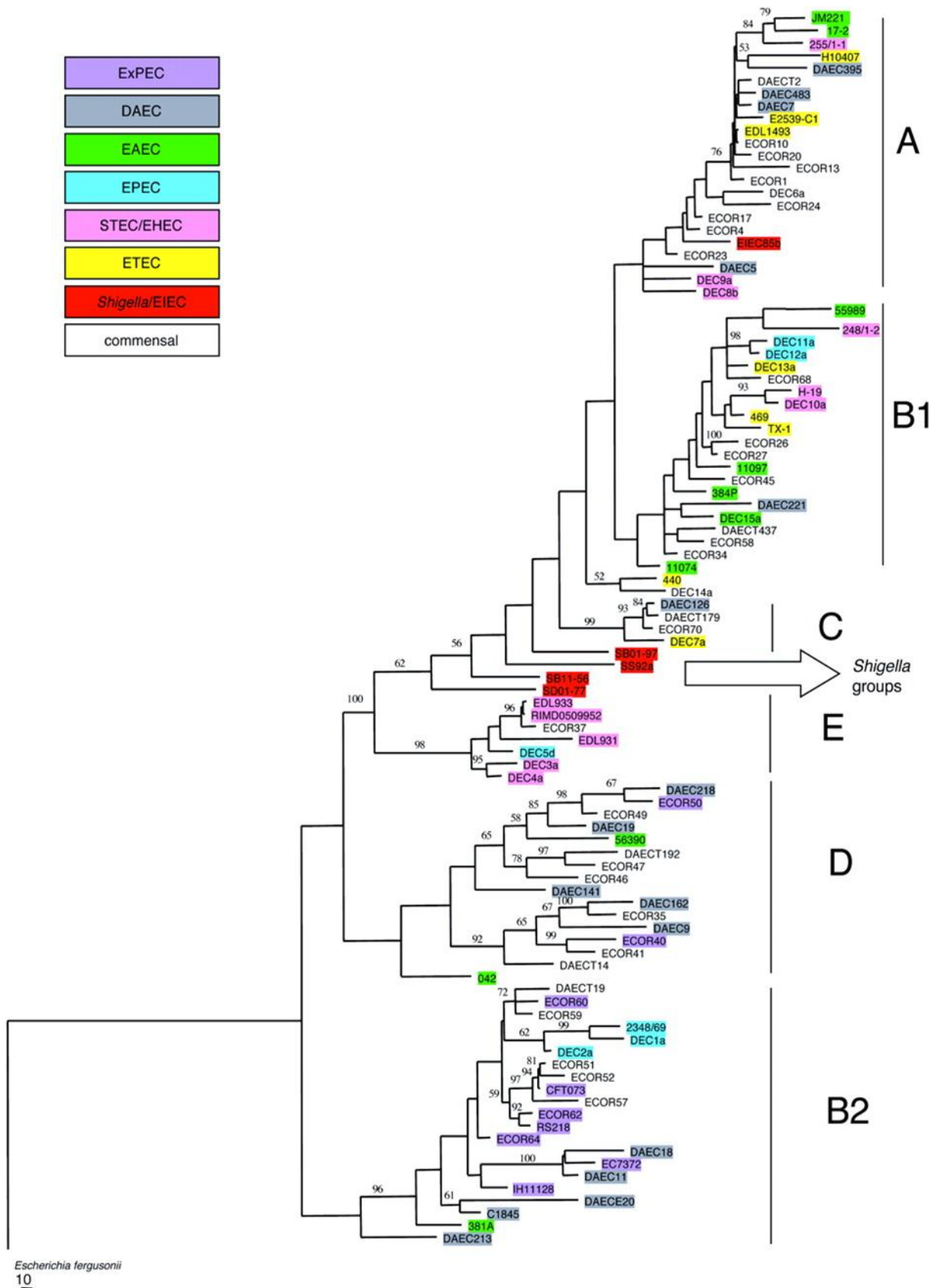
L'analyse de l'arbre phylogénétique obtenu lors de l'étude de Escobar-Paramo *et al.*, en 2004 a permis de mettre en évidence la répartition de différents types de *E. coli* commensaux et pathogènes. Dans cette étude, 98 souches de *E. coli* (10 EAEC, 16 DAEC, 11 STEC dont 9 EHEC, 6 EPEC, 8 ETEC, 9 ExPEC, 5 *Shigella*/ETEC et des souches de *E. coli* commensales) ont été analysées par la méthode de typage moléculaire par séquençage des six gènes chromosomiques de ménage *trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd* et *polB* (Figure 4).

Selon cette étude, les *E. coli* commensaux semblent faire partie préférentiellement du phylogroupe A. Les souches virulentes de *E. coli* responsables d'infection extra-intestinales (ExPEC) semblent majoritairement associées au phylogroupe B2 et en minorité au phylogroupe D. Les souches responsables de diarrhées chroniques légères telles que les EPEC ne semblent pas être classées spécifiquement parmi un phylogroupe bien que certaines études les associent préférentiellement au phylogroupe B1 (Reid *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2013). Les *E. coli* pathogènes producteurs de toxines comme les EHEC se répartissent préférentiellement entre les phylogroupes A et B1, ce qui est également soutenu par deux études récentes (Badouei *et al.*, 2015, Martins *et al.*, 2015). Toutefois, certaines de ces souches telles que celles de sérotype O157:H7 appartiennent au phylogroupe E (Girardeau *et al.*, 2005).

**Tableau 5** : Répartition des principaux groupes phylogénétiques de *E. coli* chez l'Homme, les animaux et dans l'environnement.

Catégories	Genres	Nombre de souches <i>E. coli</i>	Répartition (%)					Phylogroupes dominants	Pays	Références
			A	B1	B2	D	autres			
<b>Homme</b>	Homme	4 957	8,1	13,9	47	23,5	7,5	<b>B2</b>	Australie	Gordon <i>et al.</i> , 2015
	Homme	94	40,4	8,5	12,8	38,3	0	<b>A/D</b>	Brésil	Carlos <i>et al.</i> , 2010
	Homme	98	31	13	33	21	2	<b>A/B2</b>	France	Smati <i>et al.</i> , 2013
<b>Animaux d'élevage</b>	Bovin	50	28	58	0	14	0	<b>B1</b>	Brésil	Carlos <i>et al.</i> , 2010
	Bovin	13	46,2	38,5	0	7,7	7,6	<b>A</b>	Iran	Badouei <i>et al.</i> , 2015
	Porc	39	53,8	23,1	5,1	17,9	0	<b>A</b>	Brésil	Carlos <i>et al.</i> , 2010
	Chèvre	16	18,8	81,3	0	0	0	<b>B1</b>	Brésil	Carlos <i>et al.</i> , 2010
	Chèvre	12	0	100	0	0	0	<b>B1</b>	Japon	Ishii <i>et al.</i> , 2007
	Mouton	130	5,7	90	0	4,3	0	<b>B1</b>	Brésil	Martins <i>et al.</i> , 2015
	Mouton	18	11,1	88,9	0	0	0	<b>B1</b>	Iran	Badouei <i>et al.</i> , 2015
	Mouton	29	13,8	68,7	0	17,5	0	<b>B1</b>	Brésil	Carlos <i>et al.</i> , 2010
	Volaille	13	76,9	15,4	7,7	0	0	<b>A</b>	Brésil	Carlos <i>et al.</i> , 2010
	Volaille	363	53,1	19,3	4,4	23,1	0	<b>A</b>	Italie	Pasquali <i>et al.</i> , 2015
<b>Animaux sauvages</b>	Oiseau	134	8,2	49,2	22,3	20,3	0	<b>B1</b>	Australie	Gordon et Cowling 2003
	Oiseau	237	17,5	40	17,9	6,9	17,7	<b>B1</b>	Australie	Blyton <i>et al.</i> , 2015
	Buse	36	47,2	8,3	13,9	30,5	0	<b>A/D</b>	Portugal	Radhouani <i>et al.</i> , 2012

	Renard	22	31	18,2	9,1	41	0	<b>A/D</b>	Portugal	Radhouani <i>et al.</i> , 2013
<b>Animaux aquatiques</b>	Poisson	12	0	91,7	8,3	0	0	<b>B1</b>	Australie	Gordon et Cowling 2003
<b>Batraciens</b>	Grenouille	13	7,7	84,6	0	7,7	0	<b>B1</b>	Australie	Gordon et Cowling 2003
<b>Reptiles</b>	Serpent/Lézard	33	15,1	69,7	6,1	9,1	0	<b>B1</b>	Australie	Gordon et Cowling 2003
<b>Environnement</b>	Sols amendés	85	35,3	49,4	3,5	11,7	0	<b>A/B1</b>	Angleterre	Holden <i>et al.</i> , 2014
	Effluents	62	46,7	46,7	1,61	4,8	0	<b>A/B1</b>	Espagne	Garcia-Aljaro <i>et al.</i> , 2009
	Eaux d'estuaire	120	57	22,9	14,3	5,8	0	<b>B1</b>	Italie	Perini <i>et al.</i> , 2015
	Eaux de mer	875	3,2	70,5	25	1,3	0	<b>B1</b>	Etats-Unis	Hamilton <i>et al.</i> , 2010



**Figure 4** : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse simultanée de six gènes chromosomiques de ménage (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd* et *polB*) utilisant la méthode de parcimonie (méthode statistique non-paramétrique) sur une collection de 98 souches commensales et pathogènes de *E. coli*/*Shigella*, enraciné avec une souche *E. fergusonii* (Escobar-Paramo *et al.*, 2004).

### 3. Classification selon les séropathotypes

Pour les souches de *E. coli* pathogènes appartenant au pathovar des STEC, en considérant leur niveau de pathogénicité chez l'Homme, les sérotypes ont pu être classés en séropathotypes basés sur leur fréquence d'association avec des infections humaines et leurs implications dans des épidémies ou de graves complications. En 2003, Karmali *et al.*, ont proposé de classer les sérotypes majeurs en cinq séropathotypes, de A à E ; soit du séropathotype A correspondant aux sérotypes les plus virulents, tel que l'O157 :H7, au séropathotype E représentant l'ensemble des sérotypes de *E. coli* non associés à des maladies humaines (Tableau 6).

**Tableau 6** : Classification des sérotypes *E. coli* en séropathotypes (d'après Gyles 2007, EFSA 2013)

Séropathotypes	Sérotypes	Fréquence (association avec une infection)	Implication (responsable d'épidémie)	Association avec SHU <sup>a</sup> et CH <sup>b</sup>
<b>A</b>	O157 :H7, O157 :HNM	Importante	Souvent	+
<b>B</b>	O26 :H11, O103 :H2, O111:HNM, O121:H19, O145:HNM	Modérée	Peu souvent	+
<b>C</b>	O5 :HNM, O91 :H21, O104 :H21, O113 :H21, O121:HNM, O165:H25	Faible	Rare	+
<b>D</b>	O7 :H4, O69 :H11, O103 :H25, O113 :H4, O117 :H7, O119:H25, O132:HNM, O146 :H21, O171 :H2, O172 :HNM, O174 :H8	Faible	Rare	-
<b>E</b>	O6 :H34, O8 :H19, O39 :H49, O46 :H38, O76 :H7, O84:HNM, O88:H25, O98 :H25, O113 :HNM, O136 :HNM, O143 :H31, O156 :HNM, O163 :HNM	Non impliqué	Non impliqué	-

<sup>a</sup>SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique, <sup>b</sup>CH : Colites Hémorragiques

Plusieurs observations récentes remettent en cause cette classification basée sur la fréquence des sérotypes responsables d'infection, leur association avec des épidémies et la sévérité des symptômes engendrés. Les critiques exposées dans un récent rapport publié par l'EFSA (2013) (*European Food Safety Authority*) montrent que ce système de classification ne semble pas refléter la réalité puisque des sérotypes du séropathotype D (O84, O113, O153, O156) ont été recensés par l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) comme responsables d'infection chez l'Homme.

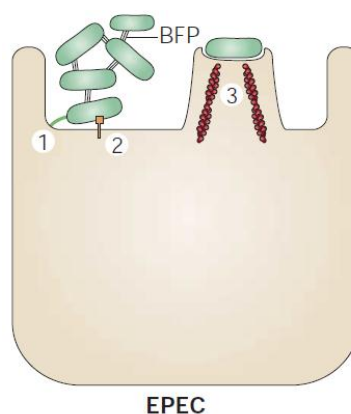
Scheutz (2014) a suggéré récemment de réviser cette classification en se basant sur le phénotype ou le typage moléculaire pour définir les groupes.

## II. *E. COLI* ENTEROPATHOGENE (EPEC) ET *E. COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)

### A. Présentation des EPEC

Les *E. coli* entéropathogènes sont caractérisés par une adhésion spécifique entre la cellule bactérienne et la surface de l'entérocyte. Ils sont regroupés sous le terme d'AEEC pour *Attaching and Effacing E. coli*, quels que soient les signes cliniques associés. D'un point de vue histopathologique, les symptômes liés aux infections dues aux AEEC sont associés à des lésions caractéristiques des cellules de la muqueuse intestinale. Ces lésions sont engendrées par le mécanisme d'attachement et d'effacement (A/E) caractérisé par une adhésion intime des bactéries aux entérocytes et à l'effacement des microvillosités intestinales (Nataro et Kaper 1998).

Cette adhésion s'effectue en deux temps : initialement, une pré-adhésion dite localisée s'effectue par l'intermédiaire de *fimbriae* de type IV que sont les *pili* BFP (Bundle Forming Pili). Les gènes *bfpA* codant ces *pili* sont situés sur le plasmide EAF (*EPC adhesion factor* ; pEAF). Puis cette adhésion est suivie d'une fixation étroite de la bactérie à la bordure en brosse des entérocytes, s'accompagnant d'une destruction de celle-ci sans invasion cellulaire. Cette étape est associée aux produits de différents gènes situés sur un locus chromosomique appelé le LEE (*locus of enterocyte effacement*) et plus particulièrement grâce au gène *eae* codant une protéine de la membrane externe de 94 kDalton, l'antigène intimine. L'expression des différents gènes du LEE aboutit à la polymérisation de filaments d'actine entraînant la formation d'un piédestal sur lequel viennent adhérer les bactéries de façon étroite (McDaniel *et al.*, 1995, Garmendia *et al.*, 2005) (Figure 5). L'acquisition simultanée du pEAF et du LEE est indépendante.



**Figure 5** : Adhésion des EPEC typiques aux entérocytes caractérisée par le développement des lésions d'attachement et d'effacement. 1. Adhésion initiale due aux *pili* BFP, 2. Fixation étroite de la bactérie due à la sécrétion des protéines codées par le LEE, 3. Formation du piédestal par la polymérisation de filaments d'actine. BFP : *bundle-forming pilus*. (d'après Kaper *et al.*, 2004).



Au sein des EPEC, il existe deux sous-groupes ; d'une part, les EPEC dits typiques (**EPECT**) possédant les *pili* BFP permettent l'adhésion initiale aux entérocytes, d'autre part, les EPEC dits atypiques (**EPECa**) qui ne possèdent pas ce plasmide EAF. Les EPECa peuvent disposer d'autres facteurs responsables de cette pré-adhésion tels que les facteurs LAL (*localized adherence-like*) (Rodrigues *et al.*, 1996), DA (*diffuse-adherence*) ou AA (*aggregative adherence*) (Trabulsi *et al.*, 2002).

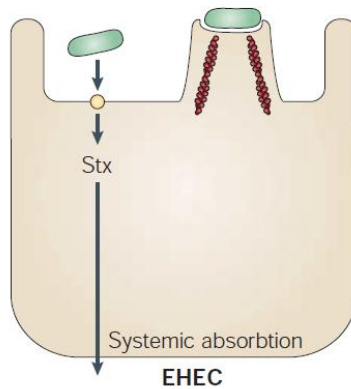
Douze sérogroupes O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 et O158 ont été reconnus comme étant le plus souvent associés aux EPEC responsables de diarrhées chez l'Homme par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (Schmidt 2010). Les EPEC sont le plus souvent associés à des épidémies de diarrhées dans les pays en voie de développement et à des cas sporadiques dans les pays développés (Trabulsi *et al.*, 2002). Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que l'incidence des EPECa est plus marquée que celle des EPECT : 41 cas associés à des souches EPECa et aucune EPECT au Japon (Yatsuyanagi *et al.*, 2003), 58 associés à des souches EPECa et un cas à une souche EPECT en Norvège (Afset *et al.*, 2004), 12 cas associés à des souches EPECa et un cas à une souche EPECT au Brésil (Franzolin *et al.*, 2005), 42 cas associés à des souches EPECa et aucun à une souche EPECT au Brésil (Araujo *et al.*, 2007).

Une méta-analyse sur l'étiologie des diarrhées en pédiatries (266 études publiées entre 1996 et 2002), montre que les EPEC sont encore identifiés parmi les agents pathogènes importants (Ochoa et Contreras 2011).

## **B. Présentation des STEC**

Les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines sont principalement définis par leur capacité à produire des toxines (Stx) appelées *Shiga-like toxin* ou Shiga-toxines. Deux familles de Stx ont pu être identifiées : les Stx de type 1 très proches de la Shiga-toxine produite par *Shigella dysenteriae* sérotype 1 et les Stx de type 2 qui présentent moins de 60 % d'homologie avec la séquence en acides aminés des Stx1 (Strockbine *et al.*, 1986, Karch *et al.*, 2005).

D'autre part, une partie des STEC sont capables de produire des lésions A/E lorsque l'adhésin LEE est présent et de former un piédestal de la même façon que les EPEC (Figure 6).



**Figure 6** : Adhérence des STEC aux entérocytes caractérisée par le développement des lésions d'attachement et d'effacement, puis d'un piédestal et la production de Shiga-toxines (Stx). (d'après Kaper *et al.*, 2004).

Si tous les STEC ne sont pas pathogènes pour l'Homme, un sous-groupe de souches dénommées *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables des infections humaines les plus graves.

Les EHEC typiques (**EHECt**) représentent le groupe des STEC Stx-LEE-positifs, ayant la capacité à la fois de produire des lésions A/E et d'induire des lésions au niveau de l'endothélium vasculaire intestinal, rénal et cérébral de l'Homme, sous l'action des Shiga-toxines. Le LEE joue un rôle important dans la colonisation et la destruction de la muqueuse intestinale par l'intermédiaire du gène *eae*. Les souches EHEC dépourvues de LEE sont dites atypiques (**EHECa**). Les souches EHECa utilisent d'autres moyens d'adhérer à la membrane des entérocytes par l'intermédiaire par exemple des facteurs : Iha (IrgA homologue adhésin) (Tarr *et al.*, 2000), Lpf (long polar fimbriae) (Doughty *et al.*, 2002) ou Saa (STE/C autoagglutinating adhesine) (Paton *et al.*, 2001).

Plus de 400 sérotypes différents appartenant au pathovar des STEC ont été isolés chez l'Homme et les animaux mais seul un petit nombre de sérotypes est réellement lié à des pathologies humaines. Les plus connus font partie des sérotypotypes A, B et C décrits plus haut, soit les O26, O157, O111, O103, O145 (Nguyen et Sperandio 2012, Croxen *et al.*, 2013).

Le sérotype le plus incriminé dans les infections à STEC est le sérotype O157:H7. En Europe, en 2012, il a été responsable de 34 % des cas d'infections (ECDC 2014).

En France depuis 2002, l'O157:H7 a été responsable de la moitié des épidémies recensées :

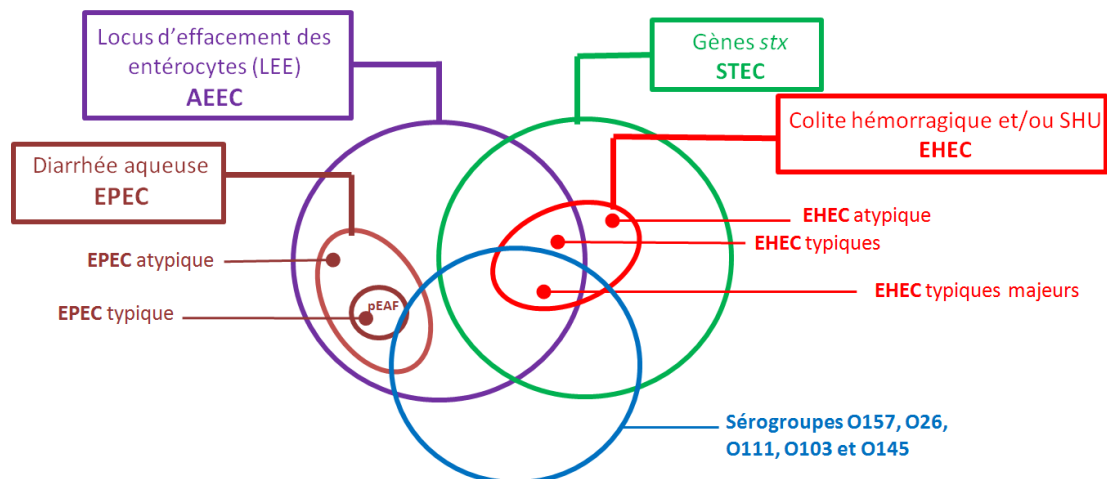
- sérotype O148:H8, 11 cas, viande de mouton en 2002 (Espié *et al.*, 2006a)
- sérotype O157:H7, 3 cas, fromage au lait cru de chèvre, en 2004 (Espié *et al.*, 2006b)
- sérotype O157:H7, 69 cas, viande hachée de bœuf congelée, en 2005 (King *et al.*, 2009)
- sérotype O26:H11/O80:H2, 16 cas, camembert en 2005 (Espié *et al.*, 2008)
- sérotype O123:HNM, 2 cas, hamburger en 2009 (King *et al.*, 2010)
- sérotype O104:H4, 15 cas, germes de fenugrec en 2011 (King *et al.*, 2012)

- sérotype O157:H-/O177:H25, 18 cas, viande hachée de bœuf congelée en 2011 (King *et al.*, 2012)
- sérotype O157:H7, 6 cas, viande hachée de bœuf fraîche en 2012 (Barret *et al.*, 2012)

La grande majorité des cas cliniques graves chez l'Homme sont dus à un petit nombre de sérotypes (Farrokh *et al.*, 2013, Beutin et Fach 2014). Aux Etats-Unis, les souches **EHECt** dites **majeurs** appartiennent aux sérogroupes O26, O45, O103, O111, O121, O145 et O157 (USDA 2014). En Europe, les EHECt majeurs appartiennent aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 (EFSA 2013).

Pour mieux comprendre la relation existante entre les STEC et les EPEC le schéma présenté en Figure 7, propose un système de classification où :

- toutes les souches possédant le LEE, incluant le gène *eae*, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des AEEC
- toutes les souches possédant les gènes codant pour les toxines Stx, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC
- toutes les EHEC sont des STEC mais toutes les souches STEC ne sont pas responsables de pathologies humaines
- les EHEC possédant le LEE sont dénommées EHEC typiques et les EHEC-LEE négatifs sont dénommées des EHEC atypiques
- les souches EHEC typiques majeures, les plus souvent associées à des signes cliniques graves et aux épidémies appartiennent aux sérogroupes O157, O26, O103, O111, et O145



**Figure 7 :** Système de classification des AEEC/EPECt/EPECa/STEC/EHEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches de *E. coli*. EPEC: enteropathogenic *E. coli*. EHEC: enterohaemorrhagic *E. coli*. STEC: Shiga toxin-producing *E. coli*. AEEC: Attaching and effacing *E. coli*. LEE: Locus of enterocyte effacement. pEAF : plasmid EPEC adhesion factor. *stx* : Shiga-toxin gene. SHU: Syndrome Hémolytique et Urémique (d'après Naylor *et al.*, 2005).

## **C. Pathologies humaines et animales**

### **1. Symptômes liés aux infections par des EPEC**

#### **Chez l'Homme**

Les EPEC sont responsables de la majeure partie des diarrhées infantiles mais sont rarement incriminés dans les diarrhées chez l'adulte. Les EPEC sont principalement responsables de diarrhées accompagnées de fièvre, de vomissements et de déshydratation chez les enfants de moins de 2 ans (Varela *et al.*, 2015).

Pour la plupart des cas d'infection à EPEC chez l'Homme, une réhydratation suffit à éliminer le pathogène et dans les cas graves chez l'enfant, l'utilisation d'une antibiothérapie peut être nécessaire (Croxen *et al.*, 2013).

#### **Chez les animaux**

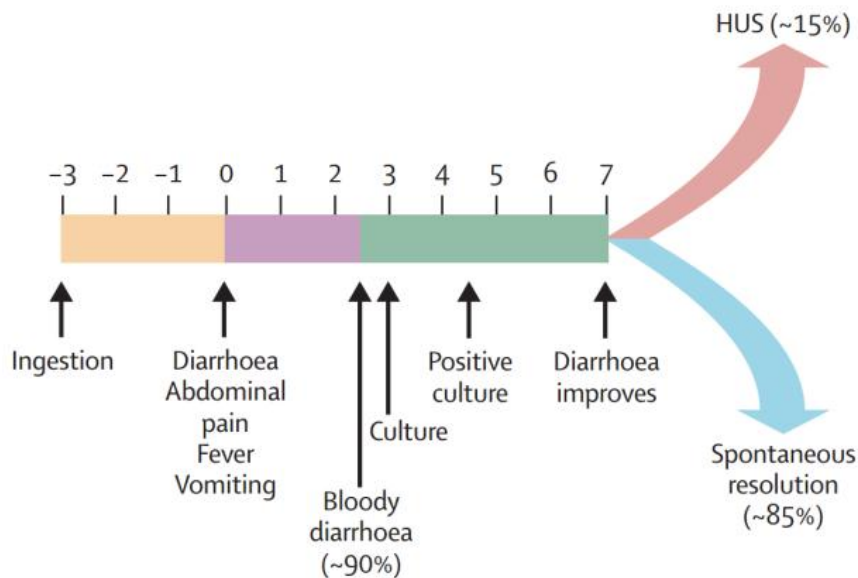
De nombreuses études mettent en évidence le caractère pathogène des EPEC vis à vis des animaux également. Les EPEC sont responsables de diarrhées chez les bovins (Kobayashi *et al.*, 2001), les ovins (de la Fuente *et al.*, 2002), les porcs (Malik *et al.*, 2006) et ils sont également responsables d'épidémies chez la volaille (Farooq *et al.*, 2009, Dutta *et al.*, 2011). Les symptômes peuvent varier d'une simple diarrhée, à une diarrhée aqueuse abondante mucoïde ou sanglante, accompagnée d'anorexie, de déshydratation et de léthargie comme observée dans une épidémie chez le lapin aux Etats-Unis (2 224 cas) (Swennes *et al.*, 2012).

### **2. Symptômes liés aux infections par des STEC**

#### **Chez l'Homme**

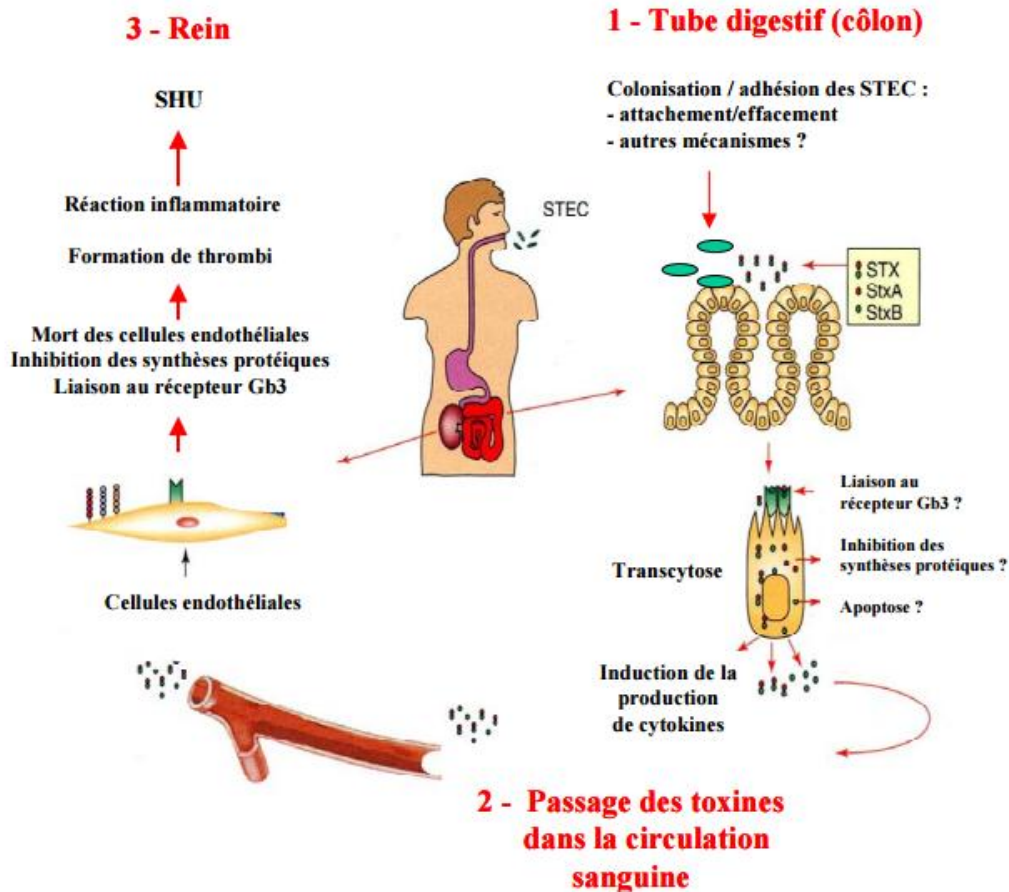
Les EHEC ou STEC sont associés à des colites hémorragiques et/ou à un syndrome hémolytique et urémique. Les cas sévères sont observés chez les enfants et les personnes immuno-déprimées. Les sérotypes O157 et non-O157 provoquent les mêmes symptômes mais avec des niveaux de gravité variables, rappelant la classification en sérotypotype proposée par Karmali *et al.*, 2003. Le premier symptôme de la maladie est une diarrhée non sanglante qui peut être accompagnée de fièvre, de crampes abdominales ou de vomissements. Dans la majorité des cas, les diarrhées deviennent sanglantes entre un et cinq jours suivant la première diarrhée. Les complications observées peuvent se manifester sous la forme d'un SHU dans environ 15 % des cas surtout chez l'enfant (Figure 8). Le SHU est défini par l'association d'une anémie hémolytique microangiopathique avec présence d'hématies fragmentées (schizocytes), d'une thrombopénie et d'une insuffisance rénale aiguë. Il correspond à des lésions de type microangiopathie thrombotique (MAT), touchant les reins et

éventuellement d'autres viscères, caractérisées par un épaissement des parois des capillaires glomérulaires et/ou des artérioles et par la présence de micro-agrégats plaquettaires dans les capillaires et les artérioles. Le SHU est la principale cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Il peut entraîner la mort dans moins de 5 % des cas. Chez l'adulte, il se traduit par un Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) caractérisé par des lésions thrombotiques microvasculaires généralisées.



**Figure 8 :** Evolution d'une infection à O157 :H7 chez un enfant (d'après Tarr *et al.*, 2005). HUS : Hemolytic Uremic Syndrom.

L'essentiel des signes cliniques est lié à la production des Shiga-toxines. Après ingestion, les STEC doivent résister à l'acidité de l'estomac (Yang *et al.*, 2015). Une étape de colonisation du tube digestif est nécessaire : la plupart des souches STEC (en particulier celles de sérotype O157 :H7) sont capables de produire les lésions A/E. En dehors de la voie du LEE, les mécanismes de colonisation sont mal connus. Les toxines produites par les bactéries doivent ensuite traverser l'épithélium intestinal, avant de rejoindre le système circulatoire et atteindre les récepteurs spécifiques glycolipidiques localisés à la surface des cellules endothéliales, présentes principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral (Figure 9). Les Shiga-toxines entraînent ensuite la mort des cellules cibles par arrêt de la synthèse protéique.



**Figure 9** : Processus infectieux des STEC (AFSSA 2003).

Le traitement du SHU est purement symptomatique : hyperhydratation, transfusion et dialyse pour corriger l'insuffisance rénale. L'antibiothérapie est peu recommandée dans les infections à STEC. Plusieurs études suggèrent que les antibiotiques augmenteraient le risque de SHU, par le relargage des toxines lors de la lyse bactérienne (Scheiring *et al.*, 2008). Le principe selon lequel il n'est pas nécessaire, voire risqué, de prescrire une antibiothérapie à un patient atteint d'une diarrhée à EHEC est remis en cause par les données de l'épidémie allemande (réduction de la durée de portage) et la possibilité de recourir à un traitement bactériostatique (azithromycine) (Nitschke *et al.*, 2012). L'azithromycine appartient à la famille des macrolides et inhibe la synthèse des protéines dont les Stx. Elle présente cependant de nombreux effets secondaires (effets cutané-muqueux et allergiques, digestifs, hépatiques et cardiaques) (Mortensen *et al.*, 2014, Barni *et al.*, 2015). Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer la recommandation de cet antibiotique.

De nombreux cas d'infection et d'épidémies liées aux STEC sont régulièrement reportés chaque année dans le monde et recensés par des programmes nationaux de surveillance ;

- au Canada, *National Enteric Surveillance Program* (NESP) : 3 495 cas d'infection liée à O157:H7 recensés entre 2007 et 2012 (NESP 2013).

- en Europe, *European Food Safety Authority* (EFSA) : 13 545 cas d'infection liée à STEC recensés entre 2007 et 2010 (EFSA 2013).

- aux Etats-Unis, *U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service* (USDA/FSIS) et *Centre for disease control and prevention* (CDC) : 23 épidémies à STEC entre 2006 et 2015 avec 898 cas.

A notre connaissance, aucune épidémie à STEC liée à la consommation de produits de la mer (poissons ou coquillages) n'a été rapportée à ce jour dans le monde.

### **Chez les animaux**

Les STEC sont également responsables d'infection chez les animaux. Ils peuvent causer la maladie de l'œdème chez les porcs en post-sevrage et les jeunes porcs par la capacité de certains STEC à se fixer sur des récepteurs glycolipidiques présents chez le porc (Ching *et al.*, 2002).

Ils sont responsables de diarrhées chez les veaux (Coura *et al.*, 2014). L'absence de récepteur pour les Shiga-toxines chez les bovins adultes pourrait expliquer que les ruminants ne développent pas de toxémie ou de dommage vasculaire systémique (Pruimboom-Brees *et al.*, 2000). Chez les ovins, les STEC touchent préférentiellement les animaux jeunes en causant de fortes diarrhées chez les chevreaux et les agneaux (Wani *et al.*, 2005, Turkyilmaz *et al.*, 2013). La volaille est également touchée par des diarrhées à STEC (Dutta *et al.*, 2011). Enfin, les animaux domestiques tels que les chiens peuvent également être sujets aux diarrhées (Sancak *et al.*, 2004).

## **D. Les facteurs de virulence**

### **1. Les Shiga-toxines**

#### **Définition des Shiga-toxines**

Le terme Shiga-toxine a tout d'abord été utilisé pour identifier les toxines produites par *Shigella dysenteriae* de type 1 donnant naissance au terme *Shiga-like toxin*, ou Shiga-toxine, quand celles-ci ont été identifiées chez *E. coli*. Ce terme a remplacé celui de « Vérotoxine » utilisé pour caractériser les toxines lysant les cellules Vero (cellules épithéliales de rein extraites de singe) chez *E. coli* (Bergan *et al.*, 2012).

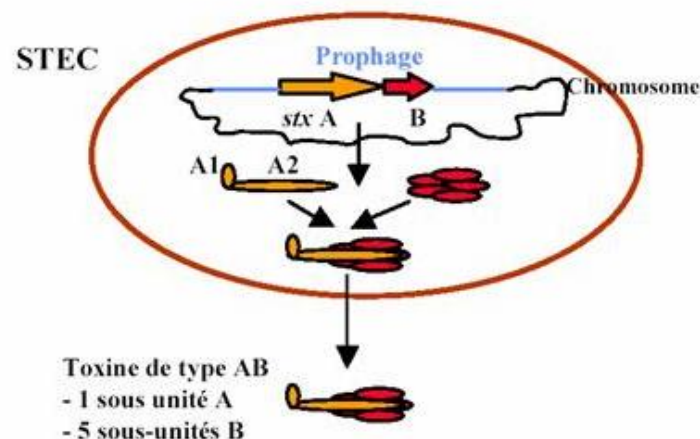
Ces toxines sont principalement produites par *S. dysenteriae* sérotype 1 (Stx1) mais également par certains *E. coli* et sporadiquement par *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Shigella flexneri* (Herold *et al.*, 2004).

Il existe deux types de Shiga-toxines ; la Shiga-toxine de type 1 codée par les gènes *stx1* et la Shiga-toxine de type 2 codée par les gènes *stx2*. Alors que la Shiga-toxine Stx1 est neutralisée par des anticorps anti-Shiga-toxine de *S. dysenteriae* sérotype 1, la Shiga-toxine Stx2 ne l'est pas (Strockbine *et al.*, 1986, Paton et Paton 1998). Les gènes *stx1* et *stx2* possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie avec la Stx1 de *S. dysenteriae* (O'Brien *et al.*, 1984, Strockbine *et al.*, 1986). Ceci s'explique par le fait que les deux toxines ne partagent respectivement que 55 % et 57 % d'identité pour les sous-unités protéiques A et B qui les composent. En revanche, leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires.

### Structure de la Shiga-toxine

Chez *E. coli*, la Shiga-toxine est codée par deux gènes *stx* (*stxA* et *stxB*), présents sur un prophage lambdaoïde (*stx-converting bacteriophage* ou *stx-phage*) qui est un élément génétique mobile (Herold *et al.*, 2004).

L'opéron codant la Shiga-toxine a une structure commune constituée d'une seule unité transcriptionnelle qui code les sous-unités A et B (Figure 10). Les toxines produites sont des hétéropolymères de 70 kDa composés d'une sous-unité A (Activité toxique) de 33 kDa et de 5 sous-unités B (Binding) de 7,7 kDa. La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase sur une adénosine de l'ARN ribosomique 28S et la sous-unité B a un rôle important au niveau du degré de toxicité de la toxine, car elle conditionne le niveau de compatibilité de la toxine avec le récepteur cible (Bergan *et al.*, 2012).



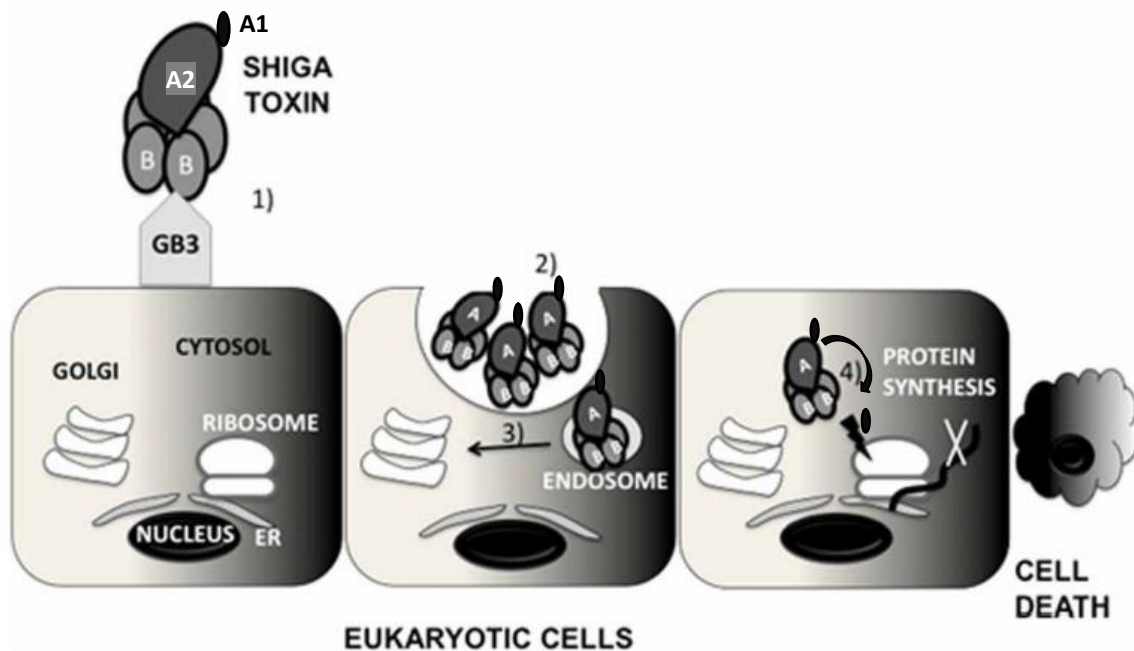
**Figure 10** : Structure de l'opéron codant les Shiga-toxines (AFSSA 2003)

### Le mécanisme d'action des Shiga-toxines

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



(Muething *et al.*, 2012). Une fois la Shiga-toxine internalisée par le mécanisme classique d'endocytose, elle subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous-unité A de la Shiga-toxine est alors libérée des sous-unités B et clivée en deux parties A1 et A2 par réduction des ponts disulfures. La partie A1 ainsi clivée est transloquée dans le cytoplasme jusqu'à sa cible, la sous-unité 60S du ribosome où elle exerce son activité en bloquant la synthèse protéique. Ceci conduit à l'arrêt de la synthèse protéique et à la mort de la cellule (Figure 11) (Bergan *et al.*, 2012).



**Figure 11** : Mécanisme d'action des Shiga-toxines. 1) Fixation, 2) Internalisation, 3) Transport rétrograde, 4) Clivage et Action (d'après Pacheco et Sperandio 2012)

La toxine Stx2 est la plus répandue parmi les STEC et est considérée comme la plus toxique. On peut détecter la présence concomitante de plusieurs toxines chez une même bactérie avec la présence des gènes codant les Shiga-toxines 1 et 2 (*stx1*, *stx2*) ou la présence de plusieurs variants du gène *stx* (Friedrich *et al.*, 2003, Prager *et al.*, 2011, Feng et Reddy 2013). La présence de plusieurs toxines influence le pouvoir pathogène des souches ; une étude montre qu'une souche exprimant une seule toxine est plus pathogène qu'une souche exprimant plusieurs toxines (Krueger *et al.*, 2011)

### Les variants des gènes *stx*

De nombreux variants ont été identifiés au niveau des gènes codant pour les Shiga-toxines : trois variants pour le gène *stx1* (*stx1a*, *stx1c* et *stx1d*) et sept variants pour le gène *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*) (Scheutz *et al.*, 2012).

Le type de variant peut refléter à la fois l'origine d'une souche, sa phylogénie mais aussi son pouvoir pathogène (Bertin *et al.*, 2001, Friedrich *et al.*, 2002, Fuller *et al.*, 2011).

Ainsi, chez l'Homme, les variants associés aux pathologies sévères sont les variants *stx2a*, *stx2c* et *stx2d* tandis que les variants *stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2b*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g* sont associés à de faibles diarrhées. Les variants *stx1c*, *stx2b*, *stx2e* et *stx2f* sont plus particulièrement associés à des souches isolées chez les moutons, les bovins, les porcs et les pigeons, respectivement. Les variants ont tous été détectés dans des souches isolées de produits frais type légumes et d'aliments d'origine animale (Tableau 7).

**Tableau 7 :** Incidence des variants *stx* sur l'Homme et détection préférentielle des différents variants des gènes *stx1* et *stx2* codant pour les Shiga-toxines.

Variant du gène <i>stx</i>	Pathologie	Sources animales (fèces) ou humaine	Détection dans les aliments	Références
<i>stx1a</i>	Diarrhées sans SHU <sup>a</sup> chez l'Homme	Bovins, ovins, chamois, chevreuils, sangliers, renards, Homme, effluents d'origine humaine, bovine	Produits frais type légumes, aliments d'origine bovine, ovine, viandes de lapin	Friedrich <i>et al.</i> , 2002, Martin et Beutin 2011, Mora <i>et al.</i> , 2012, Kumar <i>et al.</i> , 2012, Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Bibbal <i>et al.</i> , 2014, Shen <i>et al.</i> , 2015
<i>stx1c</i>	Faibles diarrhées chez l'Homme	Ovins, chèvres, chevreuils, sangliers, chamois, bovins, Homme	Produits frais type légumes, aliments d'origine bovine, ovine et de chèvre, de cerf, coquillages	Zhang <i>et al.</i> , 2002a, Brett <i>et al.</i> , 2003, Friedrich <i>et al.</i> , 2003, Gourmelon <i>et al.</i> , 2006, Wani <i>et al.</i> , 2007, Mora <i>et al.</i> , 2012, Kumar <i>et al.</i> , 2012, Martin et Beutin 2011, Feng et Reddy 2013, Shen <i>et al.</i> , 2015
<i>stx1d</i>	Pas ou peu virulente chez l'Homme	Bovins, ovins, chèvres, Homme	Produits frais type légumes, aliments (non précisé), coquillages	Gourmelon <i>et al.</i> , 2006, Kumar <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Shen <i>et al.</i> , 2015
<i>stx2a</i>	Cas sévères de SHU chez l'Homme	Bovins, ovins, cerfs, chevreuils, Eaux usées urbaines, effluents d'origine bovine et humaine	Produits frais type légumes, aliments d'origine bovine, ovine, viande de lapin	Kumar <i>et al.</i> , 2012, Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2012, Diaz-Sanchez <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Bibbal <i>et al.</i> , 2014
<i>stx2b</i>	Diarrhées chez l'Homme	Ovins, chamois, chevreuils, sangliers, cerfs, Homme rarement	Produits frais type légumes, aliments d'origine ovine et chèvre bovine	Martin et Beutin 2011, Mora <i>et al.</i> , 2012, Diaz-Sanchez <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Shen <i>et al.</i> , 2015
<i>stx2c</i>	Cas sévères de SHU et CH <sup>b</sup> chez l'Homme	Bovins, chevreuils, sangliers, Hommes, effluents d'origine humaine, bovine	Produits frais type légumes, aliments d'origine bovine, porcine, ovine, chèvre	Friedrich <i>et al.</i> , 2002, Wani <i>et al.</i> , 2007, Martin et Beutin 2011, Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2012, Mora <i>et al.</i> , 2012, Kumar <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Bibbal <i>et al.</i> , 2014
<i>stx2d</i>	Cas sévères de SHU et CH chez l'Homme	Bovins, ovins, Homme, effluents d'origine humaine	Produits frais type légumes, aliments d'origine bovine, ovine	Friedrich <i>et al.</i> , 2002, Wani <i>et al.</i> , 2007, Monaghan <i>et al.</i> , 2012, Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Kumar <i>et al.</i> , 2012, Delannoy <i>et al.</i> , 2015
<i>stx2e</i>	Rares cas d'infection chez l'Homme	Porcs, sangliers, renards, effluents d'origine urbaine, bovine, porcine, eaux usées urbaines	Produits frais type légumes, viandes de porcs et de sangliers	Friedrich <i>et al.</i> , 2002, Fratamico <i>et al.</i> , 2004, Martin et Beutin 2011, Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Tseng <i>et al.</i> , 2014a, Shen <i>et al.</i> , 2015

---

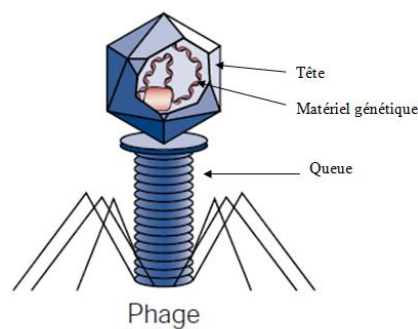
	n̄ dème chez le porc			
<i>stx2f</i>	Rares cas d'infection chez l'Homme	Pigeons, Homme, effluents d'origine humaine	Produits frais type légumes	Schmidt <i>et al.</i> , 2000, Sonntag <i>et al.</i> , 2005, Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013
<i>stx2g</i>	Pas de cas d'infection chez l'Homme	Sangliers, renards, chevreuils, effluents d'origine bovine	Produits frais type légumes, aliments d'origine bovine	Martin et Beutin 2011, Diaz-Sanchez <i>et al.</i> , 2012, Martinez-Castillo <i>et al.</i> , 2012, Mora <i>et al.</i> , 2012, Feng et Reddy 2013, Shen <i>et al.</i> , 2015

---

<sup>a</sup> Syndrome Hémolytique et Urémique, <sup>b</sup> Colites Hémorragiques

## Le bactériophage *stx*

Les gènes codant les Shiga-toxines ont la particularité d'être portés par un bactériophage tempéré (Figure 12) capable d'alterner entre une phase lysogénique et une phase lytique. Le bactériophage *stx* en phase lysogénique infecte une bactérie et intègre son génome au sein du chromosome bactérien. Ce matériel génétique ainsi intégré prend le nom de prophage et est le plus souvent « dormant » en raison d'une répression de la transcription des gènes nécessaires au cycle lytique. Sous différentes conditions, le bactériophage *stx* peut entrer en phase lytique avec une activation de la transcription des gènes correspondants, sous l'influence d'un élément déclencheur (exposition aux UV, antibiothérapie, traitement alimentaire ) conduisant à la production de dizaines voire de centaines de phages au sein de la bactérie qui finira par littéralement exploser, libérant ainsi les nouveaux phages qui pourront infecter d'autres bactéries.



**Figure 12** : Représentation schématique d'un bactériophage *stx* dans sa configuration tête-queue (d'après Schmidt *et al.*, 2001)

Les bactériophages *stx* sont impliqués dans le transfert horizontal des gènes *stx* (transfert du matériel génétique du phage dans le génome bactérien) chez *E. coli* (Cornick *et al.*, 2006, Picozzi *et al.*, 2012) et ceci de manière aléatoire, participant ainsi à l'émergence de nouvelles souches STEC (Martinez-Castillo et Muniesa 2014). Le bactériophage est un élément instable à l'intérieur de la bactérie. Il peut être perdu au cours d'une infection ou de cultures successives comme cela a été observé chez le sérotype O157 :H7 (Friedrich *et al.*, 2007) et le sérotype O26 (Bielaszewska *et al.*, 2007).

Les bactériophages *stx* sont retrouvés libres chez l'Homme (Martinez-Castillo *et al.*, 2013) et dans l'environnement ; dans les fèces animaux (Yan *et al.*, 2011), dans les effluents d'origine humaine et animale (bovin, porc, volaille) (Imamovic *et al.*, 2010a, Rooks *et al.*, 2010, Yan *et al.*, 2011), dans les rivières (Dumke *et al.*, 2006) et dans les aliments (viandes et salade) (Imamovic et Muniesa 2011).

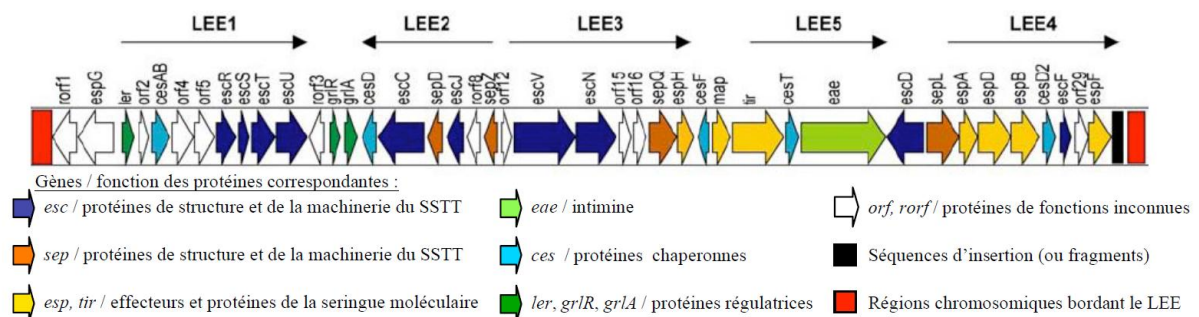
Les concentrations en bactériophages *stx* peuvent varier par exemple entre 1 à 9 log<sub>10</sub> copies de gène/ml dans les effluents d'origine humaine et animale (Imamovic *et al.*, 2010a, Rooks *et al.*, 2010) et sont souvent plus importantes que les concentrations en *E. coli* qui elles peuvent varier entre 4 et 5 log<sub>10</sub> UFC/ml dans les effluents (Muniesa *et al.*, 2011).

Les bactériophages persistent plus longtemps que les bactéries ; ils sont stables à 4, 22 et 37°C et à pH 7 et 9 pendant un mois, tandis que les populations de STEC déclinent rapidement dans ces mêmes conditions (Allué-Guardia *et al.*, 2014).

Les bactériophages portant les gènes *stx2* sont plus souvent détectés que les bactériophages portant les gènes *stx1* dans l'environnement : par exemple dans une méta-analyse de 25 études, les bactériophages *stx2* ont été détectés dans les 25 études et le bactériophage *stx1* dans cinq cas seulement (Martinez-Castillo et Muniesa 2014). Cette même observation a également été confirmée par une récente étude effectuée sur 357 échantillons de fèces humaines et d'animaux, d'eaux usées, de matières fécales, d'eaux de rivière, de sols, de boue et d'aliments où *stx1* a été détecté dans 7,6 % des échantillons et *stx2* dans 68,4 % (Grau-Leal *et al.*, 2015).

## 2. Locus of enterocyte effacement (LEE)

Le locus of enterocyte effacement ou LEE contient les gènes codant i) l'intimine (gène *eae* : *E. coli attaching and effacing*), ii) un système de sécrétion de type III (SSTT), iii) des protéines sécrétées de type Esp (*E. coli secreted protein*), iv) des protéines Esc (*E. coli secretion*) qui participent à la structure et au fonctionnement de la seringue moléculaire du SSTT et v) un récepteur de translocation de l'intimine nommé Tir (*Tyrosine phosphorylated protein*) (Figure 13) (Garrido *et al.*, 2006). Il regroupe les gènes responsables des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) générées par les bactéries pour s'implanter au niveau des cellules du tube digestif. Cinq régions distinctes sont classiquement décrites : la région 5' qui regroupe les opérons LEE 1, 2 et 3 qui codent plusieurs protéines de régulation (Ler, GrlR et GrlA) et de structure du SSTT, la région centrale qui comprend le LEE5 qui code l'intimine et son récepteur Tir et la région 3' qui se compose du LEE4 et code d'autres effecteurs bactériens et d'autres protéines de structures impliquées dans la translocation (EspA, B et D) (Garmendia *et al.*, 2005).



**Figure 13** : Organisation schématique du LEE des EHEC/EPEC. *esc* : *E. coli secretion* ; *sep* : secretion of *E. coli* protein ; *esp* : *E. coli secreted protein* ; *ces* : chaperone for *E. coli secreted protein* ; *orf* ou *rorf* : Open Reading Frame (d'après Garmendia *et al.*, 2005)

L'antiméline est une protéine de la membrane externe de la bactérie nécessaire à l'adhésion intime entre la bactérie et l'entérocyte. C'est un facteur de virulence essentiel pour les souches EPEC. Dix-sept variants et huit sous-variants du gène *eae* ont été identifiés : alpha (1, 2), béta (1, 2, 3), gamma (1, 2), delta ( ), épsilon (1, 2, 3, 4), zéta ( ), éta (1, 2), théta ( ), iota (1, 2), kappa ( ), lambda ( ), mu ( ), nu ( ), xi ( ), omicron ( ), pi ( ) et rho ( ) (Oswald *et al.*, 2000).

Pour les autres gènes du LEE les plus impliqués dans l'adhésion, il existe également, quatre variants pour le gène *tir* (1, 1, 2 et 1), quatre pour le gène *espA* (1, 1, 2 et 1), trois pour le gène *espB* (1, 1 et 1) et trois pour le gène *espD* (1, 1 et 1). Plusieurs combinaisons différentes entre ces gènes ont été mises en évidence et sont utilisées pour classer les souches (Garrido *et al.*, 2006).

Des études menées *in vivo* et *in vitro*, mettent en évidence une colonisation du tube digestif géographiquement différente (côlon ou intestin grêle) selon le type de variant, on parle de tropisme cellulaire ou de spécificité d'hôte (Phillips et Frankel 2000, Reece *et al.*, 2001, Fitzhenry *et al.*, 2002, Girard *et al.*, 2005). Par exemple, une souche O157:H7 exprimant l'antiméline s'associe préférentiellement aux cellules épithéliales du côlon (Fitzhenry *et al.*, 2002).

Le typage des variants et sous-variants *eae* permet de différencier les souches entre elles (Tableau 8).

Les variants et sont les plus rencontrés dans des souches isolées de cas cliniques avec une association préférentielle, pour les EHEC typiques majeurs (Zhang *et al.*, 2002b, Blanco *et al.*, 2004, Monaghan *et al.*, 2011, Bibbal *et al.*, 2014) :

- du sous-variant 1 avec les sérotypes O157:H7 et O145:H28
- du sous-variant 1 avec le sérotypes O26:H11
- du sous-variant avec le sérotype O111:H8
- du sous-variant avec le sérotype O103:H2

Parmi les études recensées dans le Tableau 8, les variants et sous-variants 1, 1, 2 et du gène *eae* sont le plus souvent associés à des souches isolées d'animaux d'élevage (bovins, ovins et porcs) et d'effluents d'origine humaine et animale, tandis que les variants , , , , et le semblent beaucoup moins.

**Tableau 8** : Sélection d'études évaluant la répartition des variants et sous-variants du gène *eae* (codant l'adhésion) sur des souches LEE-positives, au niveau de différentes sources.

Sources	Variants ou sous-variants (nombre)	Nombre total de souches	Références
<b>Homme</b>	(38), (35), (14), (5), (6), (3), (3), (2)	106	Zhang <i>et al.</i> , 2002b
	1/ 2 (18), 1/ 2 (47), 1/ 2 (66), (23)	154	Oswald <i>et al.</i> , 2000
	1 (20), 1 (27), (6), 2 (5), (3)	61	Blanco <i>et al.</i> , 2004
<b>Bovin</b>	1/ 2 (17), 1/ 2 (5), (2)	24	Oswald <i>et al.</i> , 2000
	1 (49), (49), 1 (16), (10),	124	Bibbal <i>et al.</i> , 2014
<b>Chien</b>	1/ 2 (1), 1/ 2 (1)	2	Oswald <i>et al.</i> , 2000
<b>Porc</b>	2/ (15), 1 (8), 1 (7), (6), (6), (5), (1),	51	Fröhlicher <i>et al.</i> , 2008
	(1), 2 (1)	1	Oswald <i>et al.</i> , 2000
	1/ 2 (1)		
<b>Ovin</b>	2/ (23), 1 (13), 2/ (5), (4), 1 (2), 1 (2),	52	Fröhlicher <i>et al.</i> , 2008
	(1), (1), (1)		
<b>Pigeon</b>	1/ 2 (4)	4	Oswald <i>et al.</i> , 2000
<b>Lapin</b>	1/ 2 (4)	4	Oswald <i>et al.</i> , 2000
<b>Effluent d'origine humaine</b>	2 (196), (76), 2 (40), 1 (35), (31), (43), 3, , 1, , 2, , :(<23)	467	Yang <i>et al.</i> , 2014
<b>Effluent d'origine animale</b>	1 (16), 2/ (18), 1 (12), 2/ (2), (2), (1), (1)	52	Loukiadis <i>et al.</i> , 2006

### 3. Autres gènes de virulence

#### Des gènes impliqués dans l'adhésion

L'émergence d'infections humaines liées aux STEC LEE-négatifs montre que la présence de cet îlot de pathogénicité n'est pas le seul responsable de l'adhésion des bactéries et indique la présence d'autres facteurs de virulence portés par d'autres îlots de pathogénicité ou d'autres plasmides en rapport avec cette étape qui est indispensable au développement de la virulence des souches (Galli *et al.*, 2010).

Plusieurs études montrent que les souches de sérogroupes O157 et non-O157 expriment une grande variété d'éléments de type *fimbriae* et non-*fimbriae* qui jouent un rôle important dans l'adhésion des bactéries au niveau du tube digestif et dans la persistance des souches au niveau des réservoirs que constituent les ruminants (Farfan et Torres 2012).

Parmi cette famille de gène, on trouve les gènes *efal*, *lifA* et *toxB* codant des protéines homologues impliquées dans la formation de lésions A/E qui permettent l'adhésion des EPEC et des STEC aux cellules épithéliales (Tatsuno *et al.*, 2001, Badea *et al.*, 2003). L'hôte est capable de produire des



anticorps pour neutraliser ces adhésines qui sont exprimées pendant la phase infectieuse (Badea *et al.*, 2003).

Les gènes des *long polar adhesin* (Lpf) sont présents chez les STEC O157:H7 et sont situés sur deux régions chromosomiques OI-141 et OI-154 (OI : genomic O island) (Doughty *et al.*, 2002). Les Lpf sont présents chez de nombreuses souches de *E. coli*. Si leur rôle dans l'adhésion des souches STEC est avéré, il n'est cependant pas clairement défini chez les EPEC (Tatsuno *et al.*, 2006).

Le gène *saa* (*STEC autoagglutinating adhesin*) code une adhésine non fimbriale auto-agglutinante. Elle a été mise en évidence chez des souches LEE-négatives responsables d'infections humaines et animales et isolées de l'environnement (Friedrich *et al.*, 2003, Jenkins *et al.*, 2003, Blanco *et al.*, 2004, Amézquita-Lopez *et al.*, 2014). Cette adhésine est responsable de l'adhésion semi-localisée des bactéries (Paton *et al.*, 2001).

Le gène *iha* (*IrgA homologue adhesin*) code une protéine très proche de la protéine IrgA (*Iron-regulated gene homologue A*) produite chez *Vibrio cholerae*. Elle joue un rôle dans l'acquisition du fer par la bactérie en lien étroit avec l'adhésion des souches LEE-négatives mais aussi LEE-positives. Cette protéine contribue à la virulence des souches en favorisant leur fixation (Tarr *et al.*, 2000). Le gène *iha* semble être le gène de virulence en lien avec l'adhésion, le plus communément détecté dans un panel de 75 souches STEC isolées à partir d'aliments et d'eaux de boisson (Slanec *et al.*, 2009).

Le gène *stcE* code une protéase qui joue un rôle de métalloprotéase et de mucinase. Cette enzyme est impliquée dans l'adhésion intime de certains O157:H7 aux cellules de l'hôte par un clivage de glycoprotéines cellulaires (Grys *et al.*, 2005).

D'autres gènes codant des adhésines sont responsables de l'adhésion diffuse ou intime de certains STEC pathogènes chez le porc, comme les gènes F6, F18, F41 (Kwon *et al.*, 2002) ou les gènes *orfA/orfB* (*open reading frames*) (Zhao *et al.*, 2009). Le gène *paa* (*porcine attaching-and effacing associated factor*) est également impliqué dans l'adhésion de souches STEC isolées chez le porc (Vidotto *et al.*, 2013).

Comme beaucoup d'autres gènes de virulence impliqués dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte (Annexe I), ces facteurs sont plus ou moins détectés chez des souches EPEC, STEC et EHEC isolées de cas cliniques humains ou d'infections animales (Galli *et al.*, 2010, Monaghan *et al.*, 2011, Kobayashi *et al.*, 2013, Bibbal *et al.*, 2014, Tseng *et al.*, 2014a). Tous ces gènes ont également été détectés dans des souches isolées à partir d'aliments ou de l'environnement, témoignant du pouvoir effectif d'adhésion de certaines souches LEE-négatives isolées de l'habitat secondaire (Cergole-Novella *et al.*, 2007, Cadona *et al.*, 2013).

## Des gènes codant pour des toxines

Outre la production des Shiga-toxines, les STEC peuvent produire des hémolysines ou d'autres toxines (Galli *et al.*, 2010, Monaghan *et al.*, 2011, Bai *et al.*, 2013). Egalement rencontrés chez certaines souches EPEC (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007, Bibbal *et al.*, 2014, Dutta *et al.*, 2015), ces facteurs de virulence ont des effets cytotoxiques sur les cellules épithéliales. Ces toxines et ces hémolysines sont capables de lyser les cellules du système immunitaire et peuvent être responsables d'acidose et d'hypersecretion de composants cellulaires par les entérocytes (Annexe I).

Les gènes *cdt* (*cytolethal distending toxin*) codent des toxines qui interviennent au niveau du cycle cellulaire eucaryote en bloquant les cellules en phase G2/M (Nougayrede *et al.*, 2005). Ces toxines sont portées par une faible portion des STEC LEE-négatifs mais ont été détectées dans des souches impliquées dans des infections humaines (Bielaszewska *et al.*, 2004).

Le gène *astA* codant l'entérotoxine thermostable caractéristique des *E. coli* entéroagrégatifs (EAST1) est présent chez certains EPEC (Silva *et al.*, 2014) et chez certains EHEC (Nishikawa *et al.*, 2002). Même si son rôle n'est pas encore clairement défini, cette toxine contribue à l'apparition de diarrhées aqueuses.

Les gènes *ehxA* et *hlyA* codent les hémolysines, Enterohémolysine A et -hémolysine, qui sont impliquées dans la lyse cellulaire des lignées lymphocytaires et érythrocytaires en formant des pores dans la membrane cellulaire (Lorenz *et al.*, 2013). Ces toxines sont détectées chez les souches EPEC et les STEC isolées de cas cliniques graves, d'animaux malades et de l'environnement (eaux usées d'origine humaine et animale) (Blanco *et al.*, 2004, Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007, Feng *et al.*, 2011, Martinez-Castillo *et al.*, 2012, Kobayashi *et al.*, 2013).

Le gène *subA* code la cytotoxine subtilase qui est une toxine homologue à celle produite chez *Bacillus anthracis* (Paton *et al.*, 2004). Produite chez les STEC en général cette toxine est responsable de thrombose et de nécrose en agissant via l'arrêt de la synthèse protéique des cellules (Barth *et al.*, 2007, Cergole-Novella *et al.*, 2007, Galli *et al.*, 2010).

Les gènes *estla* et *elt* codant respectivement les toxines Sta thermo-stable et LT thermo-sensible, ont été détectés dans des souches STEC responsables de colibacilloses chez le porc (Mohlatlole *et al.*, 2013) et de diarrhées chez l'Homme (Prager *et al.*, 2011). Les toxines produites agissent sur le dérèglement de l'absorption cellulaire et l'hyper-excrétion des ions dans la lumière du tube digestif, engendrant ainsi un dérèglement osmotique et des diarrhées aqueuses (Nataro et Kaper 1998).

### **Des gènes *nle* « effecteurs non codés par le locus LEE »**

Un grand nombre de gènes effecteurs ne faisant pas partie du LEE sont appelés gènes *nle* pour *non LEE-encoded effector*. Ces gènes sont fortement liés à la virulence de souches responsables de lésions A/E (Gruenheid *et al.*, 2004, Echtenkamp *et al.*, 2008, Hodgson *et al.*, 2015). Ces gènes sont impliqués dans diverses fonctions, telles que l'inhibition de la phagocytose, des activités anti-apoptotiques, la perturbation des réponses immunitaires innées, l'augmentation de la perméabilité cellulaire, le blocage de la division cellulaire et la perturbation des microtubules du cytosquelette, entre autres (Galli *et al.*, 2010, Martinez-Castillo *et al.*, 2012) (Annexe I). Ces gènes sont pour la plupart codés par des prophages au sein de lots de pathogénicité tels que OI-122, OI-71, OI-57 ou OI-36 chez *E. coli*.

### **Des gènes impliqués dans la persistance**

Au sein des autres gènes participant à la virulence des souches, on retrouve des gènes impliqués dans la persistance (Annexe I) :

Le gène *katP* codant une catalase/péroxydase permet aux souches de *E. coli* de résister au stress oxydatif. Le gène *ureD* est associé à l'expression de l'uréase qui est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac (source d'énergie) (Steyert et Kaper 2012). En remarque, le rôle de l'uréase dans la virulence des souches du genre *Proteus* et *Klebsiella* a récemment été identifié ; elle agirait comme un élément protégeant la bactérie du système immunitaire de l'hôte en bloquant la phagocytose et créant des lésions cellulaires (action de l'ion ammonium) (Rutherford 2014).

Le gène *pagC* code pour une protéine (*pagC-like membrane protein/phP-activated gene C*) homologue de celle produite par *Salmonella enterica* impliquée dans la résistance des souches à l'action des macrophages (Nishio *et al.*, 2005).

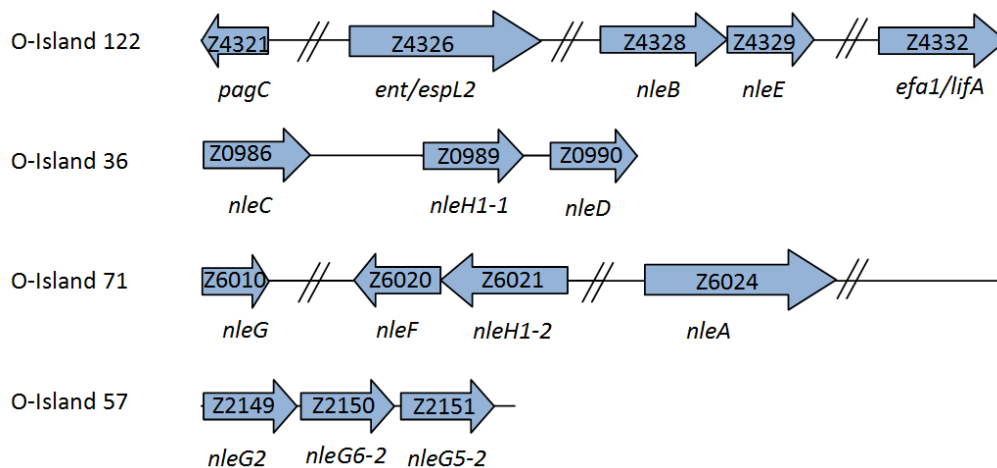
Dans ce groupe de gènes impliqués dans la persistance, on trouve également *terE* qui code pour une enzyme capable de dégrader les tellurites en tellures permettant ainsi à certains *E. coli* comme O157:H7 de se développer sur des milieux enrichis en tellurites (exemple : le milieu MacConkey sélectif) (Orth *et al.*, 2007).

Le gène *ecfI* (*E. coli attaching and effacing gene-positive conserved fragment 1*) fait partie d'un opéron codant une hydrolase qui améliore la structure de la membrane bactérienne par la biosynthèse de polysaccharide et qui est impliquée dans l'invasion spécifique des STEC LEE-positifs (Yoon *et al.*, 2005).

D'autres gènes impliqués dans la résistance ou la persistance de souches appartenant aux autres pathovars ont été identifiés chez les STEC ; le gène *aggR* qui code le régulateur de la transcription de nombreux gènes de virulence chez les EAEC (Morin *et al.*, 2013), le gène *pic* qui code une sérine protéase impliquée dans la colonisation chez les EAEC (Harrington *et al.*, 2009) et les gènes *irp2* (*iron responsible protein 2*) et *fyuA* (*ferric yersiniabactin uptake*) qui codent des protéines ayant un rôle dans l'absorption du fer chez *Yersinia* (Gophna *et al.*, 2001).

#### 4. Notion de risque moléculaire

La seule détection des gènes caractérisant les STEC et EHEC (*stx1*, *stx2* et *eae*) et les EPEC (*eae* et *bfpA*) ne suffit pas à définir le potentiel de virulence réel des souches du fait de l'intervention d'autres facteurs de virulence (EFSA 2013). Le séquençage total du génome du *E. coli* STEC O157:H7 EDL933 a montré la présence d'îlots de pathogénicité composés de différents gènes de virulence dont une partie des îlots est décrit dans l'Annexe I (Figure 14). Les gènes présents sur ces îlots se composent essentiellement de gènes *nle*, de gènes codant des adhésines, des toxines ou des mécanismes impliqués dans la résistance des souches aux agressions extérieures.



**Figure 14** : Gènes de virulence de *E. coli* associés aux O-Islands 122, 36, 71 et 57.

De récentes études se sont intéressées à l'association entre la présence de certains OI et le pouvoir pathogène des souches (Karmali *et al.*, 2003, Wickham *et al.*, 2006, Coombes *et al.*, 2008, Imamovic *et al.*, 2010b). Notamment en 2006, Wickham *et al.*, ont associé la présence de l'OI-122 à des souches responsables de SHU et d'épidémies. Coombes *et al.*, en 2008 ont mis en évidence que les gènes présents sur les OI-122, OI-57 et OI-71 étaient fortement détectés chez des souches STEC responsables de SHU et d'épidémies.

Les gènes localisés préférentiellement sur les OI-122, OI-43-47, OI-57, OI-71 sont le plus souvent associés à des cas cliniques graves (Coombes *et al.*, 2008, Bugarel *et al.*, 2010, Ju *et al.*, 2013, Chui *et al.*, 2015)

Le développement de méthodes miniaturisées dédiées à l'évaluation rapide du pouvoir pathogène des souches (puce à ADN) est en pleine expansion. La détection combinée des gènes *stx*, *eae* et d'une série de gènes *nle* permet donc de produire une sorte de signature de virulence utilisée pour identifier les souches potentiellement hautement pathogènes pour l'Homme, pour différencier par exemple les souches EHEC des STEC et des EPEC (Bugarel *et al.*, 2010, Delannoy *et al.*, 2013).

### **E. Réservoirs des EPEC**

Le réservoir principal des EPEC est le tube digestif de l'Homme, plus précisément des enfants malades ou asymptomatiques, des adultes asymptomatiques incluant les mères et les personnes au contact d'enfant (Nataro et Kaper 1998). Le portage varie entre 11 et 24 % dans les études recensées dans le Tableau 9.

Plusieurs études rapportent également la présence des EPEC dans les fèces d'animaux variant entre 8 % et 32 % selon l'espèce animale considérée. Les bovins, les ovins, les caprins, les animaux domestiques et les animaux sauvages sont des réservoirs potentiels d'EPECa.

Plus précisément, le réservoir principal des EPECt est l'Homme et le réservoir des EPECa est divisé entre l'Homme et les animaux (Trabulsi *et al.*, 2002). De plus, les EPECa sont plus communément détectés dans les échantillons humains et animaux que les EPECt, avec 211 souches isolées *versus* 12 souches parmi les études recensées ci-dessous (Tableau 9).

### **F. Réservoirs des STEC**

Les animaux d'élevage (bovins, ovins, porcs, chèvres, volaille) et tout particulièrement les bovins, sont les principaux réservoirs des STEC au niveau de leur tube digestif. Ce sont des porteurs sains et la colonisation de leur tube digestif est asymptomatique et transitoire (Ferens et Hovde 2011). Le portage varie d'un environnement à l'autre et peut varier entre 15 et 70 % selon les cheptels étudiés. De nombreuses études ont également mis en évidence le portage de STEC chez les ovins, les caprins, les porcs, les animaux sauvages et les animaux domestiques tels que les chiens et les chats mais également chez des animaux atypiques tels que les grenouilles ou les poissons par contamination indirecte (Tableau 10).

L'Homme symptomatique ou asymptomatique peut être le réservoir de STEC au niveau de son tube digestif (Blanco *et al.*, 2004). Le taux de portage varie entre 1,4 et 3 %.

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

Au final, l'Homme et les animaux contribuent à la persistance et à la dissémination des STEC et des EPEC dans l'environnement par le portage symptomatique ou asymptomatique (Ferens et Hovde 2011).

**Tableau 9** : Sélection d'études révélant le taux de portage des EPEC dans différents réservoirs et proportion de souches EPECa et EPECT isolées

Réservoirs (fèces)	Pays	Prévalence % (nombre d'échantillon positifs/nombre total)	EPECa ou EPECT (nombre de souches isolées)	Références
<b>Homme (symptomatique et asymptomatique)</b>	Brésil	Enfant 11 % (13/119)	EPECa <sup>a</sup> (12) EPECT <sup>b</sup> (1)	Franzolin <i>et al.</i> , 2005
	Inde	Adulte/Enfant 17 % (20/115)	EPECa (nd)	Shetty <i>et al.</i> , 2012
	Chine	Enfant 24 % (130/540)	EPEC	Wang <i>et al.</i> , 2014
	Iran	Enfant 14 % (191/1355)	EPECa/EPECT (nd <sup>c</sup> )	Alikhani <i>et al.</i> , 2006
	Japon	Etudiant 41 cas	EPECa (41)	Yatsuyanagi <i>et al.</i> , 2003
	Norvège	Enfant 13 % (59/461)	EPECa (58) EPECT (1)	Afset <i>et al.</i> , 2004
<b>Bovins</b>	Inde	Veau 10 % (39/391)	nd	Wani <i>et al.</i> , 2003
	Espagne	Bétail 8,2 % (34/412)	nd	de la Fuente <i>et al.</i> , 2002
<b>Ovins</b>	Inde	Agneaux 27 % (27/101)	nd	Wani <i>et al.</i> , 2003
	Espagne	Mouton 15 % (88/590)	nd	de la Fuente <i>et al.</i> , 2002
<b>Caprins</b>	Espagne	Chèvre 8 % (18/222)	EPECa	Cortes <i>et al.</i> , 2005
		Chèvre 15 % (62/423)	nd	de la Fuente <i>et al.</i> , 2002
<b>Porcs</b>	Hongrie	Porcelet 13 % (29/221)	EPECa (37)	Malik <i>et al.</i> , 2006
<b>Volaille</b>	Inde	Canard (nd)	EPECa (2)	Farooq <i>et al.</i> , 2009
		Poule (nd)	EPECa (25)	
<b>Oiseaux</b>	Inde	Pigeon (nd)	EPECa (6)	Farooq <i>et al.</i> , 2009
<b>Animaux domestiques</b>	Brésil	Chien (nd)	EPECa (5)	Moura <i>et al.</i> , 2009
		Chat (nd)	EPECa (2)	
<b>Primates</b>	Brésil	Singe 32 % (18/56)	EPECa (14) EPECT (7)	Carvalho <i>et al.</i> , 2003
		Singe (nd)	EPECa (3) EPECT (3)	Moura <i>et al.</i> , 2009
<b>Autres animaux</b>	Brésil	Lapin (nd)	EPECa (6)	Moura <i>et al.</i> , 2009

<sup>a</sup> *E. coli* entéropathogène atypique, <sup>b</sup> *E. coli* entéropathogène typique, <sup>c</sup> non déterminé.

**Tableau 10** : Sélections d'études révélant le taux de portage des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans différents réservoirs et le nombre de souches *E. coli* entérohémorragiques typiques majeurs (EHEC) isolées.

Réservoir (fèces)	Pays	Prévalence % (nombre de échantillon positifs/nombre total)	Pathovar	EHEC typiques majeurs isolés (nombre de souches)	Références	
<b>Homme</b>	France	Enfant 3 % (19/658)	STEC	O157 :H7 (1)	Pradel <i>et al.</i> , 2000	
	Espagne	Adultes 2,5 % (126/5054)	STEC	O157 :H7 (24), O26 :H11 (11)	Blanco <i>et al.</i> , 2004	
	Pays-Bas	Adultes 1,7 % (68/4069)	STEC	O157 :H7 (5)	van Duynhoven <i>et al.</i> , 2008	
	Canada	Adultes 1,4 % (38/2 725)	STEC	O157 (2), O26 (1)	Couturier <i>et al.</i> , 2011	
	Inde	Adultes 1,8 % (11/600)	STEC	Aucune	Kumar <i>et al.</i> , 2014	
	Argentine	Adultes 1,4 % (1/70)	STEC	nd	Favier <i>et al.</i> , 2014	
<b>Bovins</b>	France	Bétail 70 % (330/471)	STEC	O157 :H7 (1)	Pradel <i>et al.</i> , 2000	
	Allemagne	Vache laitière 18 % (131/726)	STEC	O26 (1)	Zschock <i>et al.</i> , 2000	
		Japon	Veaux 46 % (40/87)	STEC	O157 :H7 (1)	Kobayashi <i>et al.</i> , 2001
			Génisses 66 % (58/88)			
		Vache 69 % (126/183)				
	Inde	Vache 18 % (12/66)	STEC	Aucune	Khan <i>et al.</i> , 2002	
	Brésil	Bétail 49 % (119/243)	STEC	O157 (5)	Moreira <i>et al.</i> , 2003	
	Vietnam	Buffle 27 % (64/237)	STEC	O157 (3), O145 (1), O26 (1)	Vu-Khac et Cornick 2008	
		Bovin 23 % (29/126)			Cobeljic <i>et al.</i> , 2005	
	Serbie	Bovin 15% (126/823)	STEC	O26 (1)	Monaghan <i>et al.</i> , 2011	
Irlande	Bovin 40 % (480/1 200)	STEC	O26 (14), O145 (1)			
<b>Caprins</b>	Allemagne	Chèvre 75 % (70/93)	STEC	Aucune	Zschock <i>et al.</i> , 2000	
	Serbie	Chèvre 74 % (31/42)	STEC	O157 (5)	Cobeljic M <i>et al.</i> , 2005	
<b>Ovins</b>	Allemagne	Mouton 32,1 % (9/28)	STEC	Aucune	Zschock <i>et al.</i> , 2000	
	Suisse	Mouton 30 % (196/653)	STEC	Non-O157 (nd)	Zweifel <i>et al.</i> , 2004	
<b>Porcs</b>	Etats-Unis	70 % (484/687)	STEC	Aucune	Fratamico <i>et al.</i> , 2004	



	Suisse	22 % (139/630)	STEC	O26:H- (1), O103:H2 (1)	Kaufmann <i>et al.</i> , 2006
	Serbie	11 % (135/900)	STEC	Aucune	Cobeljic <i>et al.</i> , 2005
	Espagne	Sanglier 8 % (17/ 212)	STEC	O157:H7 (7)	Sanchez <i>et al.</i> , 2010
	Inde	Porc 14,5 % (113/782)	STEC	O157 (4), O103 (2)	Rajkhowa et Sarma 2014
	Chine	Porc 25,4 % (255/1003)	STEC	Aucune	Meng <i>et al.</i> , 2014
<b>Volaille</b>	Serbie	1 % (4/40)	STEC	Aucune	Cobeljic <i>et al.</i> , 2005
	Canada	53 % (52/97)	STEC	Aucune	Parreira et Gyles 2002
<b>Oiseaux</b>	Italie	Pigeon 11 % (71/649)	STEC	Aucune	Morabito <i>et al.</i> , 2001
	Canada	15 espèces d'oiseaux 98 STEC isolés	STEC	Aucune O157	Chandran and Mazuder 2014
<b>Animaux sauvages</b>	Espagne	Daim, Cerf, Mouflon, Chevreuil 24 % (58/243)	STEC	Aucune	Sanchez <i>et al.</i> , 2009
	Etats-Unis	Lévrier 45 % (52/116)	STEC	Aucune O157	Staats <i>et al.</i> , 2003
<b>Animaux domestiques</b>	Argentine	Chien 8 % (36/450)	STEC	Aucune	Bentancor <i>et al.</i> , 2007
		Chat 6 % (9/149)	STEC		
<b>Autres animaux</b>	Italie	Grenouille 3 % (2/60)	STEC	O157 (nd)	Dipineto <i>et al.</i> , 2010
	Afrique	Poisson 5 % (3/64)	STEC	O157 :HNM (2)	Tuyet <i>et al.</i> , 2006

## G. Mode de transmission

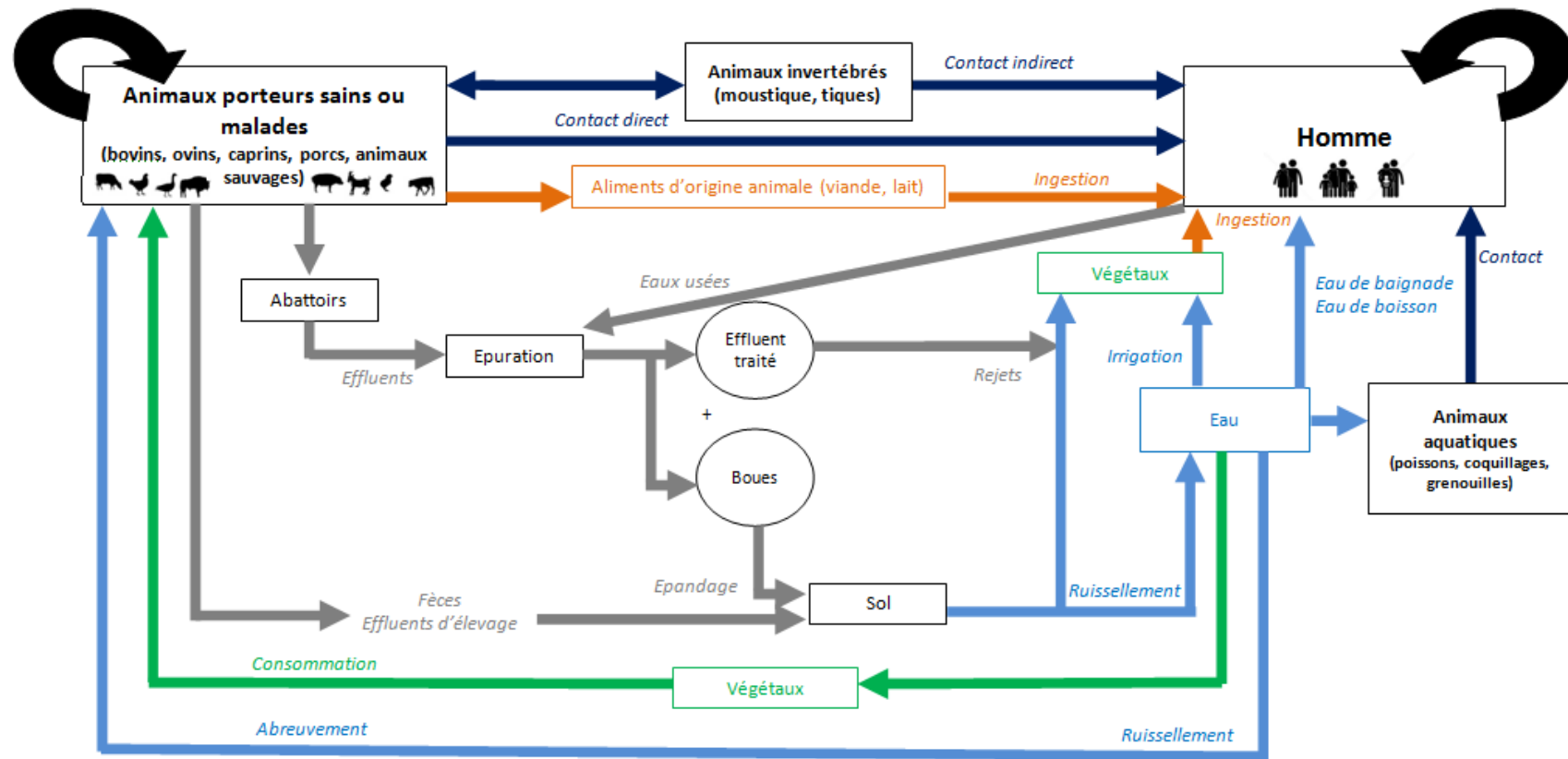
Les STEC et les EPEC se transmettent principalement par voie indirecte alimentaire, par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eaux de boisson contaminés par un environnement souillé par les matières fécales animales ou humaines (Kern Benaibout 2006). La seconde voie de transmission est directe par contact interhumain ou par contact avec des ruminants infectés porteurs et excréteurs. Les eaux récréatives comme les lacs, les rivières et également les eaux de mer peuvent être des vecteurs de contamination (LeJeune 2008) (Tableau 11).

Il existe un lien étroit entre toutes les voies de transmissions possibles des STEC et des EPEC. Les flux potentiels de souches pathogènes sont caractérisés dans un premier temps par la présence des STEC et des EPEC au niveau des animaux domestiques et sauvages (Sanchez *et al.*, 2010, Monaghan *et al.*, 2011, Chandran and Mazumder 2014). La contamination passe par le contact d'animal à animal, d'animal à l'Homme (Lahti *et al.*, 2002) mais aussi par la contamination des sols (prairies et champs) et des eaux superficielles à partir des déjections animales ou d'effluents contaminés (fumiers et lisiers) épandus pour fertiliser les terres agricoles (Grif *et al.*, 2005, Quilliam *et al.*, 2012, Brown *et al.*, 2012). Les eaux usées issues des abattoirs ou des stations d'épuration véhiculent et favorisent la dissémination des bactéries d'origine fécale dans l'environnement (Franzolin *et al.*, 2005, Martinez-Castillo *et al.*, 2012). Les aliments (herbes et fourrages) et l'eau d'abreuvement des animaux peuvent ainsi être également contaminés (Polifroni *et al.*, 2014). Les végétaux consommés par l'Homme ou les animaux peuvent être contaminés, soit par les fumures, soit par l'eau contaminée utilisée pour l'irrigation (Ma *et al.*, 2014, Naganandhini *et al.*, 2015). L'ensemble des flux potentiels de contamination de l'environnement et de l'Homme par ces bactéries entériques pathogènes sont présentés dans la Figure 15.

**Tableau 11** : Liste d'épidémies et d'infections liées aux *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) et aux *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et identification de la voie de transmission

Voie de transmissions	Sources	Sérotype ou séro groupe (nombre de cas)	Pathovar	Pays	Références
<b>Contact indirect</b>					
<b>Viandes mal cuites</b>	Burger	O123 :HNM (2)	STEC	France	King <i>et al.</i> , 2010
	Porc	O157 :H7 (29)	STEC	Canada	Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2012
	Saucisse	O157 :H7 (205)	STEC	Espagne	Bosch 2000
	Mouton	O148 :H8 (11)	STEC	France	Espié <i>et al.</i> , 2006a
<b>Produits frais</b>	Lait	O157 :HNM (14)	STEC	Etats-Unis	Guh <i>et al.</i> , 2010
	Fromage au lait cru	O157 :H7 (29)	STEC	Canada	Gill et Oudit 2015
	Fromage de chèvre	O157 :H7 (2)	STEC	France	Espié <i>et al.</i> , 2006b
<b>Fruits-Légumes-autres</b>	Graines germées	O104 :H4 (3816)	STEC	Allemagne	Frank <i>et al.</i> , 2011
	Salade verte	O157 :H7 (58)	STEC	Etats-Unis	Slayton <i>et al.</i> , 2013
	Cresson	O157 (5)	STEC	Angleterre	Jenkins <i>et al.</i> , 2015
	Germe de fenugrec	O104 :H4 (15)	STEC	France	King <i>et al.</i> , 2012
	Riz	O157 :H45 (80)	<b>EPEC</b>	Japon	Makino <i>et al.</i> , 1999
<b>Eaux de boisson</b>		nd (41)	<b>EPEC</b>	Japon	Yatsuyanagi <i>et al.</i> , 2003
		O100 :HNM (5 000)	STEC	Finlande	Lienemann <i>et al.</i> , 2011
		O157 :H7 (174)	STEC	Japon	Akashi <i>et al.</i> , 1994
		O157 :H7 (2 300)	STEC	Canada	Hrudey <i>et al.</i> , 2003
		nd (16)	<b>EPEC</b>	Mexique	Estrada-Garcia <i>et al.</i> , 2009
<b>Vecteurs alimentaires non identifiés</b>		nd	<b>EPEC</b>	Angleterre	Wedley <i>et al.</i> , 2012
		O111 (37)	<b>EPEC</b>	France	Wight <i>et al.</i> , 1997
		nd (6)	<b>EPEC</b>	Colombie	Rúgeles <i>et al.</i> , 2010
		nd (38)	<b>EPEC</b>	Norvège	Afset <i>et al.</i> , 2004
		O26, O111, í (40)	<b>EPEC</b>	Brésil	Scaletsky <i>et al.</i> , 1999
<b>Contact direct</b>					
<b>Homme</b>	Enfant (garderie)	O26 :H11 (nd)	STEC	Etats-Unis	Brown <i>et al.</i> , 2012
	Adulte/enfant (camp)	O115 :H19 (103)	<b>EPEC</b>	Japon	Saito <i>et al.</i> , 2005
	Enfant (Hôpital)	O111 :HNM (25)	<b>EPEC</b>	Kenya	Senerwa <i>et al.</i> , 1991
<b>Animaux</b>	Animaux de zoo	O157 :H7 (1)	STEC	Pays-Bas	Heuvelink <i>et al.</i> , 2002
	Vache (rodéo)	O157 :H7 (14)	STEC	Etats-Unis	Lanier <i>et al.</i> , 2011
<b>Environnement</b>	Animaux de ferme	O157 :H7 (5)	STEC	Finlande	Lahti <i>et al.</i> , 2002

<b>Eaux de baignade</b>	Herbe (Festival)	O157 :H7 (7)	STEC	Angleterre	Crampin <i>et al.</i> , 1999
	Prairie	O157 :H7 (3)	STEC	Autriche	Grif <i>et al.</i> , 2005
	Station d'èpuration	O142, O25, í (13)	<b>EPEC</b>	Brésil	Franzolin <i>et al.</i> , 2005
	Inondation	O126 :H12, í (32)	<b>EPEC</b>	Australie	Barlow <i>et al.</i> , 1999
	Lac	O157 :H7 (37)	STEC	Etats-Unis	Bruce <i>et al.</i> , 2003
	Lac	O157 :HNM (3)	STEC	Etats-Unis	Feldman <i>et al.</i> , 2002
	Rivière	O157 :H7 (7)	STEC	Angleterre	Ihekweazu <i>et al.</i> , 2006

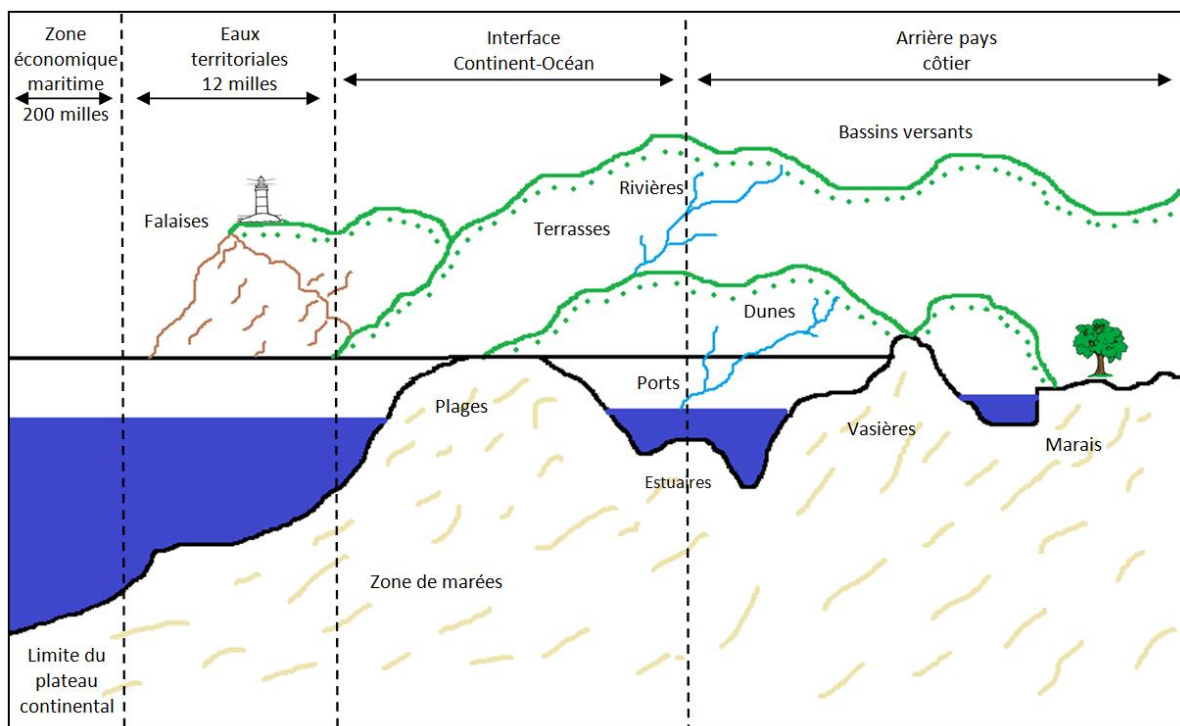


**Figure 15 :** Flux potentiels de *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) et de *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et voies potentielles de contamination de l'environnement et de l'Homme. En gris : voie regroupant les effluents, en vert : voie végétale, en bleu clair: voie hydrique, en bleu foncé : voie contact directe ou indirecte, en orange : voie consommation (d'après AFSSA 2003)

### III. *ESCHERICHIA COLI* DANS L'ENVIRONNEMENT LITTORAL

#### A. Définition de l'environnement littoral

Le littoral peut être défini par la dénomination « zone entre la mer et le continent ». Il se divise en plusieurs parties ; (i) l'arrière pays côtier caractérisé par la présence des activités humaines, urbaines, agricoles et industrielles, (ii) l'interface entre le continent et l'océan avec la présence des activités humaines maritimes (ports, zones conchylicoles, zones de baignade, zones de pêche récréative ) et (iii) la pleine mer juridiquement répartie entre les eaux territoriales et la zone économique maritime plus au large (Figure 16). La zone côtière et spécifiquement les estuaires et les baies sont à l'interface entre trois types d'environnement : les terres, les rivières et la mer.



**Figure 16** : Représentation schématique de l'environnement littoral

De ces activités, découle une forte pression sur le milieu qui fragilise ces espaces où les activités humaines sont très variées (baignade, conchyliculture, pêche récréative ). C'est en amont des zones côtières, au niveau des bassins versants, que la qualité de l'environnement est principalement impactée puisque 80 % des pollutions du littoral sont d'origine terrestre (Anonyme 2011).

Le littoral est un lieu où s'exercent de fortes activités urbaines, économiques et touristiques susceptibles d'apporter des contaminations d'origine fécale. En France, 20,8 % de la population vit à moins de 25 km du littoral. Occupant 4 % du territoire total, les communes littorales représentent 12,5 % des surfaces de logements. La pression de construction (surface construite par km<sup>2</sup> de territoire) est 2,5 fois plus forte dans les communes littorales que la moyenne métropolitaine.

En été, la population présente peut être beaucoup plus importante, augmentant ainsi les pressions exercées sur le littoral (Anonyme 2011).

Enfin au niveau de la zone littorale et des bassins versants en amont, s'exercent de nombreuses activités agricoles. L'agriculture (élevages intensifs, pâturage, culture) est ainsi la principale activité qui occupe 40,2 % des terres des communes littorales (Anonyme 2011).

## **B. Réglementation sanitaire en zone littorale**

Depuis les années 1970, une réglementation européenne pour les eaux et les coquillages a été mise en place afin d'améliorer la qualité microbiologique des eaux de baignade et des eaux conchylicoles. Ces réglementations reposent sur la détection des indicateurs de contamination fécale que sont les *E. coli* et les entérocoques.

### **1. Les indicateurs de contamination fécale : *E. coli* et les entérocoques**

Un bon indicateur de contamination fécale doit : (i) être présent au niveau du tractus digestif des animaux à sang chaud, (ii) être présent quand les pathogènes sont présents et absent quand l'échantillon n'est pas contaminé, (iii) être présent en plus grand nombre que les pathogènes, (iv) être capable de survivre de la même manière que les pathogènes dans l'environnement, (v) ne pas être capable de se multiplier dans l'environnement, (vi) être détectable et quantifiable facilement, rapidement et par des méthodes peu coûteuses et enfin (vii) être non pathogène (Ishii et Sadowsky 2008). Les *E. coli* et les entérocoques sont généralement considérés comme étant de bons indicateurs de contamination fécale.

Leur présence dans les eaux ou les aliments témoigne d'une contamination fécale et donc d'un risque de propagation de germes transmissibles par voie oro-fécale tels que les salmonelles, les *Campylobacter spp.* ou les norovirus, par exemple. La consommation d'eau ou d'aliments contenant des *E. coli* en quantité importante peut présenter un danger pour l'Homme.

Ils sont les plus corrélés à l'apparition d'infections ou d'intoxications au niveau des eaux de baignade en eau douce ou marine (Crowther *et al.*, 2002).

Si les *E. coli* sont utilisés comme indicateur de contamination fécale pour classer les zones de baignade et les zones conchylicoles en Europe, ils présentent toutefois quelques limites : ils persistent moins longtemps en eau de mer et dans les coquillages que d'autres bactéries pathogènes ou des virus entériques (Marino *et al.*, 2005, Love *et al.*, 2010). Les entérocoques semblent mieux persister en eau de mer et seraient donc de meilleurs indicateurs que les *E. coli* en zone littorale (Love *et al.*, 2010).

## 2. Classification des zones de baignade

Le contrôle sanitaire des eaux de baignade est actuellement défini par la directive européenne 2006/7/CE (Anonyme 2006) basée sur la détection des indicateurs de contamination fécale : entérocoques et *E. coli*. Cette réglementation définit trois seuils de qualité en fonction de la corrélation entre les concentrations en *E. coli* et en entérocoques mesurées dans l'eau ; d'excellente à suffisante. Au delà de ces seuils les eaux sont considérées de qualité insuffisante (Tableau 12).

**Tableau 12** : Réglementation sanitaire microbiologique des eaux intérieures et des eaux côtières et de transition selon la directive 2006/7/CE

Paramètres <sup>a</sup> (NPP/100 ml)	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthode de référence pour l'analyse
<i>E. coli</i>	500 <sup>b,d</sup> /250 <sup>b,e</sup>	1 000 <sup>b,d</sup> /500 <sup>b,e</sup>	900 <sup>c,d</sup> /500 <sup>c,e</sup>	ISO 9308-3 ou ISO 9308-2
Entérocoque	200 <sup>b,d</sup> /100 <sup>b,e</sup>	400 <sup>b,d</sup> /200 <sup>b,e</sup>	330 <sup>c,d</sup> /185 <sup>c,e</sup>	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2

<sup>a</sup>Pour qu'une eau de baignade soit classée dans une catégorie de qualité donnée, il faut que les percentiles des résultats de dénombrement pour les deux indicateurs microbiologiques soient inférieurs aux valeurs seuils de la classe de qualité considérée.

<sup>b</sup>Valeurs seuils à comparer aux percentiles 95 des mesures microbiologiques.

<sup>c</sup>Valeurs seuils à comparer aux percentiles 90 des mesures microbiologiques

<sup>d</sup>Eaux intérieures

<sup>e</sup>Eaux côtières et de transition

Les États membres de l'Union Européenne établissent alors un classement des eaux en fonction de cette norme. En France, la période de suivi couvre l'ensemble de la saison balnéaire du 15 juin au 15 septembre lorsque les sites de baignade sont régulièrement fréquentés, avec une fréquence de prélèvements le plus souvent bimensuelle. La surveillance des zones de baignade est assurée pendant la saison estivale par les Agences Régionales de la Santé (ARS). Les résultats sont disponibles sur le site internet du ministère chargé de la santé (<http://baignade.santé.gouv.fr>).

En 2014, plus de 90 % des sites de baignade en France ont été classés d'excellente ou de bonne qualité pour les 3 345 sites de baignade suivis (EEA 2015). Seuls 3,1 % des sites ont été classés de qualité insuffisante.

L'information concernant la classification des plages doit être accessible et visible au public par le biais de tableaux d'affichage à l'entrée de chaque plage et sur le site internet du ministère de la santé (<http://baignades.sante.gouv.fr/>). En cas de classement en qualité suffisante voir insuffisante, les États adoptent les mesures nécessaires pour la gestion et l'élimination des contaminations, afin d'accroître le nombre d'eaux de baignade de bonne ou excellente qualité. En cas de classement épisodique en qualité



insuffisante, les Etats s'engagent à prendre les mesures nécessaires de gestion pour la protection et l'information des baigneurs par la mise en place d'arrêtés municipaux d'interdiction de baignade.

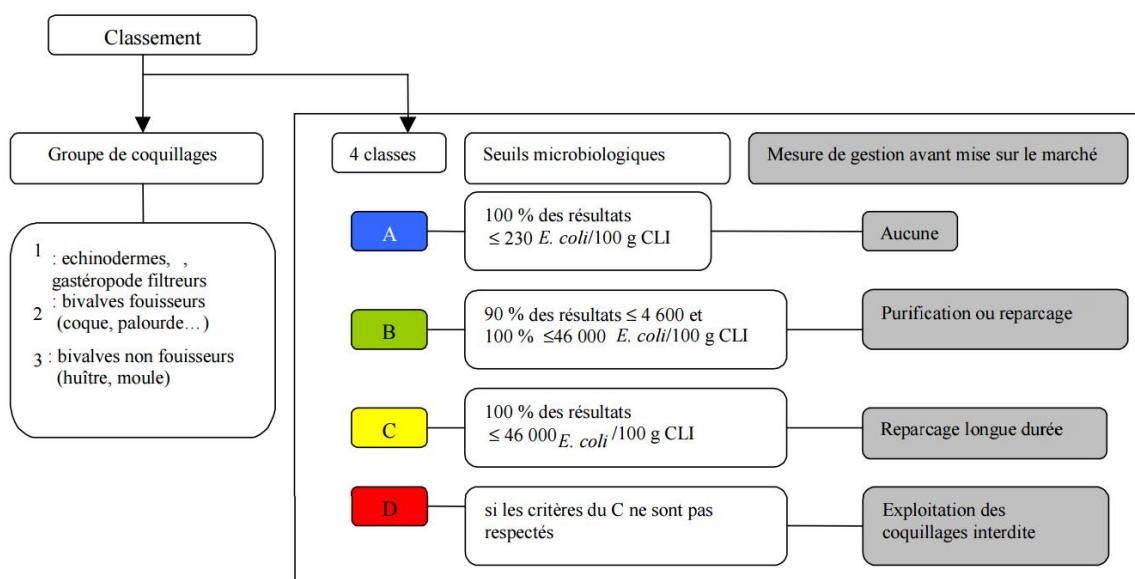
La directive 2006/07/CE impose également l'établissement d'un profil de vulnérabilité des eaux de baignade pour chaque site. Ce profil nécessite une identification et une étude des sources de contamination fécale et la mise en place d'actions sur ces sources pour améliorer la qualité des eaux.

### 3. Classification des zones conchylicoles

Les zones conchylicoles sont classées selon le Paquet hygiène et en particulierité le règlement CE/854/2004 (Anonyme 2004) et l'arrêté du 21 mai 1999 relatif au classement de salubrité et à la surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants. L'ensemble des zones de production de coquillages (zones d'élevage et de pêche professionnelle) fait ainsi l'objet d'un classement sanitaire, défini par arrêté préfectoral. Celui-ci est établi sur la base d'analyses des coquillages présents dans ces zones : analyses microbiologiques en utilisant *E. coli* comme indicateur de contamination et le dosage de la contamination en métaux lourds (plomb, cadmium et mercure). Le classement et le suivi des zones de production de coquillages distinguent trois groupes de coquillages au regard de leur physiologie :

- groupe 1 : les gastéropodes (bulots etc.), les échinodermes (oursins) et les tuniciers (violets) ; plus généralement des coquillages sauvages de gisements naturels,
- groupe 2 : les bivalves fouisseurs, c'est-à-dire les mollusques bivalves filtreurs dont l'habitat est constitué par les sédiments (palourdes, coques...) ; plus généralement des coquillages sauvages de gisements naturels,
- groupe 3 : les bivalves non fouisseurs, c'est-à-dire les autres mollusques bivalves filtreurs (huîtres, moules...) ; plus généralement des coquillages d'élevage.

En France, l'estimation de la qualité microbiologique des coquillages des zones de production utilise les données acquises en surveillance régulière par le Réseau de contrôle Microbiologique (REMI) de l'Ifremer, sur des périodes de trois années consécutives (années calendaires). L'interprétation des données se fait par rapport aux seuils microbiologiques en vigueur établis par le règlement CE/854/2004 associé à des règles de gestion strictes avant la mise sur le marché (Figure 17)



**Figure 17** : Exigences réglementaires microbiologiques issues du classement des zones conchylicoles [Règlement (CE) n° 854/2004 et arrêté du 06/11/2013 fixant les conditions sanitaires de transfert et de traçabilité des coquillages vivants]

En France, en 2015, 51 sites relatifs à la production de coquillages appartenant au groupe 1, 182 pour les coquillages du groupe 2 et 328 pour les coquillages du groupe 3, ont été suivis le plus souvent mensuellement ; soit un total de 561 sites. Vingt-trois pourcents des zones ont été classés en catégorie A, 68 % en catégorie B, 6 % en catégorie C et 3 % en catégorie D (<http://www.zones-conchylicoles.eaufrance.fr>).

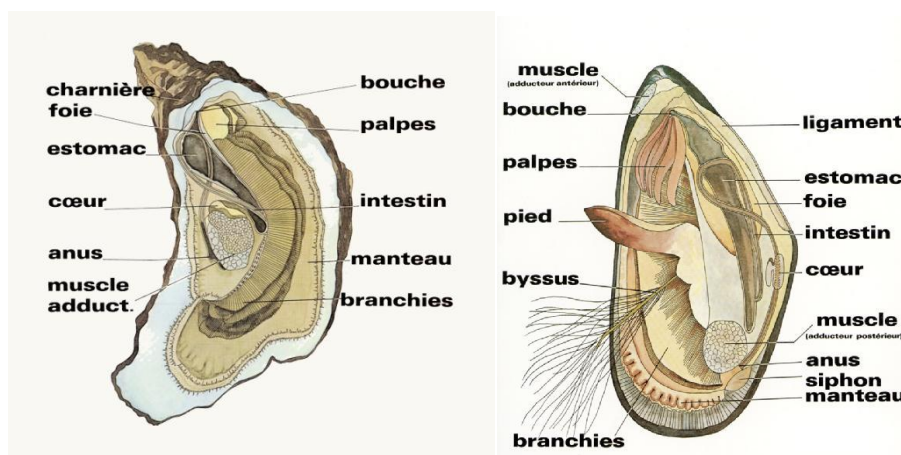
En France, la mise en évidence d'épisodes de forte contamination par le suivi du REMI, faisant suite à de fortes pluies ou à la présence de rejets non contrôlés, fait l'objet de bulletins d'alertes transmis aux autorités compétentes locales et nationales. La persistance de la contamination peut faire l'objet d'une mesure de gestion par le préfet (fermeture temporaire de la zone ou modification du classement).

Dès lors que les coquillages sont considérés comme des produits alimentaires, ils font l'objet d'une réglementation liée à la manipulation, au conditionnement et au traitement en vue de leur commercialisation. La réglementation qui classe les zones conchylicoles selon leur qualité sanitaire prévoit les mesures de traitements adéquats pour chaque catégorie de coquillages avant la mise sur le marché (Figure 17).

Le traitement des coquillages est basé principalement sur leur propriété physiologique liée à leur capacité à filtrer de grandes quantités d'eau et ainsi à éliminer les contaminants microbiologiques éventuellement présents dans les coquillages. L'élimination des microorganismes se fait par le reparcage des coquillages issus du milieu naturel dans des bassins d'eau de mer propre et traitée pour une durée plus ou moins longue selon la catégorie de la zone pour obtenir une concentration en *E. coli*  $< 230$  *E. coli*/100 g CLI (limite de commercialisation).

### C. Contamination et décontamination des coquillages

Les bivalves sont des organismes filtreurs qui par ce mécanisme physiologique complexe, captent et concentrent les particules de tailles variables entre 5 et 200  $\mu\text{m}$ , de type phytoplancton, algues microscopiques, divers débris présents dans leur environnement pour se nourrir. Un mouvement ciliaire assure le tri des particules puis leur transport jusqu'à la bouche de l'animal (Burkhardt et Calci 2000). Les microparticules sont ensuite ingérées, digérées *via* le tractus digestif et éliminées par les phénomènes de digestion et/ou de défécation (Figure 18). Une huître peut filtrer entre deux et six litres d'eau par heure par gramme de poids sec, tandis que les moules peuvent filtrer entre 0,3 à 2 litres d'eau par heure par gramme de poids sec (Gosling 2015).



**Figure 18** : Schéma de l'anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (gauche) et de la moule *Mytilus edulis* (droite)

Parmi les particules filtrées par les coquillages, les bactéries ou les virus potentiellement pathogènes pour l'Homme peuvent être présents car fixés aux éléments nutritifs. Leur présence dans les coquillages peut conduire à l'apparition de TIAC (maladie à déclaration obligatoire) lors de leur consommation (Iwamoto *et al.*, 2010, Iritani *et al.*, 2014, Loury *et al.*, 2015). En France, en 2013, 102 foyers de TIAC sur 1 086 recensés étaient liés à la consommation de coquillages, dont 48 liés à la présence de virus entériques (InVS 2013).

Ces microorganismes de la même façon que les éléments nutritifs, peuvent être éliminés par le phénomène de digestion et de défécation de l'organisme filtreur. Le comportement des bactéries entériques pathogènes dans le coquillage est encore mal connu. Cependant, des études en microcosmes ont montré que les bactéries, telles que les salmonelles se concentraient préférentiellement au niveau des tissus digestifs du coquillage puis se retrouvaient dans les cellules des tissus conjonctifs profonds (Morrison *et al.*, 2011).

Pour les virus entériques, certaines souches de norovirus (souches du génogroupe I) se lient aux tissus d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) via des ligands carbohydrates, proches des ligands caractérisés chez l'Homme (Drouaz *et al.*, 2015).

Dans le coquillage, les bactéries entériques ne sont que de « passage » contrairement aux norovirus (Guyader *et al.*, 2013). Ce phénomène est utilisé pour dépurifier les coquillages contaminés par des bactéries.

Les coquillages sont capables de concentrer les microorganismes, ce phénomène est appelé la bioaccumulation. Le facteur de bioaccumulation, traduit le niveau de concentration des microorganismes dans le coquillage par rapport à la concentration dans le milieu. Ce facteur est extrêmement variable d'un bivalve à l'autre et dépend des facteurs biologiques propres à chaque organisme (état physiologique, taille, espèce) et des facteurs environnementaux (température, salinité) (Jozic *et al.*, 2012, Derolez *et al.*, 2013). Le facteur de bioaccumulation de l'indicateur *E. coli* peut varier entre 0,9 et 9,8 chez les moules et entre 0,9 et 10,3 chez les huîtres en microcosme et entre 0,1 et 406 chez les huîtres dans l'environnement (Tableau 13).

**Tableau 13** : Facteur de bioaccumulation de l'indicateur de contamination fécale *E. coli* dans les huîtres et les moules. nd : non déterminé.

	Espèce	Facteur de bioaccumulation	Température	Référence
<b>Microcosme</b>	Moule ( <i>M. galloprovincialis</i> )	1,1-1,3	14-21°C	Marino <i>et al.</i> , 2005
	Huître ( <i>C. virginica</i> )	3,8	14-30°C	Burkhardt et Calci 2000
	Moule ( <i>M. edule</i> )	0,9-7,7	nd	Campos <i>et al.</i> , 2013
	Huître ( <i>C. gigas</i> )	0,9-10,3	nd	Campos <i>et al.</i> , 2013
<b>In situ</b>	Huître (nd)	2-146	12,6-30,4°C	Shieh <i>et al.</i> , 2003
	Huître ( <i>C. gigas</i> )	0,1-406	5,7-15°C	Derolez <i>et al.</i> , 2013

Plusieurs études se sont focalisées sur le comportement des *E. coli* face au phénomène de bioaccumulation dans les coquillages (Marino *et al.*, 2005, Younger et Reese 2013). La cinétique de contamination par *E. coli* des bivalves filtreurs se traduit par une relation hyperbolique ; le temps de bioaccumulation nécessaire pour obtenir une contamination maximale dans les coquillages est très rapide de l'ordre d'une heure. Ensuite, on observe un équilibre cinétique entre la concentration des bactéries dans le coquillage et dans l'eau de mer.

La vitesse de contamination est très dépendante des conditions environnementales comme la température de l'eau ou la concentration initiale en bactéries. Cette vitesse diminue lorsque la température de l'eau diminue (Jozic *et al.*, 2012).

Comme pour la phase de contamination, la phase de dépuración des coquillages par *E. coli* est très rapide de l'ordre parfois de deux à six heures pour passer au-dessous du seuil d'acceptabilité de la réglementation qui est de  $< 230$  UFC/100 g (ou  $2,4 \log_{10}$  UFC/100 g) de CLI (Marino *et al.*, 2005). Les paramètres physico-chimiques comme la température de l'eau et la salinité jouent un rôle important dans l'efficacité de la dépuración des coquillages. De meilleurs rendements de purification sont observés à la température de  $25^{\circ}\text{C}$  comparé à  $18$  ou  $12^{\circ}\text{C}$  (Love *et al.*, 2010). L'espèce du bivalve est également un paramètre à prendre en compte dans l'efficacité de la dépuración puisque les paramètres physiologiques ou le potentiel de filtration diffèrent d'une espèce à l'autre ; par exemple, à une concentration en *E. coli* de  $3 \log_{10}$  UFC/ 100 g de CLI, à  $25^{\circ}\text{C}$ , salinité 28 ‰, pH 8, 1,1 jour est nécessaire pour que la concentration en *E. coli* passe en dessous du seuil critique de commercialisation ( $< 230$  UFC/100 g CLI) chez l'huître, alors que 2,8 jours sont nécessaires pour des palourdes. Ces valeurs augmentent quand la concentration en *E. coli* augmente pour les deux espèces (Love *et al.*, 2010).

Sur la base de ces observations, la dépuración des coquillages selon la réglementation CE/854/2004 est un phénomène contrôlé et normé avec l'utilisation de bassins de dépuración (Figure 19). La dépuración s'effectue suite au passage des coquillages contaminés dans une eau propre et traitée afin d'éliminer les résidus de pathogènes rejetés dans l'eau par les coquillages. Cette eau peut être traitée de différentes manières par irradiation aux UV, ozonisation, ou récemment par électrolyse de l'eau de mer, basée sur le cycle perpétuel de transformation du sel en chlore et inversement, qui agit comme un puissant oxydant-désinfectant naturel (Kasai *et al.* 2011, Oliveira *et al.*, 2011).



**Figure 19** : Photo de bassin de dépuración d'huîtres

#### **D. Sources et apports de *E. coli* dans l'environnement littoral**

La contamination de l'environnement littoral par *E. coli* résulte de la présence de trois principales sources de contamination fécale, provenant essentiellement des bassins versants en amont : i) les sources d'origine urbaine caractérisées principalement par les eaux usées et les rejets domestiques, ii)

les sources d'origine agricole caractérisées par les déjections des animaux tels que les bovins et les ovins en pâturage et les effluents d'animaux d'élevage (lisiers et fumiers) et iii) les sources environnementales caractérisées par la présence d'oiseaux et d'animaux sauvages (Campos *et al.*, 2013).

## 1. Sources d'origine urbaine

Les sources d'origine urbaine sont essentiellement représentées par les effluents des stations d'épuration (STEP), traitées ou non et les eaux usées issues des habitats dispersés.

L'Homme excrète par jour, *via* ses fèces, d'importantes concentrations en *E. coli* comprises entre 5 et  $8,6 \log_{10}$  UFC/g de fèces (Tableau 14). *E. coli* se retrouve ensuite dans les fosses septiques et dans les réseaux d'assainissement puis au niveau des stations d'épuration.

Les stations d'épuration qui collectent et traitent les eaux usées permettent principalement l'élimination des composés carbonés, l'azote et le phosphore et plus ou moins efficacement, l'élimination des microorganismes entériques. Toutefois, les rejets de ces stations constituent encore une source importante de contamination des eaux environnementales. La France comptait en 2010, 18 637 stations de traitement des eaux usées sur l'ensemble du territoire (métropole et DOM) traitant une charge de pollution de 75 million Equivalent Habitant (estimation de la quantité de pollution émise par personne et par jour).

Ces stations de traitement permettent de diminuer les concentrations en microorganismes (de 1,6 à  $3 \log_{10}$  de *E. coli*) par différentes filiales de traitement : boues activées, boues activées associées à des membranes filtrantes, lagunage naturel, traitements tertiaires utilisant les rayonnements UV, la température, la chloration ou l'ozone (Pfannes *et al.*, 2015, Lueddeke *et al.*, 2015, Tondera *et al.*, 2015).

La performance des usines de traitement et leur capacité de stockage ainsi que l'entretien des infrastructures de transport des eaux usées du domicile à la station d'épuration tels que le fonctionnement des postes de relèvement ou l'état des conduites sont des points critiques qui influencent les rejets de *E. coli* dans l'environnement (Campos *et al.*, 2013).

Les boues de STEP épandues dans les champs peuvent aussi constituer un risque de contamination de l'environnement par les bactéries entériques.

**Tableau 14** : Concentrations en *E. coli* présentes au niveau des fèces humaines et de différentes sources urbaines

Sources urbaines	Concentrations en <i>E. coli</i>	Références
Fèces humaines	7,4 - 8,4 log <sub>10</sub> UFC/ g	Smati <i>et al.</i> , 2015
Eaux usées brutes	7 - 7,4 log <sub>10</sub> cellules/100 mL	Wéry <i>et al.</i> , 2008
Eaux usées traitées	2,9-3,7 log <sub>10</sub> UFC/100 mL	Gourmelon <i>et al.</i> , 2010
	4,8-5,8 log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> /100 mL	Lueddeke <i>et al.</i> , 2015
Eaux de fosses septiques	4,3-5,3 log <sub>10</sub> NPP/100 mL	Appling <i>et al.</i> , 2013

Les habitations trop dispersées pour être raccordées au réseau d'assainissement collectif (traitement des eaux usées au niveau des STEP) doivent disposer d'un système d'assainissement autonome qui permet l'infiltration des eaux usées dans le sol après une épuration partielle grâce à l'action de microorganismes au niveau des fosses septiques. Si la conformité de l'installation n'est pas respectée ou si elle n'a pas un bon fonctionnement, ce type d'installation peut être une source de pollution. De plus, la multiplication de *E. coli* dans les fosses septiques a été démontrée dans une étude où la concentration initiale mesurée était de 4,3 log<sub>10</sub> NPP/100 mL et passait à >5,38 log<sub>10</sub> NPP/100 mL (seuil supérieur de détection de la méthode) en deux semaines (Appling *et al.*, 2013).

Dans les zones fortement industrialisées, les rejets industriels portuaires peuvent également alimenter la source de contamination urbaine en *E. coli* entre 0,7 et 4 log<sub>10</sub> UFC/ 100 mL d'eau (Servais *et al.*, 2007).

Les risques de contamination de l'environnement sont souvent augmentés par temps de pluie. Les eaux usées urbaines non traitées dans les STEP, du au débordement des égouts et à l'engorgement des STEP, sont une source potentielle de contamination. Le ruissellement de ces eaux dans l'environnement peut être un apport supplémentaire en *E. coli* à hauteur de 4,5 à 5,5 log<sub>10</sub> UFC/100 mL (Parker *et al.*, 2010).

## 2. Sources d'origine agricole

Les sources d'origine agricole sont caractérisées par la présence d'élevages plus ou moins intensifs d'animaux tels que les bovins, les porcs, les ovins et la volaille et l'exploitation des terres pour les cultures. Les animaux d'élevage génèrent une quantité importante de fèces avec des concentrations en *E. coli* variant entre 3,1 et 9,5 log<sub>10</sub> UFC/ g fèces selon l'espèce animale considérée (Tableau 15). Ces fèces peuvent être retrouvées dans les pâturages avec les élevages en plein air.

**Tableau 15** : Concentrations en *E. coli* dans les fèces d'animaux d'élevage (d'après Cox *et al.*, 2005, Smati *et al.*, 2015)

Sources animales	Concentrations en <i>E. coli</i> (log <sub>10</sub> UFC/ g fèces)
<b>Bovins</b>	3,1 ó 8,9
<b>Ovins</b>	5 ó 8,3
<b>Porcs</b>	5,8 ó 8,6
<b>Volaille</b>	6,2 ó 8,7
<b>Chèvres</b>	4,7 ó 9,5

Dans les fermes, les fèces des animaux tels que les porcs et les bovins sont souvent mélangées aux eaux de lavage pour former les lisiers ou à la litière des animaux pour former le fumier. Ces effluents sont ensuite éliminés : i) par traitement au niveau des exploitations avec des étapes de traitements par boues activées, par centrifugation, par compostage ou par lagunage selon les exploitations, ii) par exportation dans d'autres régions ou iii) par épandage sur les terres agricoles.

Au niveau des zones agricoles, les habitats dispersés et les exploitations agricoles sont aussi des sources de contamination potentielles de l'environnement.

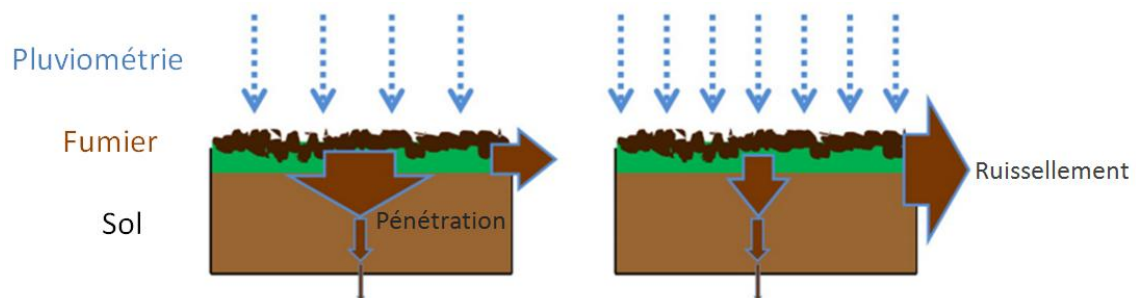
Les effluents porcins, bovins et de volaille non traités peuvent contenir de fortes concentrations en *E. coli* comprises entre 2,3 et 8,3 log<sub>10</sub> *E. coli*/g de lisier de porcs, entre 4,2 et 9,4 log<sub>10</sub> *E. coli*/g de fumier de bovins et entre 0,1 et 4,3 log<sub>10</sub> *E. coli*/g de litière de volaille (Tableau 16). Ces effluents traités ou non sont utilisés pour fertiliser les sols cultivables et des concentrations en *E. coli* entre 3 et 4,5 log<sub>10</sub> UFC/g lisier épandu peuvent alors être mesurées sur le sol cultivé (Jensen *et al.*, 2013).

**Tableau 16** : Concentration en *E. coli* dans les effluents de porcs, de bovins et de volaille

Sources	Concentration en <i>E. coli</i>	Références
<b>Lisiers porcins non traités</b>	2,3-6,6 log <sub>10</sub> cellules/ g	Marti <i>et al.</i> , 2010
	4,5 ±3,8 log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> / g	Jaffrezic <i>et al.</i> , 2011
<b>Lisiers porcins traités</b>	1,6-3 log <sub>10</sub> cellules/ g	Marti <i>et al.</i> , 2010
	4,3 ±0,4 log <sub>10</sub> MPN/ g	Mieszkin <i>et al.</i> , 2009
<b>Fumiers bovins non traités</b>	4,2-4,5 log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> / g	Johannessen <i>et al.</i> , 2004
	4,7 ±4,7 log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> / g	Jaffrezic <i>et al.</i> , 2011
<b>Fumiers bovins traités</b>	2,1 log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> / g	Klein <i>et al.</i> , 2011
	0,8-2,8 log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> / g	Johannessen <i>et al.</i> , 2004
<b>Litières de volaille non traitées</b>	2,2 ±2,1 log <sub>10</sub> <i>E. coli</i> / g	Cook <i>et al.</i> , 2014
<b>Litières de volaille traitées</b>	1,4-2 log <sub>10</sub> UFC/ g	Shepherd <i>et al.</i> , 2010



Les risques de contamination de l'environnement par les sources agricoles sont augmentés par temps de pluie en raison des ruissellements au niveau des sièges des exploitations et dans les champs sur lesquels les effluents sont épandus (Blaustein *et al.*, 2016) (Figure 20).



**Figure 20** : Influence du niveau de pluviométrie sur la pénétration et le ruissellement de fumier épandu sur le sol (d'après Blaustein *et al.*, 2016)

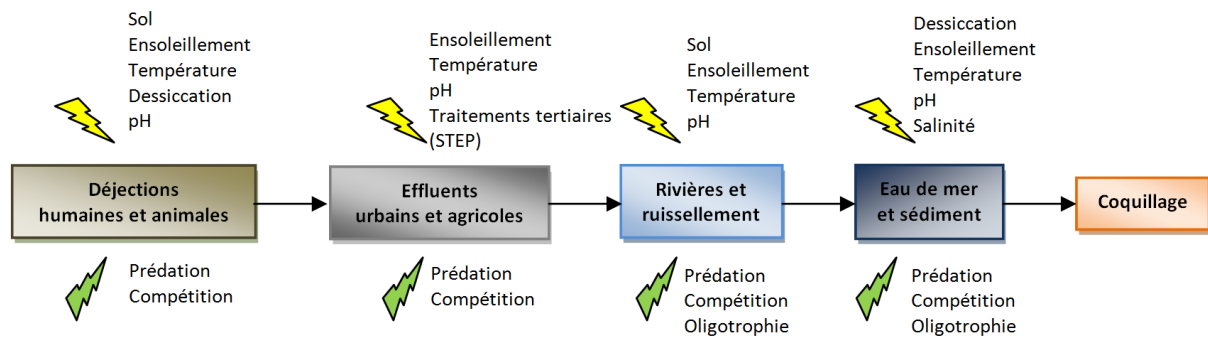
### 3. Sources environnementales : les animaux sauvages

Les animaux sauvages présents dans les forêts et les terres non cultivées (sangliers, cerfs, lapins, oiseaux, etc.) participent à la contamination en *E. coli* de l'environnement (Goto et Yan 2011). Les animaux en contact avec les points d'eau et les rivières, participent à la contamination de l'environnement à hauteur de 7,1 log<sub>10</sub> UFC/g de fèces pour les sangliers ou de 6,1 log<sub>10</sub> UFC/g fèces pour les cerfs (Smati *et al.*, 2015).

Les oiseaux sauvages comme les goélands, les mouettes ou les canards présents sur le littoral sont également des sources de contamination potentielle en *E. coli* entre 5 et 9 log<sub>10</sub> UFC/g de fèces (Araújo *et al.*, 2014, Withman *et al.*, 2014)

#### E. *E. coli* de la source à l'environnement littoral

Les *E. coli* dans l'environnement suivent une « chaîne de contamination » de leur émission jusqu'à leur arrivée dans l'eau (Figure 21). A chaque étape, les *E. coli* sont soumis à des facteurs biotiques et abiotiques influençant leur devenir dans les différents compartiments. Les facteurs intrinsèques propres à chaque bactérie sont également des facteurs importants dans la survie et la persistance des souches dans l'environnement (Campos *et al.*, 2013).



**Figure 21** : Chaîne de contamination des *E. coli* de la source au coquillage. Identification des facteurs abiotiques (jaune) et biotiques (vert) présents au niveau de chaque compartiment agissant sur la survie des *E. coli*. STEP : station d'épuration

### Les déjections humaines et animales

A la source, dans les fèces humaines et animales, les *E. coli* sont présents à des concentrations variables entre 3,1 et 9,5 log<sub>10</sub> *E. coli*/100 g. Dans ce compartiment, la fraction de *E. coli* pathogènes type STEC peut être entre 1,4 et 3 % dans les fèces humaines et entre 15 et 75 % dans les fèces des animaux. Certains STEC sont capables de persister de deux mois à 38 mois dans les fèces de bovins (Frémaux *et al.*, 2010, Joris *et al.*, 2013, Widgren *et al.*, 2015) et jusqu'à 11 mois dans les fèces de moutons (Amezquita-Lopez *et al.*, 2012). Les EPEC sont capables de survivre jusqu'à 24 mois dans les fèces humaines (Shetty *et al.*, 2012). Le facteur le plus influent pour la survie des *E. coli* dans ce compartiment est la disponibilité en eau ( $a_w$ ) généralement liée aux variations de température. Plus la température est basse, plus  $a_w$  est élevée : au-dessus de 22°C,  $a_w$  des fèces de bovins en fin de stockage est inférieure à 0,5, alors qu'elle reste voisine de 0,99 pour un stockage à +5°C (Wang *et al.*, 1996). Les paramètres biotiques, telles que la prédation et la compétition avec la flore totale fécale sont des éléments qui interviennent également sur la survie des *E. coli* dans les fèces concernant la disponibilité en nutriments.

### Les effluents urbains et agricoles

Parmi les *E. coli* retrouvés dans les eaux usées urbaines, les STEC peuvent être présents dans 10 à 53 % des échantillons de STEP (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002). Au niveau des stations d'épuration, les traitements appliqués pour éliminer les microorganismes impactent la survie des *E. coli*. Par exemple, le traitement par filtration ou le traitement thermique permet de réduire la population entre 1,4 et 2,3 log<sub>10</sub> au niveau des eaux usées (Marin *et al.*, 2015). Les EPEC peuvent être détectés jusqu'à 13 mois au niveau des eaux usées de STEP et dans les sols présents à proximité des stations (Yang *et al.*, 2014).

Les lisiers et les fumiers peuvent contenir des *E. coli* à des concentrations de 4,2 à 4,5 log<sub>10</sub> UFC/ 100 g fèces. La prévalence de STEC dans les effluents agricoles peut être détectée dans 9 % des lisiers de

porcs analysés et dans 11 % des fumiers de bovins a été reportées dans l'étude de Vernozzy-Rozand *et al.*, (2002). Selon le type de sols amendés par des fumiers et des lisiers en parcelles expérimentales, les *E. coli* peuvent être retrouvés entre 110 jours et plus d'un an, selon la disponibilité en eau et en nutriments sur les sols (Brennan *et al.*, 2010, Moynihan *et al.*, 2015). Les STEC sont capables de résister dans ce compartiment à la dessiccation et à l'exposition solaire et de persister dans les sols amendés par des lisiers jusqu'à quatre mois (Frémaux *et al.*, 2007).

Lors de fortes pluies les *E. coli* peuvent se retrouver dans les eaux de ruissellement et les rivières.

### **Les rivières et les eaux de ruissellement**

Concernant les eaux de rivières, il a été reporté que dans des rivières impactées par des apports urbains, les concentrations en *E. coli* peuvent varier entre 1,7 et 2,6 log<sub>10</sub> UFC/ 100 mL et pour celles impactées par des apports agricoles les concentrations peuvent varier entre 1,8 et 2,2 log<sub>10</sub> UFC / 100 mL (Walters *et al.*, 2011). Des *E. coli* ont été détectés au niveau de la colonne d'eau douce entre 2 et 16 mois (Ouattara *et al.*, 2011, Widmer *et al.*, 2013). L'étude de Watterworth *et al.*, (2006) a mis en évidence que les STEC présents dans l'eau douce sont capables de survivre entre 38 et 56 jours à 10°C.

### **L'eau de mer et le sédiment**

L'étude de Walters *et al.*, (2011) a mis en évidence que les concentrations en *E. coli* peuvent varier entre 1,7 et 2,3 log<sub>10</sub> UFC /100 mL dans l'eau de mer. Les *E. coli* dans ce compartiment sont soumis à un facteur abiotique supplémentaire limitant la survie des bactéries : la salinité. En microcosmes d'eau de mer et d'eau douce, les *E. coli* sont détectables pendant au moins 60 jours dans l'eau douce alors que dans l'eau de mer les *E. coli* ne sont plus détectables à partir du 20<sup>ème</sup> jour d'expérimentation (Solecki *et al.*, 2011). Un taux de décroissance des *E. coli* dans l'eau de mer de -4,2 log<sub>10</sub> UFC /100 mL et dans l'eau douce de -0,4 log<sub>10</sub> UFC /100 mL a été reporté par Anderson *et al.*, (2005). L'ensoleillement est également un facteur très présent au niveau l'eau de mer, où les T90 (temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus cultivables) peuvent descendre jusqu'à 2,2 heures (Salomon et Pompey 1990). Whitman et Nevers (2003) ont montré que dans le sédiment, les *E. coli* peuvent être présents entre 2 et 4 log<sub>10</sub> UFC /100 g. La dessiccation et l'oligotrophie semblent être les deux facteurs les plus influents au niveau du sédiment. Whitman *et al.*, (2014) ont mis en évidence que les *E. coli* étaient capables de persister jusqu'à 35 jours en microcosme à 19°C et jusqu'à 45 jours *in situ*.

Peu d'études existent sur la persistance des *E. coli* pathogènes type STEC dans le milieu marin à proprement parlé. Néanmoins *in vitro*, une étude a montré qu'un *E. coli* de sérotype O157:H7 était capable de survivre dans le sédiment marin et d'être relargé dans la colonne jusqu'à cinq jours

(Williams *et al.*, 2007). Cet agent pathogène est également capable de survivre pendant au moins 15 jours dans l'eau de mer (Miyagi *et al.*, 2001). Cependant, son activité métabolique diminue avec l'augmentation de la concentration en sel dans le milieu (Williams *et al.*, 2007). En microcosme d'eau de mer, l'apport d'éléments nutritifs favorables, peut ré-activer le pouvoir pathogène du sérotype O157 :H7 (Williams *et al.*, 2012).

Certaines souches de *E. coli* pathogènes ont été détectées ou isolées dans l'environnement marin comme un *E. coli* O157 dans des eaux de ballasts de bateaux en Inde (concentration > 2,5 *E. coli* log<sub>10</sub>/ mL) (Ramaiah *et al.*, 2005).

### **Les coquillages**

Dans des coquillages du littoral français, des concentrations en *E. coli* ont été reportées entre 2 et 3,4 log<sub>10</sub> NPP/100 g de CLI (Gourmelon *et al.*, 2006, Mieszkin *et al.*, 2013). A notre connaissance, aucune étude n'existe sur la persistance des souches de *E. coli* pathogènes de type STEC et EPEC dans les coquillages *in situ*. En microcosme, l'étude de la cinétique de décontamination de coquillage met en évidence qu'en moyenne les souches de *E. coli* ne persistent pas plus de quelques jours. Néanmoins, deux souches de sérotype O157 :H7 (STEC=1, EPEC=1) et cinq souches non-O157 (STEC) ont été isolées dans des coquillages sur le littoral français (Guyon *et al.*, 2000, Gourmelon *et al.*, 2006). De plus, les gènes *stx* ont été détectés dans plusieurs lots de coquillages issus du littoral marocain mais aucune souche n'a pu être isolée (Bennani *et al.*, 2011).

En dehors de l'environnement littoral, les STEC ont également été détectés dans des coquillages ou des produits de la mer ; deux lots de coques destinés à la commercialisation, positifs à O157 (Samadpour *et al.*, 1994). Des souches O157 *stx*+ ont été isolées à partir de lots d'huîtres et de crevettes commercialisés (Rampersad *et al.*, 1999, Sanath-Kumar *et al.*, 2001, Surendraraj *et al.*, 2010). Des souches non-O157 *stx*+ ont été détectées et isolées (n=5) à partir de produits de la mer (palourdes, crevettes, poissons) commercialisés (Kumar *et al.*, 2004, Manna *et al.*, 2008).

# MEMOIRE EXPERIMENTAL

---



## ***AXES DE RECHERCHE***

Les principaux axes de recherche du travail de thèse étaient : i) de rechercher la présence de *E. coli* pathogènes tels que les STEC et EPEC au niveau de zones conchylicoles, ii) de caractériser les souches STEC et EPEC éventuellement présentes et d'estimer si possible leur virulence et iii) d'évaluer le comportement de souches STEC dans les coquillages par rapport à l'indicateur *E. coli*, vis-à-vis de la cinétique de contamination et de décontamination des coquillages.

Ces principaux axes de recherche ont conduit à la réalisation de trois étapes majeures :

- Le prélèvement et l'analyse d'échantillons de coquillages, de sédiments et d'eaux sur trois sites d'études sélectionnés auxquels j'ai participé pour un des trois sites.

- La caractérisation de la totalité des souches isolées sur les trois sites d'étude : sérotypage, groupage phylogénétique (classification en phylogroupe, MLST, PFGE), capacité à former des biofilms, profil d'antibio-résistance, recherche de gènes de virulence, effectuée grâce à plusieurs collaborations nationales et internationales.

- L'évaluation de la cinétique de contamination et de décontamination de coquillages par des souches STEC isolées au cours de cette étude en microcosmes.

Les travaux réalisés et les résultats acquis au cours de cette thèse sont présentés principalement, sous la forme de publications (trois dont une en préparation) et sous forme manuscrite pour le chapitre concernant l'étude de la cinétique de contamination/décontamination de coquillages.

Le chapitre 1 présente les sites d'étude et le contexte de l'étude.

Le chapitre 2 comprend le premier article qui décrit l'application de la norme ISO-TS-13136/2012, utilisée pour la détection et l'isolement des STEC hautement pathogènes, sur trois matrices de l'environnement littoral : coquillage, sédiment et eaux de rivières.

Le chapitre 3 est constitué par le second article ciblé sur la description des souches isolées à l'aide de trois méthodes de détection et d'isolement complémentaires. Il discute également de l'impact de la pluviométrie, de la distribution géographique, temporelle et matricielle des souches STEC et EPEC dans les sites d'étude. Cet article aborde également la caractérisation des souches (classification phylogénétique, profil de virulence, profil d'antibio-résistance) et la capacité à former des biofilms pour certaines souches.

Le chapitre 4 est représenté par le manuscrit en cours de finalisation qui aborde le potentiel de virulence des souches STEC et EPEC isolées dans l'environnement littoral au regard de leur profil moléculaire de virulence.

Enfin, le chapitre 5 présente les résultats obtenus concernant l'étude de la cinétique de contamination et de décontamination d'huîtres au contact de souches STEC en microcosmes d'eau de mer.

Pour finir, la dernière partie de ce manuscrit présente une discussion des résultats obtenus au cours de cette thèse ainsi que les perspectives de recherche dégagées à l'issue de ce travail.



## ***Chapitre 1 : CONTEXTE ET DESCRIPTION DES SITES D'ÉTUDES***

Dans le cadre du projet Riskmanche dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, les partenaires français (Ifremer de Brest, Université de Caen et CNRS Géosciences de Rennes) ont sélectionné trois sites conchylicoles sur la côte Nord-Ouest de la France : un en Région Bretagne et deux en Région Basse-Normandie.

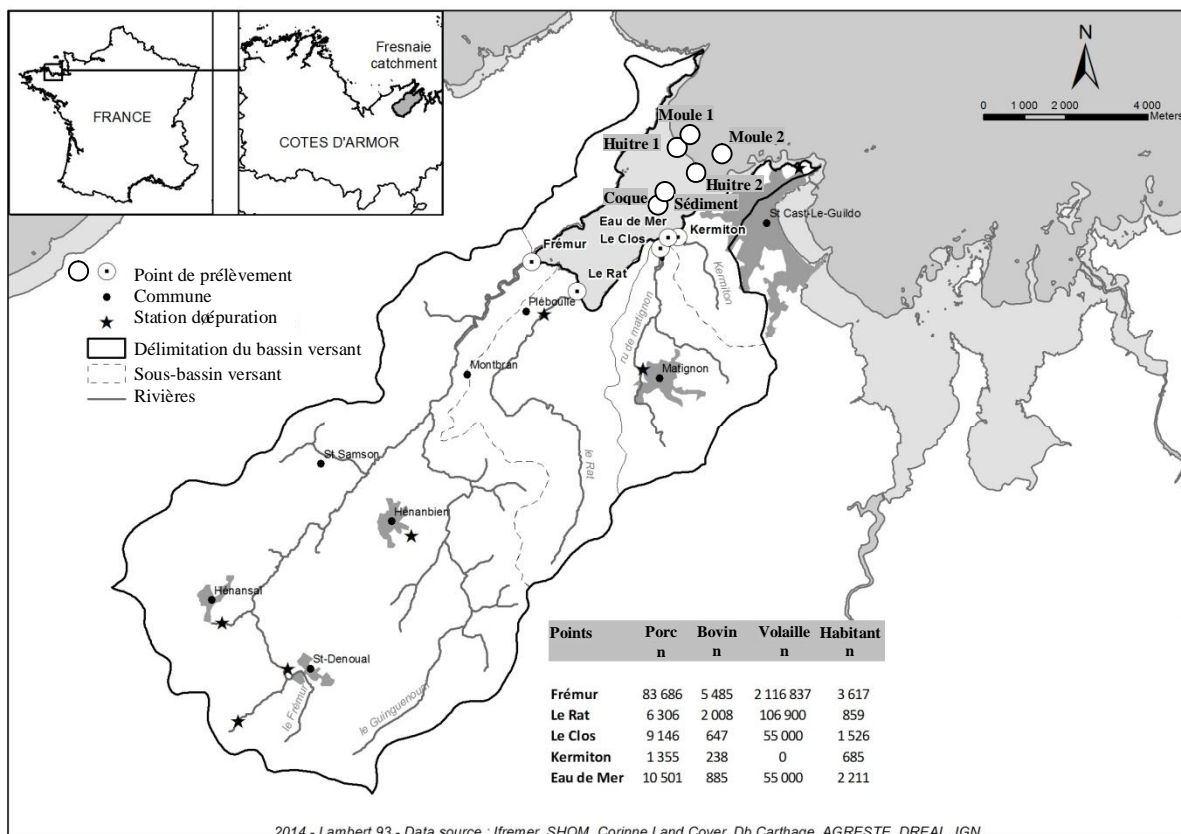
### **A. Site sélectionné en Région Bretagne**

Le site d'étude sélectionné en région Bretagne se situe au niveau du département des Côtes d'Armor (Nord-Est de la Région Bretagne) : la baie de la Fresnaye (site 1). La baie est enfermée entre St Cast le Guildo à l'Est et le Fort la Latte à l'Ouest.

Le bassin versant de la baie de la Fresnaye couvre 121 km<sup>2</sup> et regroupe une population d'environ 12 756 habitants permanents et 34 686 habitants en période estivale.

On y trouve sept stations d'épuration, de nombreux assainissements autonomes et plus de 180 exploitations agricoles (élevages intensifs de bovins, de porcs et de volaille). Le bassin versant est représenté par 8 850 ha de surface agricole exploitée, avec 80 % de cette superficie soumis à l'épandage d'effluents agricoles.

La baie est caractérisée par la présence de quatre principaux sous-bassins versants comportant les quatre principales rivières : le Frémur (25 km de long, 65,5 km<sup>2</sup>), le Rat (16 km de long, 15,8 km<sup>2</sup>), le Clos (8,7 km de long, 13,8 km<sup>2</sup>) et le Kermiton (2,7 km de long, 5,3 km<sup>2</sup>). Les productions porcines, bovines et de volaille ainsi que la population humaine estimées sur les quatre sous-bassins versants sont présentées sur la Figure 22.



**Figure 22 :** Carte présentant le bassin versant de la baie de la Fresnaye (site 1), situé en région Bretagne et la localisation des points de prélèvements sélectionnés pour l'étude. Le nombre de porcs, de bovins, de volailles et d'habitants présents estimés au niveau des quatre sous-bassins versants principaux et du point de prélèvement en mer sont indiqués (source J. Cheve, Ifremer, Dinard).

La baie de la Fresnaye est un lieu de production d'huîtres sur table et de moules sur bouchot. Ce site regroupe à lui seul 21 professionnels exploitants. Cette zone conchylicole est classée depuis 2004 en zone B pour la production des huîtres et des moules (mollusques filtreurs du groupe 3), ce qui implique une purification des coquillages avant leur commercialisation (Anonyme 2004).

On trouve dans la baie des gisements sauvages de coques classés en catégorie C (pêche récréative interdite).

### Prélèvements sur le site 1

Dans le cadre du projet RiskManche, quatre points de prélèvement d'eau de rivière à l'exutoire des quatre sous-bassins (Le Frémur, Le Rat, Le Clos et Kermiton), un point sédiment superficiel, un point eau de mer et cinq points de prélèvement coquillages [2 huîtres (huître 1 et huître 2), 2 moules (moule 1 et moule 2) et 1 coque (coque)] ont été sélectionnés (Figure 22).

Les prélèvements ont été réalisés mensuellement de Février 2013 à Janvier 2015, un jour où le coefficient de marée était supérieur à 80.

## B. Sites sélectionnés en Région Basse-Normandie

Les deux sites d'étude sélectionnés en région Basse-Normandie sont situés dans le département de la Manche à l'intérieur de la baie de la Sienne : Le Havre de Regnéville (site 2) et le Havre de la Vanlée (site 3).

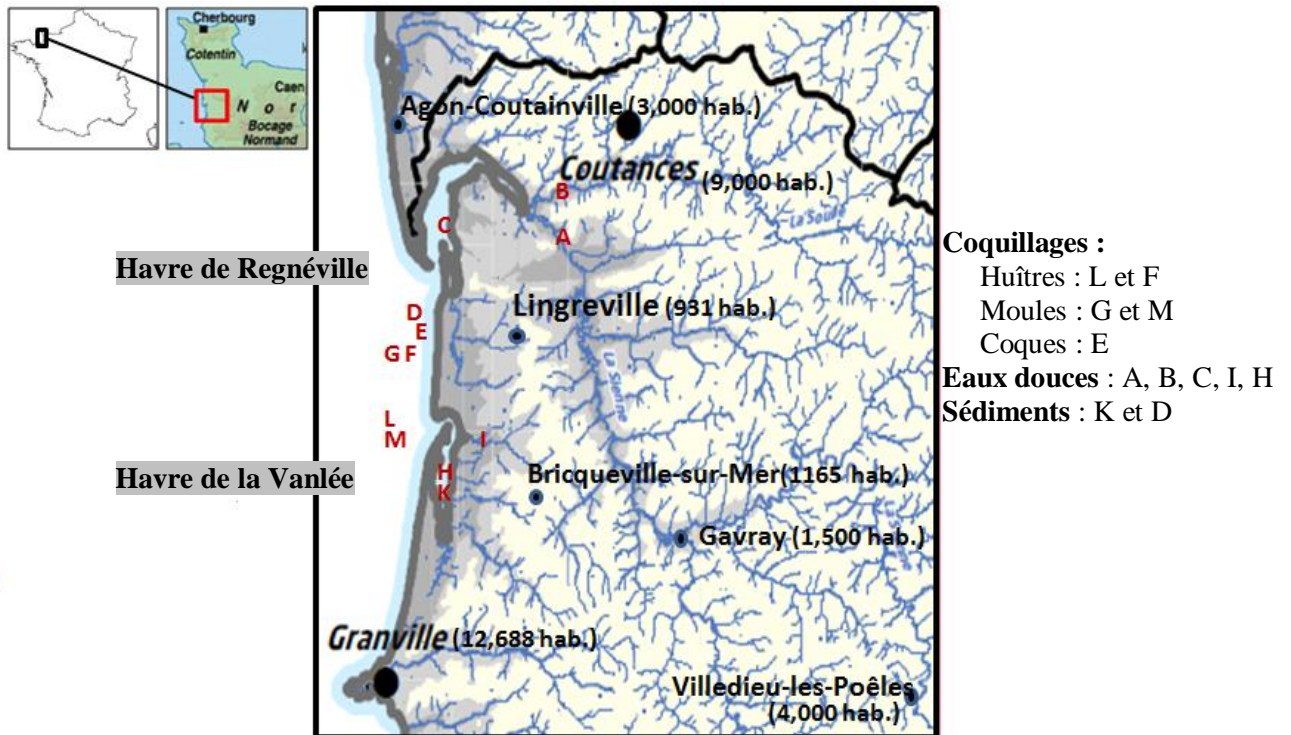
C'est une zone qui connaît, également, en été un afflux important de touristes attirés par les plaisirs de la baignade et de la pêche à pied.

Le bassin versant du Havre de Regnéville est un estuaire formé par l'embouchure de la Soules et de la Sienne. Du confluent, au pont de la Roque, à la pointe d'Agon, qui le sépare de la mer, le Havre s'étend sur 1 800 ha, avec une profondeur de plus de cinq kilomètres, ce qui en fait le plus grand bassin versant du Cotentin. Ce bassin regroupe une population de 40 000 habitants.

On y trouve 20 stations d'épuration dans la zone d'influence microbiologique rapprochée [zone de vigilance, incluant la zone immédiate dans laquelle les germes bactériologiques (issus de rejets de pollution directs, dispersés ou diffus) transportés par les cours d'eau restent sensiblement actifs pour impacter les masses d'eaux côtières]. De nombreux assainissements autonomes et plus de 1 330 exploitations agricoles [élevages intensifs de bovins (64 000 individus) et moutons de prés salés (2 700 individus)] représentant 29 800 ha de surface agricole exploitée, sont présents dans ce Havre. La baie est caractérisée par la présence des deux principales rivières : la Soules [30,6 km de long, 125 Km<sup>2</sup> (point B)] et la Sienne [92,6 Km de long, 794 Km<sup>2</sup> (point A)] (Figure 23).

Le Havre de la Vanlée est situé entre Granville et la pointe d'Agon. Le Havre s'étend sur 4 km de longueur et 2 km de largeur, il reçoit les eaux de ruissellement d'un bassin versant de 5 398 ha, regroupant une population d'environ 7 000 habitants.

Il est essentiellement composé de prés salés où l'élevage de mouton y est la principale activité. On y trouve 4 stations d'épuration et 213 exploitations agricoles dispersées sur une surface agricole de 3 066 ha [élevages intensifs de bovins (1 400 individus), de bovins (4 200 individus) et de porcs (660 individus)]. Deux rivières principales se jettent dans ce havre : Les Hardes [6 km de long (I)] et la Vanlée [8,3 km de long (H)].



**Figure 23** : Carte présentant les deux sites sélectionnés en Région Basse-Normandie : le Havre de Regnéville (site 2) et le Havre de la Vanlée (site 3), avec l'identification des points de prélèvements sélectionnés pour l'étude. Nombre d'habitants (hab.) présents dans les villes alentours.

D'un point de vue exploitation du littoral, la production annuelle conchylicole observée au niveau du Havre de Regnéville et de la Vanlée en 2014 était de 12 000 tonnes d'huître sur table et de 16 000 tonnes de moules sur bouchot. Cette zone de production conchylicole est classée en zone B pour la production des huîtres et des moules et on y trouve des gisements sauvages de coques classés en zone C.

### Prélèvements sur les sites 2 et 3

Dans le cadre du projet Riskmanche, sur le site du Havre de Regnéville (site 2), trois points de prélèvement d'eau douce (A, B et C), un point sédiment (D) et trois points de prélèvement de coquillages [1 huîtres (F), 1 moules (G) et 1 coques (E)] ont été sélectionnés. Sur le site du Havre de la Vanlée (site 3), deux points eaux douces (I et H), un point sédiment (K) et deux points coquillages [1 huîtres (L) et 1 moules (M)] ont été sélectionnés (Figure 23).

Les prélèvements ont également été réalisés mensuellement de Février 2013 à Janvier 2015 avec un coefficient de marée supérieur à 80.

### C. Les paramètres suivis au cours de l'étude globale

En plus des STEC et EPEC qui constituent le sujet de cette thèse, d'autres microorganismes potentiellement pathogènes pour l'Homme : des bactéries entériques (*Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli* et entérocoques), des bactéries marines *Vibrio spp.* et des virus entériques (norovirus) ont été également recherchés dans les prélèvements de coquillages, de sédiments et/ou d'eaux. Couplés à ces recherches de pathogènes, plusieurs paramètres ont été évalués : i) les niveaux de contamination (mesure des concentrations en *E. coli* et entérocoques) dans les coquillages et les rivières, ii) l'identification des sources de contamination fécale [utilisation des traceurs de sources microbiennes (TSM : marqueurs *Bacteroidales* et stanols fécaux)] dans les coquillages et les rivières et iii) la mesure des paramètres physico-chimiques de l'environnement (température, salinité, concentration en oxygène, pluviométrie).

### D. Organisation des prélèvements et des analyses

Sur le site 1 breton, les eaux des rivières ont été prélevées le matin à marée haute à un point de prélèvement où la marée n'avait pas d'impact sur la rivière par l'équipe du CNRS Géosciences de Rennes. L'équipe d'Ifremer de Brest a ensuite prélevé les coquillages et le sédiment sur la baie de la Fresnaye et assuré le transport des eaux et des coquillages jusqu'à i) CNRS Géosciences en charge des analyses des stanols fécaux pour identifier les sources de contamination fécale, ii) à Ifremer de Nantes pour la recherche des norovirus et le dénombrement des *E. coli* par impédancemétrie dans les coquillages.

L'équipe de Ifremer de Brest a réalisé les analyses concernant la recherche des salmonelles, des *Campylobacter* et des vibrions ainsi que la recherche des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'Homme (HF183 ; Seurinck *et al.*, 2005), aux porcs (Pig2Bac ; Mieszkin *et al.*, 2009) et aux bovins (Rum2Bac ; Mieszkin *et al.*, 2010). L'isolement de souches de *E. coli* et d'entérocoques a également été effectué au laboratoire puis celles-ci ont été expédiées à l'Université de Caen pour évaluer la présence de gènes de virulence et déterminer les phylogroupes et la résistance aux antibiotiques.

Sur les sites normands 2 et 3, les eaux des rivières ont été prélevées le matin à marée haute à un point de prélèvement où la marée n'avait pas d'impact sur la rivière par l'équipe de l'Université de Caen. L'équipe a effectué, à marée basse, le prélèvement des coquillages sur les deux Havres et assuré le transport des coquillages jusqu'à i) Ifremer de Nantes pour la recherche des norovirus, ii) au Laboratoire d'analyse de la Manche (LABEO) pour le dénombrement des *E. coli* par impédancemétrie. L'équipe de l'Université de Caen a effectué les analyses concernant la recherche des salmonelles, des *Campylobacter*, des *E. coli*, des *E. coli* pathogènes, des entérocoques (isolement et/ou dénombrement) et des vibrions ainsi que la recherche des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'Homme et aux ruminants.

Mon travail a consisté à participer aux prélèvements sur le site breton, aux préparations communes des échantillons pour la recherche des bactéries à l'offremer de Brest, à réaliser les analyses concernant les STEC et les EPEC sur les sites 1, 2 et 3 sur la période de Février 2013 à Janvier 2014. J'ai ensuite caractérisé les souches isolées sur les trois sites.

## ***Chapitre 2 : DETECTION ET ISOLEMENT DES E. COLI PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES APPARTENANT AUX CINQ SEROTYPES MAJEURS DANS L'ENVIRONNEMENT LITTORAL***

La première question qui s'est posée en début de thèse a été de sélectionner la ou les méthodes les plus pertinentes pour rechercher les STEC et les EPEC dans les échantillons environnementaux. Des protocoles très variés ont été publiés et ils permettent la détection des STEC et EPEC de façon dépendante ou indépendante des sérotypes majeurs (Farrokh *et al.*, 2013, Beutin et Fach 2014).

### **A. Contexte de la première partie de l'étude**

Récemment, une méthode de détection horizontale par PCR a été développée pour la recherche et l'isolement des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines appartenant aux cinq sérotypes majeurs (O157 :H7, O145 :H28, O26 :H11, O103 :H2 et O111 :H8) dans les aliments et l'alimentation animale (ISO-TS-13136). Cette méthode a été validée par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) en 2012.

Cette méthode horizontale repose sur l'utilisation de la PCR en temps réel pour la détection des gènes de virulence caractéristiques des STEC (ou EHEC typiques), à savoir les gènes *stx1*, *stx2* et *eae*, et des gènes associés aux cinq sérogroupes majeurs (gène *wzx*).

Dans le cas de la présence des gènes de virulence (*stx1* et/ou *stx2* et *eae*) et d'au moins un des cinq sérotypes ciblés dans les bouillons d'enrichissement recommandés par la méthode, une procédure d'isolement de souches de *E. coli* et de confirmation de la présence des gènes caractéristiques est mise en place.

La méthode s'appliquant aux produits destinés à la consommation humaine et animale mais également aux échantillons environnementaux dans les zones de production et de manipulation d'aliment, nous avons fait le choix de sélectionner cette méthode pour les recherches sur la présence des STEC dans les coquillages destinés à la consommation humaine et dans l'environnement littoral. De plus, cette méthode n'avait pas été encore testée sur des coquillages et présentait l'avantage d'évaluer la présence des souches STEC potentiellement les plus pathogènes pour l'Homme.

L'application de cette procédure a été possible grâce à une collaboration avec le Laboratoire National de Référence pour les STEC (Laboratoire LMAP-LNR STEC VetAgroSup, Lyon).

Cette méthode a été appliquée sur une collection d'échantillons prélevés mensuellement sur une période de 13 mois (de Février 2013 à Janvier 2014) au niveau ; du site de la baie de la Fresnaye [par mois 2 lots d'huîtres, 2 lots de moules, 1 lot de coques, 1 sédiment et 4 eaux douces (total n = 130)], du site du Havre de Regnéville [par mois, 1 lot d'huîtres, 1 lot de moules, 1 lot de coques, 1 sédiment,

3 eaux douces (total n=91)] et du site du Havre de la Vanlée [par mois, 1 lot d'huître, 1 lot de moule, 1 sédiment, 2 eaux douces (n=65 (-4 lots coquillages non récoltés) total n= 61].

Une fois rapportés dans les laboratoires respectifs (transport à +4°C), les échantillons ont été traités dans les 24 heures de la même manière soit : à partir de 25 g de CLI broyés obtenus à partir de 200 g de CLI, des filtres des eaux douces (volume 1 litre) et de 10 g des sédiments ont été incubés dans le milieu de culture Eau Peptonée Tamponnée, à 37°C, pendant 24 h. Ces enrichissements ont ensuite été expédiés jusqu'au LNR STEC pour être analysés.

En parallèle à cette analyse, les concentrations totales en *E. coli* et en entérocoques (indicateurs de contamination fécale) ont été mesurées dans les coquillages (seulement *E. coli*) et dans les eaux douces, dans les conditions décrites précédemment (chapitre I, 4).

L'ensemble de ces travaux ont permis d'établir que :

- Les concentrations en *E. coli* mesurées dans les coquillages issus des zones conchylicoles sélectionnées et dans les eaux douces en amont étaient très variables : soit en moyenne de  $3\,493 \pm 7\,812$  *E. coli* pour 100 g de CLI pour les coquillages et en moyenne de  $4\,339 \pm 17\,953$  *E. coli* pour 100 mL pour les eaux pour la période d'étude. Au sein des coquillages, les lots de coques présentaient les plus fortes concentrations (moyennes géométriques : 2 440 *E. coli* / 100 g de CLI dans les coques *versus* 1 070 pour les moules et 364 pour les huîtres).
- Les gènes *stx* et *eae* codant respectivement pour les Shiga-toxines et l'antiméthane étaient fréquemment présents dans les échantillons environnementaux analysés :
  - les gènes *stx* ont été détectés dans 35 % des lots de coquillages (n=44/126), 91 % des échantillons d'eaux douces (n=107/117) et 28 % des échantillons de sédiment (n=11/39).
  - le gène *eae* a été détecté dans 73 % des lots de coquillages (n=92/126), 99 % des échantillons d'eaux douces (n=116/117) et 49 % (n=19/39) des échantillons de sédiment.
  - 50 % des enrichissements répondaient aux critères de recherche établis par la norme à savoir la détection des gènes *stx*, *eae* et au moins un *wzx*.
- Les souches STEC et EPEC étaient peu présentes dans les échantillons environnementaux analysés.

Au final, une souche EHEC O26 :H11 *stxI*<sup>+</sup> et *eae*<sup>+</sup> a été isolée à partir d'un lot de moules et neuf souches EPEC appartenant aux sérotypes O26 :H11, O145 :H28 et O103 :H2 *eae*<sup>+</sup> mais *stx*<sup>-</sup> ont été isolées à partir d'échantillons de coquillages et d'eaux douces.



En conclusion, cette étude a montré la pertinence de la norme ISO-TS-13136 pour évaluer la présence des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines appartenant au cinq sérotypes EHEC majeurs dans des zones de production conchylicoles françaises et leurs bassins versants en amont. Même si une forte détection des marqueurs génétiques *stx* et *eae* a été observée au sein des bouillons d'enrichissement des échantillons, l'isolement d'une seule souche STEC O26:H11 et de neuf souches EPEC O26:H11, O103:H2 et O145:H28, suggèrent une faible présence des *E. coli* appartenant aux cinq sérotypes majeurs (O157:H7, O145:H28, O26:H11, O103:H2 et O111:H8) dans les zones conchylicoles étudiées.



**B. Publication N°1**

**Successful detection of pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish, environmental waters and sediment using the ISO/TS-13136 method**

**Balière Charlotte<sup>a</sup>, Rincé Alain<sup>b</sup>, Thevenot Delphine<sup>c</sup>, Gourmelon Michèle<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, Unité SG2M, Département RBE, IFREMER, F-29280 Plouzané, France

<sup>b</sup>Normandie-Université; UCBN, U2RM Stress/Virulence EA4655, F-14032 Caen, France

<sup>c</sup>VetAgroSup campus vétérinaire de Lyon, UMR5557/Equipe 6, Laboratoire LMAP-LNR, Avenue Claude Bourgelay, 69280 Marcy-L'Etoile, France

**Running title:** STEC detection in the environment

**2015. *Letter in Applied Microbiology* 60 (4):315-320**



## ORIGINAL ARTICLE

# Successful detection of pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish, environmental waters and sediment using the ISO/TS-13136 method

C. Balière<sup>1</sup>, A. Rincé<sup>2</sup>, D. Thevenot<sup>3</sup> and M. Gourmelon<sup>1</sup><sup>1</sup> Unité SG2M, Département RBE, Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, IFREMER, Plouzané, France<sup>2</sup> UCBN, U2RM Stress/Virulence EA4655, Normandie-Université, Caen, France<sup>3</sup> Laboratoire LMAP-LNR, UMR5557/Equipe 6, Marcy-L'Etoile, France

**Significance and Impact of the Study:** (STEC) infections have been reported following ingestion of contaminated food or water or after bathing in contaminated waters. However, to date, few studies concerning their detection in coastal environment and shellfish have been reported. The aim of this work was to assess the presence of STEC in three shellfish-harvesting areas by the ISO/TS-13136 method, which has recently been used for STEC detection in food.

## Keywords

*eae*, sediment, shellfish, Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*, *stx*, water.

## Correspondence

Michèle Gourmelon, Laboratoire de microbiologie LSEM, IFREMER, CS10070 Plouzané, France.

E-mail: Michele.Gourmelon@ifremer.fr

2014/2261: received 4 November 2014,  
revised 18 December 2014 and  
accepted 4 January 2015

doi:10.1111/lam.12386

## Abstract

The presence of highly pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in shellfish, upstream waters and sediment from coastal shellfish sites was evaluated using the ISO/TS-13136 method. Shellfish (oysters, mussels and cockles), water and sediment samples were collected monthly over a period of 1 year. The method used real-time PCR detection of *stx1*, *stx2* and *eae* genes and genetic markers corresponding to the five major serogroups (O157, O26, O103, O111 and O145) on enrichment broths and the identification of STEC when these genes and markers were detected. *stx* genes were detected in the broth of 33% of shellfish batches ( $n = 126$ ), 91% of water samples ( $n = 117$ ) and 28% of sediment ( $n = 39$ ). One *stx1*<sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup> O26:H11 strain was isolated from a shellfish batch, and O26:H11, O145:H28 and O103:H2 strains without the *stx* gene ( $n = 9$ ) were isolated from shellfish and waters. In conclusion, this study shows the suitability of the ISO/TS-13136 method to assess the presence of highly pathogenic *E. coli* strains in shellfish farming areas. It also highlights a low prevalence of STEC and consequently suggests a reduced corresponding human health risk.

## Introduction

Pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) may cause human illnesses such as haemorrhagic colitis and life-threatening haemolytic-uraemic syndrome. Although a wide range of serotypes have been implicated in human STEC infections, five major serotypes (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 and O145:H28) are responsible for the vast majority of sporadic cases and outbreaks in Europe (Beutin and Fach 2014). Pathogenic STEC are characterized by the production of Shiga-toxin, a bacteriophage-encoded cytotoxin (O'Brien *et al.* 1984) and, in addition, are often shown to produce attaching

and effacing lesions on intestinal mucosa. This latter property is encoded by genes, including *eae*, grouped together in a pathogenicity island referred to as the 'locus of enterocyte effacement' (Paton and Paton 1998). Human infection occurs through ingestion of contaminated food or water or by contact with animals. The main reservoir for STEC is domestic ruminants, especially cattle (Pradel *et al.* 2000). Other animals such as sheep, goats, pigs, birds, other wild animals as well as humans can also harbour STEC (Gyles 2007). STEC contamination of the environment may occur through the spreading of live-stock manure, animal waste on pastures, via wastewaters from slaughterhouses, from treatment plant effluents and

by wildlife (Ogden *et al.* 2001; Vernozy-Rozand *et al.* 2002; Loukiadis *et al.* 2006). Coastal environments, including shellfish, may therefore become contaminated with STEC. Because of their filter-feeding behaviour and because they are traditionally consumed raw or undercooked, shellfish may present a potential risk to public health (Potasman *et al.* 2002). However, to our knowledge, while they have previously been detected in shellfish, STECs have not yet been reported as being involved in shellfish-borne outbreaks (Guyon *et al.* 2000; Gourmelon *et al.* 2006).

To date, few studies concerning the detection and isolation of pathogenic STEC strains in coastal environments and shellfish have been reported and, of those that have, none has focused on the prevalence of the five major STEC serotypes. Recently, a horizontal PCR-based method has been developed for the detection of STEC (including the five major serotypes associated with human infection) in foods and animal feed. This method, recommended by EFSA (2009), is described in the ISO-13136 Technical Specification (ISO/TS-13136:2012). It has already been applied in France for monitoring control in minced meat frozen beef (DGAL 2013) and to evaluate the prevalence of STEC from their corresponding serotypes in cattle faeces (Bibbal *et al.* 2014).

This study describes the first application of the ISO/TS-13136 protocol to shellfish, environmental waters and sediment in order to evaluate the presence of highly pathogenic STEC in shellfish-harvesting areas.

## Results and discussion

### Level of contamination in water and shellfish

*Escherichia coli* counts were determined for all shellfish and water samples. Widely varying *E. coli* concentrations were found in shellfish, with concentrations ranging from <67 to 71 000 per 100 g. Thirty-seven samples presented a concentration of  $\leq 230$  *E. coli* per 100 g, 64 contained between 230 and 4600 *E. coli* per 100 g and 25 presented a concentration  $>4600$ . Among shellfish, cockles were the most contaminated (geometric mean of 2440 *E. coli* per 100 g vs 1070 for mussels, and 364 for oysters). In waters, *E. coli* concentrations ranged from <38 to 190 530 per 100 ml, with a geometric mean of 1224.

### Detection of *stx1*, *stx2* and *eae* and prevalence of the five major serogroups

Real-time PCRs enabled detection of *stx* genes from enrichment broths of 44 shellfish batches (34.9%), 107 water samples (91.4%) and 11 sediment samples (28.2%) (Table 1). In correlation with the level of contamination

of shellfish, *stx* genes were more frequently detected from cockles and mussels (50.0 and 36.5% *stx*<sup>+</sup> respectively) than from oysters (22%). The presence of *stx* gene was previously investigated in shellfish batches collected between 2002 and 2004 from across France (Gourmelon *et al.* 2006). In this earlier study, in which 72 samples of mussels (41) oysters (27) and cockles (4) were analysed, the *stx* gene was also more frequently detected from cockles (100%) than from mussels (43.9%) or oysters (33.3%). The *stx2* gene was slightly more frequently found than *stx1* in enrichment broths from water and sediments, while *stx1* was more frequently detected from shellfish. As with *stx*, *eae* gene was more frequently detected in water than in shellfish or sediments. Indeed, 116 water samples (99.1%), 92 shellfish batches (73.0%) and 19 sediments (48.7%) were *eae*<sup>+</sup> (Table 1). *eae* was more frequently detected in cockles and mussels (87.5 and 82.7%, *eae*<sup>+</sup> respectively) than in oysters (56.0% *eae*<sup>+</sup>). A total of 152 samples (37 shellfish, 107 waters and eight sediments) were positive for at least one *stx* gene and the *eae* gene. Real-time PCRs were performed to detect genetic markers associated with the five major serogroups from the 152 corresponding enrichment broths (Table 2). One or several serogroups were detected from 28 samples of shellfish, 106 waters and seven sediments. Consequently, 22.2% of shellfish samples, 90.6% of water samples and 17.9% of sediment samples were positive for *stx*, *eae* and one of the O-group markers, with a higher percentage of positive samples among environmental water samples than among cattle faeces collected at slaughterhouse (58% in cattle faeces (Bibbal *et al.* 2014)). Regardless of the sample type, serogroups O103 and O145, followed by O26 and O157 were the most frequently detected.

### Isolation and characterization of strains belonging to serogroups O157, O26, O103, O111 or O145

Ten strains (five from water and five from shellfish) were isolated using two complementary methods: direct streaking and IMS (Immuno-Magnetic Separation). Their characterization revealed that six belonged to the O26:H11 serotype, while two were identified as O103:H2 and two as O145:H28 (Table 3); all 10 isolates contained the *eae* gene. These strains were isolated from highly contaminated samples (*E. coli* geometric mean of 14 550 per 100 g for shellfish and 4490 per 100 ml for waters). Only one strain possessed a *stx* gene (*stx1*), whereas the remaining corresponded to potentially enteropathogenic *E. coli* (EPEC). The STEC strain belonged to the O26:H11 serotype and was isolated from mussels. Only nine of the 141 enrichment broths that were positive for *stx*, *eae* and one of the major serotypes (6%) resulted in STEC or

**Table 1** Prevalence of *stx1*, *stx2* and *eae* genes in enrichment broths

Sample (n)	<i>stx1</i> * n (%)	<i>stx2</i> † n (%)	<i>stx1</i> and <i>stx2</i> n (%)	Total <i>stx1</i> and/or <i>stx2</i> n (%)	<i>eae</i> n (%)
Cockles (24)	3 (12.5)	3 (12.5)	6 (25.0)	12 (50.0)	21 (87.5)
Mussels (52)	12 (23.1)	8 (15.4)	1 (1.9)	21 (40.4)	43 (82.7)
Oysters (50)	7 (14.0)	2 (4.0)	2 (4.0)	11 (22.0)‡	28 (56.0)§
Total Shellfish (126)	22 (17.5)	13 (10.3)	9 (7.1)	44 (34.9)	92 (73.0)
Waters (117)	10 (8.5)	21 (17.9)	76 (65.0)	107 (91.4)¶	116 (99.1)**
Sediment (39)	3 (7.7)	6 (13.4)	2 (5.1)	11 (28.2)	19 (48.7)

\**stx1* was found but not *stx2*.

†*stx2* was found but not *stx1*.

‡*P* value (Chi-squared test) between oysters and other shellfish = 0.0136.

§*P* value (Chi-squared test) between oysters and other shellfish =  $3.23 \times 10^{-5}$ .

¶*P* value (Chi-squared test) between waters and other samples =  $2.33 \times 10^{-22}$ .

\*\**P* value (Chi-squared test) between waters and other samples =  $4.87 \times 10^{-11}$ .

**Table 2** Prevalence of strains of the five highly pathogenic serogroups in the BPW broths and number of isolated strains belonging to the STEC or EPEC pathotype

Sample (n)	<i>stx</i> <sup>+</sup> and <i>eae</i> <sup>+</sup>	O157 <sup>+</sup> (%)*	O26 <sup>+</sup> (%)*	O103 <sup>+</sup> (%)*	O111 <sup>+</sup> (%)*	O145 <sup>+</sup> (%)*	<i>stx</i> <sup>+</sup> , <i>eae</i> <sup>+</sup> and serotype <sup>†</sup> (%)‡	Isolated strains
Shellfish (126)	37	7 (18.9)	13 (35.1)	20 (54.1)	3 (8.1)	15 (40.5)	28 (22.2)	5
Waters (117)	107	65 (60.7)	67 (62.6)	93 (86.9)	30 (28.0)	83 (77.6)	106 (90.6)§	5
Sediment (39)	8	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (65.5)	0 (0.0)	4 (50.0)	7 (17.9)	0

\*% Calculated based on the number of samples *stx*<sup>+</sup> and *eae*<sup>+</sup>.

†*stx*<sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup> and at least one of the major serotypes.

‡% Calculated based on total number of samples.

§*P* value (Chi-squared test) between waters and other samples =  $1.62 \times 10^{-30}$ .

EPEC isolation. We have to consider the possibility that the targeted *stx*, *eae* and serotypes markers could also be detected in the absence of culturable STECs. Indeed, their detection can be due to the presence free bacteriophages, dead or viable but nonculturable bacteria or other bacteria such as *Shigella* and *Citrobacter*, which are also known to carry these genes (Muniesa *et al.* 1999; Martinez-Castillo *et al.* 2013). A poor isolation rate of highly pathogenic STEC was also previously described for other matrices, such as cattle faeces (Bibbal *et al.* 2014), retail-minced beef (Auvray *et al.* 2007) and raw-milk cheeses (Madic *et al.* 2011) from which six ( $n = 150$ ), zero ( $n = 164$ ) and zero ( $n = 400$ ) strains were isolated respectively. In the present study, EPEC were more frequently isolated than STEC. This may be the consequence of the loss of *stx* genes by STEC discharged in the environment. Indeed, previous studies have demonstrated the capacity of STEC to lose *stx* genes in bovine, avian human and environmental sources (Feng *et al.* 2001; Wetzel and LeJeune 2007).

A low detection rate of STEC in shellfish is in agreement with previous studies. Indeed, three studies previously described STEC belonging to the O157-serogroup in shellfish using an immunomagnetic method. One,

conducted in France on 150 oyster samples, led to the isolation of only one O157-*E. coli* strain (O157:H- *stx1*<sup>+</sup>, *stx2c*<sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup>) (Guyon *et al.* 2000), a second failed to isolate O157:H7 strains from 192 batches of different shellfish species in the UK (MacRae *et al.* 2005) and the third described the isolation of one EPEC strain (O157:H7) from 72 shellfish batches collected in France (Gourmelon *et al.* 2006). Other approaches focused on the isolation of *E. coli* strains followed by investigation for the presence of *stx* genes, which demonstrated low percentages of STEC among the isolates (6.2% in shellfish from Morocco (Bennani *et al.* 2011) and 4.1% in clams from India (Sanath Kumar *et al.* 2001)). Furthermore, five STEC strains not belonging to the five major serogroups have previously been isolated in France from shellfish by analysing STEC by hybridization, following culture enrichment (Gourmelon *et al.* 2006).

These results suggest that STEC and EPEC are occasionally present in the environment and can contaminate shellfish. According to our results, the risk of human infection by highly pathogenic STEC resulting from the consumption of shellfish from the investigated areas seems to be limited as only one STEC strain was isolated from 126 batches taken from the area and shellfish which

**Table 3** Characterization of STEC and EPEC strains isolated from shellfish and water

Strain	Sample type	<i>Escherichia coli</i> count	Serotype	<i>stx</i> (type)	<i>eae</i>
10	Mussel	15 000*	O26:H11	+( <i>stx1</i> )	+
9	Cockle	12 000*	O26:H11	–	+
7	Mussel	15 000*	O26:H11	–	+
4	Water	3570†	O26:H11	–	+
5	Water	5200†	O26:H11	–	+
8	Water	16 620†	O26:H11	–	+
2	Cockle	22 000*	O145:H28	–	+
3	Mussel	11 000*	O145:H28	–	+
1	Water	357†	O103:H2	–	+
6	Water	16 620†	O103:H2	–	+

\**E. coli* count per 100 g.

†*E. coli* count per 100 ml.

are from category B or C areas, which are depurated or which undergo protracted relaying prior to sale. As with the *E. coli* indicators, we may expect STEC to be eliminated during the depuration or relaying step. However, further assays are currently being undertaken in our laboratory to compare STEC behaviour with that of *E. coli* indicators in shellfish.

## Conclusion

In conclusion, this study shows that the ISO/TS-13136 protocol effectively detects STEC or EPEC strains belonging to the five major serotypes in shellfish and environmental samples. Even though *stx* and *eae* genes were often detected, the presence of STEC in such environments appears to be limited, as only one STEC and nine EPEC were isolated from water or shellfish samples. Furthermore, the human health risk associated with consuming the shellfish collected from these sites should be reduced as they are depurated or relayed prior to consumption.

## Materials and methods

### Origin and collection of samples

Three French shellfish sites from the English Channel coastal area were studied. One is located in the 'Cotes d'Armor' department (Brittany region) while others are in the department 'La Manche' (Lower-Normandy region). All three sites are characterized as receiving inputs from agricultural catchments with high stocking densities (cattle, sheep, pigs, or poultry) but are also impacted by microbial pollution of human origin. The bays are the focus of extensive shellfish gathering

activities. According to the European classification of shellfish harvesting areas (Anonymous 2004), these shellfish sites are classified as category B (*E. coli* <4600 CFU per 100 g total flesh for 90% of the samples) for mussels and oysters and as category C (*E. coli* <46 000 CFU per 100 g) for cockles. Shellfish from category B areas are only suitable for human consumption following depuration, relaying or cooking by an approved method, whereas shellfish from category C areas can only be consumed after relaying for at least 2 months or cooking by an approved method. For each site, mussels, oysters and cockles were collected monthly, from February 2013 to February 2014. A total of 126 batches of shellfish (52 batches for mussels ( $n \approx 70$ ), 50 for oysters ( $n \approx 14$ ) and 24 for cockles ( $n \approx 80$ )) were analysed. In parallel, 117 water samples from nine different points located upstream of the shellfish areas and 39 samples of sediment were collected. Samples, which were transported in insulated cooler boxes, were analysed within 24 h. Before analysis, shellfish were scrubbed under running tap water to remove debris and algae.

### *Escherichia coli* enumeration

*Escherichia coli* enumeration was performed using the Most Probable Number method in MUG-microtitre plates according to the EN/ISO-9308-3 method (Anon 1998) and using an impedance method according to NF/V-08-106 for shellfish (Anon 2000).

### *Escherichia coli* enrichment

After opening, shellfish were crushed in a Warring blender for 60 s. Twenty-five grammes of crushed flesh and intravalvular liquid were introduced into 225 ml of buffered peptone water (BPW). For sediment, 10 g were introduced into the same quantity of BPW while for water samples, 1 l was filtered using 0.45  $\mu$ m membranes and the filter placed in 225 ml of BPW. Incubation was performed at 37°C, for 24 h.

### Detection of *stx* and *eae* genes and markers associated with the five major serotypes

DNA was extracted from 1 ml of enrichment cultures in BPW using an automatic method (EZ1-biorobot, and DNA tissue card kit (Qiagen®, Cournaboef, France)). *stx* and *eae* genes were detected by real-time PCR, according to ISO/TS-13136. For samples positive for *stx* and *eae*, genetic markers associated with the major serogroups O157, O26, O103, O111, and O145 (*rfbE*O157, *wzx*O26, *wzx*O103, *wbd*O111 and *ihp*O145 genes respectively) were detected by real-time PCR, also according to ISO/



TS-13136 and using primers and probes published previously (Nielsen and Andersen 2003; Perelle *et al.* 2007).

### Isolation of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*

The isolation of STEC strains was performed only for the positive samples for which the targeted combination of genetic marker was detected, i.e. *stx*, *eae* and at least one O-group marker. From the positive BPW broths, direct streaking and streaking after immuno-magnetic separation (IMS), were performed on the following media. The O157 serogroups were searched by direct streaking onto chromID™ O157:H7 + cefixime-tellurite (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, France) and streaking after the IMS onto cefixime-tellurite-Sorbitol-MacConkey agar (Biokar, Beauvais, France) and chromID™ O157 (bioMérieux). Streakings for O26 serogroups were performed onto Sorbitol-MacConkey agar (SMAC) (bioMérieux) and after onto SMAC and chromID™ O26 (bioMérieux) after the IMS, while serogroups O103, O145 and O111 were directly detected using Posse media (Posse *et al.* 2008) or using SMAC and chromID™ after the IMS. All media were incubated for 18–24 h at 37°C. Confirmation of the clones belonging to a particular serotype and presence of *stx* and/or *eae* genes were then tested by PCR on presumptive colonies as described in ISO/TS-13136. Characterization of the *fliCH* alleles (*fliCH2*, *fliCH7*, *fliCH8*, *fliCH11* and *fliCH28*) was investigated by PCR, as described by Madic *et al.* (2011).

### Acknowledgements

This work was funded by the European Regional Development Fund Interreg IVA Programme as part of the collaborative project RiskManche. Charlotte Balière was supported by a grant from Ifremer and Agence de l'Eau Loire-Bretagne. We thank Clémence Balière and Quentin Bruey, for their participation in the sampling and technical assistance and Huw Taylor for his critical review of the manuscript.

### Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

### References

- 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 (Microbiologie of Foods and Foodstuffs Products – Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* in Living Shellfish – MPN Technique). AFNOR, 16 p.
- Anonymous. (2004) Regulation (EC) No 854/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Taché, J., Leclerc, V., Deperrois, V. and Lombard, B. (2007) Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Lett Appl Microbiol* **45**, 646–651.
- Bennani, M., Badri, S., Baibai, T., Oubrim, N., Hassar, M., Cohen, N. and Amarouch, H. (2011) First detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and coastal environments of Morocco. *Appl Biochem Biotechnol* **165**, 290–299.
- Beutin, L. and Fach, P. (2014) Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. *Microbiol Spectr* **2**, EHEC-0001-2013.
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kérourédan, M., Peytavin de Garam, C., Ferré, F., Cartier, P., Gay, E., Oswald, E. *et al.* (2014) Intimin gene (*eae*) subtype-based real-time PCR strategy for specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in cattle feces. *Appl Environ Microbiol* **80**, 1177–1184.
- DGAL. Direction générale de l'alimentation. (2013) Plans de surveillance-Plan de contrôle, Bilan 2012. Ministère de l'Agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Octobre.
- EFSA. European Food Safety Authority. (2009) Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA J.7:1366-1409.<http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1366>.
- Feng, P., Dey, M., Abe, A. and Takeda, T. (2001) Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 Genes. *ASM* **8**, 711–717.
- Gourmelon, M., Montet, M.P., Lozach, S., Le Mennec, C., Pommepuy, M., Beutin, L. and Vernozzy-Rozand, C. (2006) First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J Appl Microbiol* **100**, 85–97.
- Guyon, R., Dorey, F., Collobert, J.F., Foret, J., Goubert, C., Mariau, V. and Malas, J.P. (2000) Detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). *Sci Aliment* **20**, 457–466.
- Gyles, C.L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* **85**, 45–62.

- ISO. (2012) *ISO/TS-13136:2012: Microbiology of Food and Animal Feed. Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Method for the Detection of Food-Borne Pathogens. Horizontal Method for the Detection of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) and the Determination of O157, O111, O26, O103 and O145 Serogroups*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Loukiadis, E., Kérourédan, M., Beutin, L., Oswald, E. and Brugère, H. (2006) Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3245–3251.
- MacRae, M., Hamilton, C., Strachan, N.J., Wright, S. and Ogden, I.D. (2005) The detection of *Cryptosporidium parvum* and *Escherichia coli* O157 in UK bivalve shellfish. *J Microbiol Methods* **60**, 395–401.
- Madic, J., Vingadassalon, N., De Garam, C.P., Marault, M., Scheutz, F., Brugère, H., Jamet, E. and Auvray, F. (2011) Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2035–2041.
- Martinez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E. and Muniesa, M. (2013) Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl Environ Microbiol* **79**, 4862–4868.
- Muniesa, M., Lucena, F. and Jofre, J. (1999) Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J Appl Microbiol* **87**, 402–409.
- Nielsen, E.M. and Andersen, M.T. (2003) Detection and characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR Assay. *J Clin Microbiol* **41**, 2884–2893.
- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W. and Formal, S.B. (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**, 694–696.
- Ogden, L.D., Fenlon, D.R., Vinten, A.J. and Lewis, D. (2001) The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *Int J Food Microbiol* **66**, 111–117.
- Paton, J.C. and Paton, A.W. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**, 450–479.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J. and Fach, P. (2007) Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *Int J Food Microbiol* **113**, 284–288.
- Posse, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M. and Herman, L. (2008) Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiol Lett* **282**, 124–131.
- Potasman, I., Paz, A. and Odeh, M. (2002) Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin Infect Dis* **35**, 921–928.
- Pradel, N., Livrelli, V., Champs, C.D., Palcoux, J.-B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B. et al. (2000) Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* **38**, 1023–1031.
- Sanath Kumar, H., Otta, S.K. and Karunasagar, I. (2001) Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Lett Appl Microbiol* **33**, 334–338.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Bouvet, J. et al. (2002) Prevalence of Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol* **93**, 473–478.
- Wetzel, A.N. and LeJeune, J.T. (2007) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources. *Lett Appl Microbiol* **45**, 504–507.

### ***Chapitre 3 : PREVALENCE ET CARACTERISATION DES E. COLI PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES ET DES E. COLI ENTEROPATHOGENES DANS DES ZONES CONCHYLICOLES FRANCAISES ET LEUR BASSINS VERSANTS***

#### **A. Contexte de la deuxième partie de l'étude**

Ce troisième chapitre décrit la recherche et la caractérisation des STEC et EPEC isolés au cours de la totalité de l'étude (Février 2013 à Janvier 2015).

Si la méthode ISO-TS-13136 apparaissait pertinente pour rechercher les sérotypes majeurs dans les échantillons environnementaux, elle ne permettait toutefois pas de mettre en évidence les souches STEC ou EPEC appartenant aux autres sérotypes. Aussi, deux approches complémentaires à la norme ISO et assez similaires sur le plan cultural et moléculaire ont été appliquées en parallèle au cours de cette étude.

La première approche était basée sur l'utilisation de l'enrichissement effectué dans le cadre de la méthode ISO. La même méthodologie de détection par PCR en temps réel a été utilisée pour la détection des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* dans les bouillons d'enrichissement au laboratoire à Plouzané (LSEM- Ifremer) et au laboratoire de l'Université de Caen (U2RM EA4655 Stress/Virulence).

Dans le cas de la détection des gènes de virulence (*stx1* et/ou *stx2* et *eae*) une procédure d'isolement de souches et de confirmation de la présence des gènes caractéristiques a été mise en place.

La deuxième approche est basée sur l'isolement direct de souches de *E. coli*. Pour les coquillages, une portion des chairs et liquides intervalvaires broyés a étéensemencée en masse dans un milieu sélectif (10 g ; Trypton-Bile-X-glucuronidase agar ; TBX). Pour les eaux, des volumes de 10, 50 et 100 ml ont été filtrés et les filtres ont été déposés directement sur un milieu sélectif solide (TBX). Le sédiment n'a pas été traité avec cette approche car trop peu contaminé en *E. coli*. L'ensemble des milieux a été incubé à 44°C pendant 24 heures. Pour les échantillons qui présentaient un résultat positif pour la détection des gènes *stx* et *eae* par PCR en temps réel dans les enrichissements, une procédure de screening et de confirmation de la présence des gènes caractéristiques a été mise en place sur les colonies suspectes obtenues sur ces milieux de culture.

Ces deux méthodes complémentaires ont été appliquées sur les échantillons récoltés mensuellement sur la période de 13 mois (de Février 2013 à Janvier 2014) et poursuivies sur une période de 11 mois supplémentaires (de Février 2014 à Janvier 2015) avec le même plan d'échantillonnage. L'utilisation de la méthode ISO a été arrêtée à partir de Mars 2014.

Ce chapitre du manuscrit de thèse porte donc sur la prévalence et la caractérisation des souches STEC et EPEC, isolées à partir d'un total de 505 échantillons environnementaux soit 238 lots de coquillages, 216 eaux douces, 39 sédiments (prélevés entre Février 2013 et Janvier 2015) et 12 eaux de mer (prélevées entre Février 2014 et Janvier 2015).

La caractérisation des souches a été réalisée en collaboration avec plusieurs équipes.

J'ai tout d'abord rassemblé toutes les souches STEC et EPEC isolées au cours de cette étude, ce qui a permis d'obtenir au total une collection de 174 souches conservées à 6 80°C au Laboratoire de l'Ifremer de Plouzané.

Toutes les souches STEC et EPEC isolées au cours de l'étude ont ensuite été caractérisées au laboratoire en utilisant la méthode de génotypage par séquençage multilocus MLST (*Multilocus sequence typing*).

Cette méthode MLST est une méthode standardisée et universelle, basée sur l'examen de séquences nucléotidiques de plusieurs locus correspondant à des gènes ou des fragments de gène de ménage. Elle a permis d'évaluer la relation génétique entre les souches. Actuellement, il existe trois régimes MLST pour *E. coli* dans des bases de données publiques : EcMLST (<http://www.shigatox.net>), Institut Pasteur Base de données *E. coli* MLST (<http://www.pasteur.fr/mlst>) et Bases de données MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). Nous avons fait le choix de travailler sur le séquençage de sept gènes de ménage (*adk*, *fumc*, *gyrB*, *icd*, *recA*, *purA* et *mdh*) avec la base de données « mLst.warwick.ac.uk », la plus riche en données (5 844 souches disponibles).

Au cours de séjours au Service de Microbiologie, CNR Associé *Escherichia coli*, AP-HP, Hôpital Robert Debré, Paris, France (Octobre, Novembre 2013, Mars 2014), j'ai caractérisé les 103 premières souches isolées par la méthode PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) et initié la recherche de gènes de virulence (pour les 174 souches) en recherchant les gènes de virulence *ehxA* (codant pour l'entérohémolysine A) et *saa* (STEC *autoagglutinating adhesin*). Pour les souches restantes (n= 71), les analyses PFGE ont été poursuivies par le Service de Microbiologie, CNR Associé *Escherichia coli*.

La méthode d'empreinte génétique PFGE est une technique de génotypage reposant sur le polymorphisme de macro-restriction de l'ADN total. Cette méthode a permis d'établir la relation génétique entre les souches étudiées et de mettre en évidence des liens génétiques avérés ou possibles entre les souches (Tenover *et al.*, 1995). La PFGE est considérée comme la méthode de référence pour le typage de souches de *E. coli*.

Les souches ont également été caractérisées en collaboration avec plusieurs équipes :

- le Département de Microbiologie et Parasitologie, Faculté vétérinaire, Université de Santiago de Compostela, Lugo, Espagne : pour le sérotypage des souches (Expédition des souches)

- le laboratoire de l'Université de Caen, U2RM EA4655, Antibio-Résistance, France : pour la caractérisation des phylogroupes et l'évaluation des profils d'antibio-résistance des souches (Expédition des souches)
- le Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre de Recherche d'Infectiologie Porcine et Avicole, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada : pour l'étude de la capacité des souches à former des biofilms appliquée à une collection de 13 EPEC et 9 STEC (Expédition des souches)

Au final, l'ensemble de ces travaux ont permis de :

- isoler un total de 28 souches STEC et 89 souches EPEC différentes à partir des 505 échantillons analysés
- montrer que 87,2 % des souches isolées présentaient un seul des gènes de virulence étudiés (dont *eae* 70,1 %, *stx2* 11,1 % ou *stx1* 7,7 %) et d'identifier huit profils de virulence différents combinant les gènes *eae*, *stx1*, *stx2*, *ehxA* et *saa*
- d'identifier 75 sérotypes différents dont les sérotypes O26 :H11, O145 :H28 et O103 :H2
- d'identifier 79 profils PFGE différents et 46 profils ST (Sequence type)
- de mettre en évidence la présence de souches similaires dans plusieurs échantillons environnementaux et à des périodes différentes : notion de persistance des souches dans la zone côtière ou les bassins versants en amont
- de montrer que les souches de *E. coli* isolées étaient majoritairement classées au sein des phylogroupes B1 et B2
- de mettre en évidence la capacité forte à modérée de certaines souches à former des biofilms à 18° C plutôt qu'à 30° C
- de montrer que plus de 79 % des souches analysées étaient sensibles aux 16 antibiotiques testés
- de montrer que les souches STEC semblent plus isolées en été et les souches EPEC en été et en automne et qu'aucune influence de la température et de la pluviométrie sur l'isolement des souches n'a été mise en évidence (dans les conditions de cette étude)

En conclusion, ce travail constitue la première étude de la prévalence et de la diversité des STEC et des EPEC au niveau de l'environnement littoral, à notre connaissance. Cette étude a permis d'apporter des éléments de réponse concernant la circulation des souches STEC et EPEC au niveau des deux environnements littoraux sélectionnés. Ces résultats confirment que l'environnement peut être le réservoir de souches STEC et EPEC. L'évaluation de la circulation des souches dans l'environnement peut permettre de mieux appréhender l'émergence de nouvelles souches STEC pathogènes pour l'Homme.

Au regard de la diversité des souches isolées (87,2 % des souches isolées présentaient un seul gène de virulence parmi les gènes recherchés *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* et *saa*) et la réglementation appliquée aux sites conchylicoles de catégorie B (purification et reparcage) ou C (reparcage longue durée ou non commercialisation), le risque sanitaire semble limité dans les sites étudiés.

Néanmoins, plusieurs souches STEC et EPEC appartenant aux sérotypes majeurs impliqués dans des cas d'infections humaines ont été isolées dans des coquillages, des eaux de rivières et du sédiment dans cette étude. Ces observations nous ont suggéré d'approfondir plus largement l'analyse du pouvoir pathogène de ces souches en recherchant la présence d'autres éléments qui pourraient permettre d'estimer le niveau de virulence des souches comme la détection d'autres gènes de virulence.

## B. Publication N°2

# Prevalence and characterization of Shiga Toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds

Charlotte Balière<sup>1</sup>, Alain Rincé<sup>2</sup>, Jorge Blanco<sup>3</sup>, Ghizlane Dahbi<sup>3</sup>, Josée Harel<sup>4</sup>, Philippe Vogeleer<sup>4</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>5</sup>, Patricia Mariani-Kurkdjian<sup>6,7,8</sup>, Michèle Gourmelon<sup>1\*</sup>

1 Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques, Département Ressources Biologiques et Environnement, Ifremer, Plouzané, France

2 U2RM EA4655 Stress/Virulence, Normandie-Université, University of Caen Normandy, Caen, France

3 Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain

4 Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre de Recherche d'Infectiologie Porcine et Avicole, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

5 U2RM EA4655 Antibio-Résistance, Normandie-Université, University of Caen Normandy, Caen, France

6 Service de Microbiologie, CNR Associé *Escherichia coli*, AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris, France

7 Infection, Antimicrobials, Modelling, Evolution, UMR 1137, INSERM, Paris, France

8 Infection, Antimicrobials, Modelling, Evolution, UMR 1137, Université Paris Diderot ó Sorbonne Paris Cité, Paris, France

2015. *Frontier in Microbiology*. 6:1356.







# Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* in Shellfish-Harvesting Areas and Their Watersheds

Charlotte Balière<sup>1</sup>, Alain Rincé<sup>2</sup>, Jorge Blanco<sup>3</sup>, Ghizlane Dahbi<sup>3</sup>, Josée Harel<sup>4</sup>, Philippe Vogeleer<sup>4</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>5</sup>, Patricia Mariani-Kurkdjian<sup>6,7,8</sup> and Michèle Gourmelon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques, Département Ressources Biologiques et Environnement, Ifremer, Plouzané, France, <sup>2</sup> U2RM EA4655 Stress/Virulence, Normandie-Université, University of Caen Normandy, Caen, France, <sup>3</sup> Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain, <sup>4</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre de Recherche d'Infectiologie Porcine et Avicole, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, <sup>5</sup> U2RM EA4655 Antibio-Résistance, Normandie-Université, University of Caen Normandy, Caen, France, <sup>6</sup> Service de Microbiologie, CNR Associé *Escherichia coli*, AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris, France, <sup>7</sup> Infection, Antimicrobials, Modelling, Evolution, UMR 1137, INSERM, Paris, France, <sup>8</sup> Infection, Antimicrobials, Modelling, Evolution, UMR 1137, Université Paris Diderot – Sorbonne Paris Cité, Paris, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Anton F. Post,  
University of Rhode Island, USA

### Reviewed by:

Erin Katherine Lipp,  
University of Georgia, USA  
Dale Leavitt,  
Roger Williams University, USA

### \*Correspondence:

Michèle Gourmelon  
michele.gourmelon@ifremer.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Aquatic Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 14 August 2015

**Accepted:** 16 November 2015

**Published:** 01 December 2015

### Citation:

Balière C, Rincé A, Blanco J, Dahbi G, Harel J, Vogeleer P, Giard J-C, Mariani-Kurkdjian P and Gourmelon M (2015) Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* in Shellfish-Harvesting Areas and Their Watersheds. *Front. Microbiol.* 6:1356. doi: 10.3389/fmicb.2015.01356

During a 2-years study, the presence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) was investigated in shellfish ( $n = 238$ ), seawater ( $n = 12$ ), and surface sediment ( $n = 39$ ) collected from three French coastal shellfish-harvesting areas and freshwaters ( $n = 216$ ) in their watersheds. PCR detection of Shiga toxin- (*stx1/stx2*) and intimin- (*eae*) genes following enrichment from these samples revealed the presence of at least one of the *stx* genes in 30.3% of shellfish batches, 85.9% of freshwater, 41.7% of seawater, and 28.2% of sediment samples, while the *eae* gene was observed in 74.8, 100, 100, and 43.6% of shellfish batches, freshwater, seawater, and sediment samples, respectively. Twenty-eight STEC and 89 EPEC strains were isolated and analyzed in order to determine their serotype, phylogroup, and genetic relatedness and to evaluate the presence of the *saa* and *ehxA* genes encoding the STEC autoagglutinating adhesin and the enterohemolysin A, respectively. Finally, the ability to form biofilms and antimicrobial susceptibility were investigated for a selection of strains. Eighteen serotypes were identified among the STEC isolates and 57 among the EPEC isolates. A high diversity was observed within these strains, as 79 different PFGE patterns and 48 distinguishable sequence types were identified. Strains were found to belong mainly to phylogroups B1 and B2 and virulence was observed to be low as more than 85% of the strains possessed only *stx1*, *stx2*, or *eae* genes. One STEC and several EPEC strains belonged to three of the five highly pathogenic serogroups (i.e., O26, O103, and O145). The subset of strains tested for their capacity to form biofilms was mainly strongly to moderately adherent and

more strains formed a strong biofilm at 18 than at 30°C. Finally, more than 85% of analyzed strains were found to be sensitive to the 16 tested antibiotics. These data suggest the low risk of human infection by STEC if shellfish from these shellfish-harvesting areas were consumed.

**Keywords: STEC, EPEC, shellfish, water, MLST, PFGE, biofilms**

## INTRODUCTION

The microbiological quality of coastal environments can be impacted by urban and agricultural fecal wastes from watersheds. Moreover, shellfish can accumulate and concentrate pathogenic micro-organisms, such as *Salmonella*, pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) and noroviruses present in surrounding waters by their filter-feeding activities (Potasman et al., 2002). This can lead to closures or downgrading of shellfish-harvesting areas and to outbreaks of food poisoning through consumption of contaminated shellfish (Iwamoto et al., 2010).

Enumeration of *E. coli*, a fecal bacterial indicator, is the standard way to assess the level of fecal microorganisms in water and shellfish and indirectly, to estimate the associated potential risk to human health from all waterborne enteric pathogens (e.g., through classification of bathing areas and shellfish-harvesting areas; Anonymous, 2004). However, in addition to being a fecal indicator and a commensal bacterium, *E. coli* includes strains that can be pathogenic to humans. These can cause diarrhea and extra-intestinal diseases after acquiring virulence genes by genetic mobile elements such as bacteriophages, pathogenicity islands, and plasmids (Touchon et al., 2009). Pathogenic *E. coli* are distributed into diarrheagenic *E. coli* pathotypes including enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *Shigella*/enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC; for review, Croxen et al., 2013) and into extra-intestinal *E. coli* pathotypes (Russo and Johnson, 2000).

*Escherichia coli* occurrence in seafood is considered a sanitary case and may represent a risk to the consumers if related to diarrheagenic *E. coli* (for review, Costa, 2013).

The study presented here focuses on EPEC (one of the main causes of diarrhea in infants) and STEC (an emerging zoonotic pathogen).

Enteropathogenic *E. coli* is an important cause of infantile watery diarrhea, which is more frequently encountered in low-income countries than in the industrialized world (Nataro and Kaper, 1998). They are known to create distinctive lesions on the surface of intestinal epithelial cells, called attaching and effacing (A/E) lesions. This property is encoded by genes, including *eae*, grouped together in a pathogenicity island referred to the 'locus of enterocyte effacement' (LEE; Paton and Paton, 1998). EPEC is transmitted from host to host via the fecal-oral route through contaminated surfaces, waters and food and human carriers. Humans, including symptomatic and asymptomatic children and asymptomatic adults, are the most likely source (Levine and Edelman, 1984). Animals, such as cattle and wildlife species, have been found to be additional sources (Singh et al., 2015). Twelve O serogroups have been recognized as EPEC by the World Health

Organization: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, and O158 (WHO, 1987).

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* are responsible for the mucoid-bloody diarrhea that can progress to hemolytic uremic-syndrome (HUS), especially in children. One of the most important pathogenicity factors produced by STEC strains is the Shiga toxin (Stx), encoded by a lambdoid bacteriophage (O'Brien et al., 1984). Shiga toxins can be divided into two types, Stx1 (almost identical to Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1) and Stx2, encoded by *stx1* and *stx2* genes, respectively (Scheutz et al., 2012). In addition, the STEC strains are often able to produce the A/E lesions as a result of the presence of the LEE pathogenicity island, as in EPEC. This subset of STEC strains is also known as enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC; McDaniel et al., 1995). Instead of this LEE pathogenicity island, they can also possess the auto-agglutinating adhesin factor designated Saa (STEC autoagglutinating adhesin; Paton et al., 2001). Adhesion to the intestinal mucosa is an essential step in the infection cycle of *E. coli*, which contributes to pathogenesis in humans. Other factors are involved in the virulence of STEC but also of EPEC, such as enterohemolysin A, encoded by the *ehxA* gene and associated with cytotoxic effects on endothelial cells that may contribute to the development of HUS (Jiang et al., 2015). STEC infections have been reported following the ingestion of contaminated food or water, after bathing in contaminated waters or contact with animals (for review, Croxen et al., 2013). The principal reservoir of STEC is the digestive tract of animals, particularly of cattle that are healthy carriers (Bibbal et al., 2015). Other animals, such as sheep, goats, swine, birds, and other wild animals, as well as humans, can also harbor STEC (Mora et al., 2012; Chandran and Mazumder, 2013).

Most human illness is caused by the serotype STEC O157:H7 (Paton and Paton, 1998). However, it is becoming evident that non-O157 isolates belonging to the serogroups O26, O45, O91, O103, O111, O113, O121, O145 also cause significant human illness (Mellmann et al., 2009; USDA, 2011). In Europe, O157:H7 and the four serotypes: O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 are the most widely implicated in human STEC infections, constituting the five highly pathogenic serotypes (EFSA, 2013).

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and EPEC contamination of the environment may occur through the spreading of livestock manure, animal waste on pastures, via wastewaters from slaughterhouses or from treatment plant effluents and by wildlife (Muniesa et al., 2006; Singh et al., 2015).

In such environments, STEC and EPEC strains are exposed to various stresses, such as low temperature or nutrient depletion and the ability to form biofilm could be an advantage to increase persistence (Vogeleer et al., 2014).

To date, very few studies have focused on the detection and isolation of pathogenic *E. coli* belonging to the STEC and EPEC pathovars in coastal environments (Gourmelon et al., 2006; Bennani et al., 2011). The aim of the study presented here was to detect and characterize STEC and EPEC strains from French shellfish-harvesting areas and their upstream watershed in order to assess the diversity of these pathogenic *E. coli* potentially present in this type of hostile environment. For this purpose, during a 2-years study, shellfish batches, freshwater, seawater, and surface sediment samples from three selected shellfish-harvesting areas and their upstream watersheds, the location of intensive livestock activities (cattle, swine, poultry, and/or sheep), were analyzed monthly to evaluate the presence of STEC and EPEC strains.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling Locations and Sample Description

Shellfish, water, and surface sediment samples were collected from three shellfish-harvesting sites on the French coast of within the Eastern English Channel and their watersheds. One of these sites, located in Brittany (site 1), corresponded to a 121 km<sup>2</sup> watershed, characterized by intensive livestock farming (cattle, swine, and poultry), with a human population of about 9,000 inhabitants. The two others were situated in Normandy; site 2 was characterized by a 1,000 km<sup>2</sup> catchment, with large livestock farming (cattle, sheep, swine, and poultry) and about 40,000 inhabitants, while the second site (site 3) corresponded to a 50 km<sup>2</sup> watersheds with large livestock farming (cattle, sheep, and swine) and about 7,000 inhabitants. These two latter watersheds are geographically closer together than the Brittany site (location of the sites Supplementary Figure S1). The three shellfish-harvesting areas are classified as category B for oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Mytilus edulis*) and as category C for common cockles (*Cerastoderma edule*) according to European regulation (European Directive 91/492/EEC; Anonymous, 2004). Shellfish from category B shellfish-harvesting areas must be depurated before being sold and shellfish from category C areas must be relayed at least 2 months prior to sale for consumption. Shellfish [oyster, mussel, and common cockle batches (site 1,  $n = 120$ ; site 2,  $n = 72$ ; and site 3,  $n = 46$ )] and freshwater samples from nine sampling sites upstream of shellfish-harvesting areas (site 1,  $n = 96$ ; site 2,  $n = 72$ ; site 3,  $n = 48$ ) were collected monthly from February 2013 to January 2015, whereas surface sediment samples (site 1,  $n = 13$ ; site 2,  $n = 13$ ; site 3,  $n = 13$ ) were collected from February 2013 to January 2014 and seawater samples (site 1,  $n = 12$ ) from February 2014 to January 2015.

### Isolation of STEC and EPEC Strains

Samples were transported in insulated cooler boxes to the laboratory and analyzed within 24 h. After opening, total shellfish flesh, including shellfish flesh and intravalvular liquid, were homogenized in a commercial blender (Waring Products Division, Torrington, CT, USA) for 60 s at high speed.

Twenty-five grams of homogenized total shellfish flesh were inoculated into 225 ml of buffered peptone water (BPW). For surface sediments, 10 g were introduced into the same volume of BPW. For water samples, 1 L was filtered using 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose membranes (Pall Gelman GN-6 MetriCel; Pall Corporation, St Germain-en-Laye, France) and the filter was placed in 225 ml of BPW. Incubation was performed at 37°C for 24 h.

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and EPEC strains were isolated from the environmental samples using three additional protocols. The first one, described by Balière et al. (2015), involves application of the ISO/TS-13136 method, which focuses on isolation of strains belonging to the five highly pathogenic serotypes and was applied to samples collected from February 2013 to February 2014. The two other protocols involve the isolation of STEC and EPEC with or without an enrichment step and independently from the serotype. These were applied to samples collected from February 2013 to January 2015.

For the protocol with an enrichment step (described in Balière et al., 2015), DNA was extracted from 500  $\mu\text{L}$  of each BPW enrichment broth using NucliSENS Nucleic Acid Extraction Reagents for miniMAG (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions. The *stx* and *eae* genes were detected by real-time PCR (Agilent MX3000P, Waldbronn, Germany), using primers and probes published previously (Nielsen and Andersen, 2003; Perelle et al., 2007), according to the ISO/TS-13136: 2012 technical specification, with slight modifications concerning the PCR cycles [denaturation for 10 s at 95°C, primer annealing for 5 s at 55°C, and extension for 25 s at 60°C (45 cycles)]. BPW broths identified positive for *stx* and *eae* were screened for STEC and EPEC isolates by streaking 1  $\mu\text{L}$  of these broths onto Tryptone-Bile-X-glucuronide agar (TBX; AES chemunex, Bruz, France) and onto chromID<sup>TM</sup> agar (BioMérieux), followed by incubation at 44°C for 24 h.

The final protocol to be used involves the screening of *E. coli* isolated directly from the water and shellfish samples without an enrichment step. For this protocol, 1, 10, and 100 ml of water were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose membranes and the filters were placed onto TBX agar. For shellfish, 10 g of blended total shellfish flesh were distributed onto five empty and sterile plates with overlay super-cooled TBX agar. All TBX plates were incubated at 44°C for 24 h. Presumptive STEC and EPEC isolates were confirmed by real-time PCRs targeting *stx1*, *stx2*, and *eae* genes, as described above after a DNA extraction of each isolate by boiling at 100°C, for 15 min.

The STEC and EPEC isolates were characterized using several protocols as described below.

### Serotyping

The serotypes of the STEC and EPEC strains were characterized using the serotyping method by agglutination, as described by Blanco et al. (2003).

More precisely, determination of O and H antigens was carried out by agglutination as previously described (Guinée et al., 1981), employing all available O (O1-O185) and

H (H1-H56) antisera. All antisera were absorbed with the corresponding cross-reacting antigens to remove the non-specific agglutinins. The O and H antisera were produced in the Laboratorio de Referencia de *E. coli* (USC, Lugo, Spain). Isolates that did not react with O antisera were considered as non-typeable (ONT) and those non-motile were HNM.

## Detection of Enterohemolysin and Adhesin

The presence of *ehxA* (encoding enterohemolysin A) and *saa* (encoding STEC autoagglutinating adhesin) genes in these isolates was investigated by conventional PCR using primers previously described by Paton and Paton (2002).

## Phylogenetic Group

Isolates were classified into the four main *E. coli* phylogenetic groups (A, B1, B2, or D) using a conventional triplex PCR method based on the detection of two genes, *chuA*, required for heme transport in enterohemorrhagic O157:H7 *E. coli*, *yjaA*, initially identified in the recent complete genome sequence of *E. coli* K-12, for which the function is unknown, and of an anonymous DNA fragment designated TSPE4.C2 using primers described previously by Clermont et al. (2000).

## Pulsed-field Gel Electrophoresis

The genetic relatedness of the isolates was studied by the pulsed-field gel electrophoresis method (PFGE) according to Bidet et al. (2005). Isolated strains were inoculated in nutrient broth containing 1.3% NaCl (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) and incubated at 37°C for 24 h. Bacterial DNA was extracted from 400 µl of the enrichment broth using the CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's recommendations. Bacterial DNA was digested for between 16 and 20 h at 37°C with the restriction endonuclease *XbaI* (Roche Diagnostic, Meylan, France) according to the manufacturer's recommendations. Each electrophoresis was performed using a lambda ladder molecular mass marker (Bio-Rad) for the normalization of gel images. The migration was performed on a 1% agarose gel using the CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad) at 6 V cm<sup>-1</sup> for 27 h, with pulse times varying linearly between two and 49 s. The bacterial DNA restriction patterns were analyzed using the Bionumerics software 7.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The similarity of PFGE profiles was compared and a dendrogram was created using the band-based Dice unweighted-pair group method, using average linkages (UPGMA), based on 1% position tolerance and 0% position optimization. Branch quality was evaluated using Cophenetic correlation. PFGE patterns were considered clonally related when they had a similarity coefficient higher than 80%.

## Multilocus Sequencing Typing

The genetic relatedness of the isolates was also studied using the multilocus sequencing typing method (MLST). Fragments of seven housekeeping genes, i.e., *adhA* (adenylate

kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (DNA gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *purA* (adenylosuccinate dehydrogenase), and *recA* (ATP/GTP binding motif) were amplified and sequenced using suitable primers (Wirth et al., 2006) with minor modifications for the *recA* primers (*recAR* 5'-TCG-TCG-AAA-TCT-ACG-GAC-CGG-A-3'; *recAF1* 5'-ACC-TTT-GTA-GCT-GTA-CCA-CG-3'). The PCR cycle included denaturation for 60 s at 95°C, primer annealing for 60 s at 56°C (for *adhA*, *purA*, *recA*, and *icd*), at 65°C (for *mdh* and *gyrB*), or at 68°C (for *fumC*), and extension for 60 s at 72°C (35 cycles) in MJ Research PTC-200 (DNA Engine, Waltham, MA, USA). Sequencing was performed in both directions with the fluorescent dye terminator Sanger method on ABI3730 (Applied Biosystem) by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). The alleles and sequence types (ST) were assigned in accordance with the *E. coli* MLST database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

## Static Biofilm Formation Assay

A biofilm formation assay was performed as previously described by Tremblay et al. (2015). In addition to the incubation temperature of 30°C, the ability to form biofilms was also tested at 18°C, in order to reproduce marine temperate environmental conditions (Moldoveanu, 2012). Briefly, overnight cultures at 37°C in LB media were diluted (1:100) in 5 ml of M9 medium with glucose (0.4% wt/vol) and minerals (1.16 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 µM FeCl<sub>3</sub>, 8 µM CaCl<sub>2</sub>, and 16 µM MnCl<sub>2</sub>) and incubated for 24 h at 37°C. These cultures were diluted (1:100) in M9 medium supplemented with glucose and minerals and were inoculated in triplicate into microtitre plates (Costar 3370; Corning, NY, USA). After 24 h of incubation at 18 or 30°C, unattached cells were removed by washing three times with phosphate-buffered saline (PBS). Plates were dried at 37°C for 15 min and biofilms were stained with crystal violet (0.1% wt/vol) for 2 min. After removal of crystal violet solution, the biofilms were washed three times with PBS and dried at 37°C for 15 min. The biofilm stain was dissolved with 150 µl of 80% (vol/vol) ethanol and 20% (vol/vol) acetone and biofilms were quantified by measuring the absorbance at 590 nm (OD<sub>590</sub>) with a microplate reader (Powerwave; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The results for the static biofilms formed at 18 and 30°C were compared using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *post hoc* comparison using GraphPad Prism, version 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Strains were divided into three groups based on the OD<sub>590</sub> of bacterial biofilm: strong ( $A_{590} > 0.6$ ), medium ( $0.6 \geq A_{590} \geq 0.3$ ) and weak or none ( $A_{590} < 0.3$ ).

## Antibiotic Resistance

Antimicrobial susceptibility testing based on the disk diffusion method was performed on a selection of STEC and EPEC isolates. Sixteen antibiotics were tested: Tobramycin (10 µg), Fosfomicin (50 µg), Cefalotin (30 µg), Imipenem (10 µg), Tigecyclin (15 µg), Gentamycin (15 µg), Cefotaxim (30 µg), Cefoxitin (30 µg), Doxycyclin (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Augmentin (20 µg)



amoxicillin; 10 µg clavulanic acid), Ticarcillin (75 µg), Bactrim (1.25 µg trimethoprim; 23.75 µg sulfamethoxazol), Nalidixic acid (30 µg), Amikacin (30 µg), Amoxicillin (25 µg) on Mueller-Hinton medium (AES chemunex, Bruz, France). Plates were incubated at 37°C for 24 h.

## Environmental Data and Statistical Analysis

Rainfall data (2-days cumulative rainfall before sampling date) were provided by the meteorological stations from Meteo France at Pleurtuit (site 1) and at Coutances (sites 2 and 3). The water temperature was measured manually at each sampling. The data on temperature and precipitation were categorized into three groups whose boundaries were defined so that they are likely to categorize the data significantly for the studied sites and they allow to have in each category a number of sample consistent with a reliable statistical analysis. Comparisons of STEC and EPEC prevalence between the type of samples, the site, the season, the temperature and the precipitation were analyzed by the chi-square test. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Detection and Isolation of STEC and EPEC Strains

The *stx* gene was detected in 30.3, 85.9, 41.7, and 28.2% of shellfish, freshwater, seawater and surface sediment enrichment broths, respectively (Table 1). The *eae* gene was detected in 74.8, 100, 100, and 43.6% of shellfish, freshwater, seawater, and surface sediment enrichment broths, respectively (Table 1). STEC were isolated from 5.0% of the 238 shellfish, 5.6% of the 216 freshwater, 8.3% of the 12 seawater, and 2.6% of the 39 surface sediment samples analyzed, whereas EPEC were isolated from 8.0, 21.3, and 33.3% of the shellfish, freshwater, and seawater samples, respectively. No EPEC were isolated from surface sediments (Table 2). A total of 57 STEC and 117 EPEC isolates were obtained from these samples. However, as 29 STEC and 28 EPEC had identical serotypes, PFGE and MLST patterns, virulence gene profiles, and phylogroups to other isolates cultivated from the same samples, they were considered to be replicates and not retained. The remaining 28 STEC and 89 EPEC isolates represented 0.2 and 0.7% of the total *E. coli* (*n* = 12,016), respectively (Table 3).

TABLE 2 | Isolation of STEC and EPEC as regard to sample parameters.

Sample parameter	No. of samples	No. of samples with at least one STEC isolate (%) <sup>a</sup>	No. of samples with at least one EPEC isolate (%) <sup>a</sup>
<b>Type</b>			
Shellfish	238	12 (5.0)	19 (8.0)
Freshwater	216	12 (5.6)	46 (21.3)
Seawater	12	1 (8.3)	4 (33.3)
Superficial sediment	39	1 (2.6)	0
$\chi^2$ test		<i>p</i> = 0.845	<i>p</i> = 3.09 10 <sup>-5</sup>
<b>Site</b>			
Site 1	241	10 (4.1)	34 (14.1)
Site 2	157	7 (4.5)	20 (12.7)
Site 3	107	9 (8.4)	15 (14.0)
$\chi^2$ test		<i>p</i> = 0.244	<i>p</i> = 0.931
<b>Season</b>			
Fall	146	4 (2.7)	11 (7.5)
Summer	126	17 (13.5)	22 (17.5)
Autumn	124	3 (2.4)	24 (19.4)
Winter	109	2 (1.8)	12 (11.0)
$\chi^2$ test		<i>p</i> = 4.44 10 <sup>-5</sup>	<i>p</i> = 0.0314
<b>Temperature (°C)</b>			
0-<10	172	5 (2.9)	15 (8.7)
10-<15	189	14 (7.4)	29 (15.3)
15->15	144	7 (4.9)	25 (17.4)
$\chi^2$ test		<i>p</i> = 0.167	<i>p</i> = 0.086
<b>Precipitation (mm)<sup>b</sup></b>			
0-<1	253	17 (6.7)	30 (11.9)
1-<10	144	5 (3.5)	21 (14.6)
10->10	108	4 (3.7)	18 (16.7)
$\chi^2$ test		<i>p</i> = 0.296	<i>p</i> = 0.495
<b>Total</b>	<b>505</b>	<b>26 (5.1)</b>	<b>69 (13.7)</b>

<sup>a</sup>Percentage calculated based on the total of no. samples for each type of sample.

<sup>b</sup>Precipitation: 2-days cumulative rainfall before sampling date.

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains represented 0.2, 0.2, and 0.3%, of the isolated *E. coli* from sites 1–3, respectively. EPEC strains represented 0.8, 0.6, and 0.7% of the isolated *E. coli* from sites 1–3, respectively (Table 3).

For the three sites, the majority of STEC strains derived from freshwater samples (50, 57.1, and 44.4% of samples from sites 1–3, respectively) and from shellfish batches (41.7, 42.9, and 44.4% in the sites 1–3, respectively; Table 3). Only two STEC strains were isolated from seawater and surface sediment samples from sites

TABLE 1 | Prevalence of *stx* and *eae* genes in shellfish, freshwater, seawater, and superficial sediment enrichment broths.

Type of sample	No. of samples	No. of <i>stx</i> -positive broth (%) <sup>a</sup>	No. of <i>eae</i> -positive broth (%) <sup>a</sup>	No. of <i>stx</i> - and <i>eae</i> -positive broth (%) <sup>a</sup>
Shellfish	238	72 (30.3)	178 (74.8)	64 (26.9)
Freshwater	216	196 (85.9)	216 (100)	196 (85.9)
Seawater	12	5 (41.7)	12 (100)	5 (41.7)
Superficial sediment	39	11 (28.2)	17 (43.6)	8 (20.5)
<b>Total</b>	<b>505</b>	<b>284 (56.2)</b>	<b>423 (83.7)</b>	<b>273 (54.1)</b>

<sup>a</sup>Percentage calculated based on the total of no. samples for each type of sample.

**TABLE 3 | Number of STEC and EPEC strains isolated from shellfish, freshwater, seawater, and superficial sediment samples collected in the three shellfish-harvesting areas and their watersheds, as regard to the total number of *E. coli* isolates.**

Type of sample	Total (%) <sup>a</sup>	Shellfish (%)	Freshwater (%)	Seawater (%)	Superficial sediment (%)
<b>Site 1</b>					
No. <i>E. coli</i> isolates	5,676	1,343	3,410	225	30
No. STEC strains	12 (0.2)	5 (41.7) <sup>b</sup>	6 (50.0) <sup>b</sup>	1 (8.3) <sup>b</sup>	0
No. EPEC strains	47 (0.8)	8 (17.4) <sup>b</sup>	35 (76.1) <sup>b</sup>	4 (8.5) <sup>b</sup>	0
<b>Site 2</b>					
No. <i>E. coli</i> isolates	3,682	757	2,925	nd <sup>c</sup>	4
No. STEC strains	7 (0.2)	3 (42.9) <sup>b</sup>	4 (57.1) <sup>b</sup>	nd	0
No. EPEC strains	23 (0.6)	10 (43.5) <sup>b</sup>	13 (56.5) <sup>b</sup>	nd	0
<b>Site 3</b>					
No. <i>E. coli</i> isolates	2,658	678	2,036	nd	83
No. STEC strains	9 (0.3)	4 (44.4) <sup>b</sup>	4 (44.4) <sup>b</sup>	nd	1 (11.1) <sup>b</sup>
No. EPEC strains	19 (0.7)	5 (26.3) <sup>b</sup>	14 (73.7) <sup>b</sup>	nd	0
<b>Total of the three sites</b>					
No. <i>E. coli</i> isolates	12,016	2,778	8,371	225	117
No. STEC strains	28 (0.2)	12 (42.9) <sup>b</sup>	14 (50.0) <sup>b</sup>	1 (3.6) <sup>b</sup>	1 (3.6) <sup>b</sup>
No. EPEC strains	89 (0.7)	23 (25.8) <sup>b</sup>	62 (69.7) <sup>b</sup>	4 (4.5) <sup>b</sup>	0

<sup>a</sup>Percentage calculated based on the total of no. *E. coli* isolates from each sites. <sup>b</sup>Percentage calculated based on the total of no. STEC or EPEC strains isolated from the three sites. <sup>c</sup>nd: non-determined.

1 and 3, respectively. The majority of EPEC strains derived from the freshwater samples (76.1, 56.5, and 73.7% of samples from sites 1–3, respectively) and the remaining EPEC derived from shellfish batches (17.4, 43.5, and 26.3%, respectively) and seawater samples (8.5% only in the site 1; **Table 3**).

Nearly one third of the STEC strains were obtained from samples collected in May 2013 (32.1%, 9/28), whereas the EPEC strains were mostly obtained from samples collected in November 2013 (21.3%, 19/89) and August 2014 (12.4%, 11/89; **Table 4**). The entire sample set demonstrated a seasonal effect with potential pathogenic *E. coli* as STEC strains were significantly more frequently isolated in Summer and EPEC strains in Summer and Autumn ( $p < 0.05$ ; **Table 2**). However, no correlation between the prevalence of both STEC and EPEC and pluviometry nor temperature was observed (**Table 2**).

## Virulence Gene Profiles

By considering the presence of a single virulence gene or a combination of the four virulence genes investigated (i.e., *stx*, *eae*, *ehxA*, and *saa*) in the 117 STEC or EPEC strains, eight virulence gene profiles were found. The most frequent profile presented the *eae* gene only (70.1% of the strains) followed by the profile presenting the *stx2* gene only (11.1%) and the profile presenting the *stx1* gene only (7.7%). Seven strains (6.0%) were shown to possess the *eae* and *ehxA* genes. The *stx1-stx2-ehxA-saa* profile was found in three strains and three other virulence gene profiles were observed only once, i.e., the *stx1-eae-ehxA*, the *stx1-stx2-saa*, and the *stx2-ehxA-saa* profiles (**Table 4**).

Seven STEC strains carrying *stx1*, three carrying *stx2*, and two carrying both *stx1* and *stx2* genes were isolated from the site 1 whereas three STEC strains harboring the *stx1* gene, 11 the *stx2* gene, and two presenting both *stx1* and *stx2* genes were recovered from sites 2 and 3.

## Phylogroups

The STEC strains ( $n = 28$ ) were mainly distributed among the phylogroups A, B1, and D (39.3, 35.7, 21.4%, respectively). Only one strain belonged to phylogroup B2. The EPEC strains ( $n = 89$ ) belonged to all the phylogroups; the strains from phylogroup B1 and B2 (38.2 and 38.2%, respectively) being more prevalent than those from phylogroups A and D (18.0 and 5.7%, respectively; **Table 5**). More precisely, at site 1, the STEC strains were mainly divided between phylogroups B1 and D. At sites 2 and 3, the STEC strains were divided between phylogroups A and B1. At sites 1–3, the EPEC strains belonged to all the investigated phylogroups, with a majority belonging to phylogroups B1 and B2.

## Serotyping

The 117 (STEC or EPEC) strains selected in this study belonged to 44 O antigens and 24 H antigens and presented 75 distinguishable serotypes (**Table 4**). Among all strains, 13 strains were non-typable (NT) for the O antigen [ONT:H2 ( $n = 1$ ), ONT:H31 ( $n = 1$ ), ONT:H34 ( $n = 1$ ), ONT:H6 ( $n = 6$ ), ONT:H8 ( $n = 2$ ), ONT:H10 ( $n = 1$ ), ONT:H11 ( $n = 1$ )] and 24 strains were uncharacterized for the H antigen (HNM: non-motile or HNT: non-typable). Two strains were non-typable for either antigens (ONT:HNT).

Eighteen different serotypes (O:H) were identified among the STEC strains. Only one STEC belonging to one of the five highly pathogenic serotypes was isolated: an O26:H11 *stx1*<sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup>, and *ehxA*<sup>+</sup> strain, from a mussel batch. One strain from serotype O91:H21 and carrying *stx1*, *stx2*, *ehxA*, and *saa* genes was also identified among the STEC strains. The most detected serotype among the STEC strains was the O100:HNM ( $n = 9$ ). Fifteen additional serotypes (O149:H31/HNM, O154:H31/HNM, O130:H11, O15:H16, O185:H28, O2:H32, O28:H1, O63:H11, O76:H19, O8:H12, O88:H25, ONT:H10, and ONT:H11) were

**TABLE 4 | Characteristics of STEC and EPEC strains isolated from the three French shellfish-harvesting sites from the Eastern English Channel coastal area and their watersheds.**

Serotype (no. of isolate)	Virulence gene (no. of isolate)	Sample origin (no. of isolate)	Sampling site (no. of isolate)	Sampling month-year	Precipitation (mm)
<b>STEC</b>					
O100:HNM (9)	<i>stx2</i>	SFm(1), SFc(1),	2	May-13	0.1
		FW(1), SFo(1), SFm(1)	3	May-13	0.1
		SFm(1), S(1)	3	June-13	6.1
		SFm	2	March-14	0.1
		SFo	3	June-14	0
O15:H16(1)	<i>stx2</i>	SFm	1	June-13	0.2
O2:H32(1)	<i>stx2</i>	SW	1	February-14	0
O8:H19(2)	<i>stx2</i>	FW	3	June-14	0
		FW	3	July-14	1.4
O149:H1(1)	<i>stx1</i>	FW	1	April-13	1.6
O149:HNM(1)	<i>stx1</i>	FW	1	April-13	1.6
O154:H31(2)	<i>stx1</i>	SFo(1), FW(1)	1	May-13	0.1
O154:HNM(1)	<i>stx1</i>	SFm	1	November-14	15.4
O28:H1(1)	<i>stx1</i>	SFc	1	March-14	0.1
O76:H19(1)	<i>stx1</i>	FW	2	August-14	26.0
O88:H25(1)	<i>stx1</i>	FW	2	September-14	0.4
ONT:H10(1)	<i>stx1</i>	FW	2	April-14	0.3
O26:H11(1)	<i>stx1+eae+ehxA</i>	SFm	1	November-13	15.4
O63:H6(1)	<i>stx2+ehxA+saa</i>	FW	1	November-14	24.0
ONT:H11(1)	<i>stx1+stx2+saa</i>	FW	1	May-13	1.8
O185:H28(1)	<i>stx1+stx2+ehxA+saa</i>	FW	2	Apr-13	1.6
O130:H11(1)	<i>stx1+stx2+ehxA+saa</i>	FW	1	December-13	0
O91:H21(1)	<i>stx1+stx2+ehxA+saa</i>	FW	3	May-13	1.8
<b>EPEC</b>					
O103:H25(1)	<i>eae</i>	FW	3	March-14	0.1
O103:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	1	February-14	0
O108:H21(3)	<i>eae</i>	FW	3	November-13	0.1
		SFc	2	January-14	6.5
		FW	3	July-14	1.4
O113:H6(4)	<i>eae</i>	SFm(1), SFc(1)	1	November-13	15.4
		FW	3	November-13	0.1
		SFo	3	August-14	26
O116:H20(1)	<i>eae</i>	FW	1	November-13	15.4
O125:H6(2)	<i>eae</i>	FW	1	November-13	15.4
		FW	2	September-14	0.4
O128:H2(1)	<i>eae</i>	FW	2	November-13	0
O137:H6(2)	<i>eae</i>	FW	1	August-13	1.0
		FW	3	January-15	2.3
O145:H34(1)	<i>eae</i>	FW	1	July-14	6.5
O146:H21(1)	<i>eae</i>	SFm	3	August-14	26.0
O146:H6(1)	<i>eae</i>	SFc	2	September-14	0.4
O15:H2(2)	<i>eae</i>	FW	3	August-14	26.0
		SFm	2	January-15	2.3
O153:H21(1)	<i>eae</i>	FW	1	January-14	7.2
O157:H16(1)	<i>eae</i>	FW	1	July-14	6.5
O159:H7(1)	<i>eae</i>	FW	1	November-14	24.0
O167:H3(1)	<i>eae</i>	FW	1	August-13	2.8
O179:H31(2)	<i>eae</i>	FW	1	January-14	7.2
		FW	3	June-14	0
O2:H45(1)	<i>eae</i>	FW	2	December-13	0
O20:HNT(1)	<i>eae</i>	SW	1	April-14	0

(Continued)

TABLE 4 | Continued

Serotype (no. of isolate)	Virulence gene (no. of isolate)	Sample origin (no. of isolate)	Sampling site (no. of isolate)	Sampling month-year	Precipitation (mm)
O23:H8(2)	<i>eae</i>	FW	2	August-13	0.7
		SFc	2	August-14	26.0
O25:H2(1)	<i>eae</i>	FW	1	September-14	0
O28:H16(1)	<i>eae</i>	SFm	1	November-13	15.4
O29:H19(1)	<i>eae</i>	FW	2	October-13	22.8
O33:H6(1)	<i>eae</i>	FW	1	February-14	0
O39:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	1	January-14	7.2
O40:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	1	February-14	0
O42:H37(1)	<i>eae</i>	FW	3	March-13	0
O5:H40(1)	<i>eae</i>	SFm	2	February-13	0.8
O51:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	2	October-13	22.8
O63:H6(4)	<i>eae</i>	FW	1	November-13	15.4
		FW	2	November-13	0.1
		FW	1	January-14	7.2
		FW	3	October-14	0.5
O63:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	3	October-14	0.5
O71:H49(2)	<i>eae</i>	SFm(1), SFc(1)	1	October-13	0.4
O71:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	1	August-14	1.0
O8:H14(1)	<i>eae</i>	FW	1	November-13	15.4
O85:H31(1)	<i>eae</i>	FW	1	October-14	8.3
O85:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	1	August-14	1.0
O86:H31(1)	<i>eae</i>	SFc	2	August-14	26.0
O88:H25(1)	<i>eae</i>	SFm	3	September-14	0.4
O88:H8(1)	<i>eae</i>	SFo	3	August-14	26.0
O9:HNM(1)	<i>eae</i>	FW	2	November-13	0.1
O91:H10(1)	<i>eae</i>	SFc	1	July-14	6.5
O98:H56(1)	<i>eae</i>	FW	1	December-14	0
O98:H8(1)	<i>eae</i>	SFm	1	November-13	15.4
O98:HNM(2)	<i>eae</i>	SW	1	February-14	0
		FW	1	March-14	0
O98:HNT(1)	<i>eae</i>	FW	1	December-14	0
ONT:H2(1)	<i>eae</i>	FW	1	August-13	2.8
ONT:H31(1)	<i>eae</i>	FW	1	October-14	8.3
ONT:H34(1)	<i>eae</i>	FW	3	December-14	10.6
ONT:H6(6)	<i>eae</i>	FW	1	September-13	1.0
		FW	1	August-14	1.0
		FW	3	September-14	0.4
		FW	3	October-14	0.5
		SFm	2	December-14	0
		SW	1	December-14	10.6
ONT:H8(2)	<i>eae</i>	FW	1	April-14	0
		FW	1	August-14	1
ONT:HNT(2)	<i>eae</i>	SW	1	November-14	24.0
		FW	3	October-14	10.6
O28:HNM(1)	<i>eae+ehxA</i>	FW	1	June-14	0.2
O145:H28(2)	<i>eae+ehxA</i>	SFm(1), SFc(1)	2	June-13	6.1
O177:H11(1)	<i>eae+ehxA</i>	FW	2	July-14	1.4
O26:H11(6)	<i>eae(5), eae+ehxA(1)</i>	FW	2	August-13	0.7
		FW(3), SFm(1), SFc(1)	1	November-13	15.4
O103:H2(3)	<i>eae(2), eae+ehxA(1)</i>	FW	2	February-13	0.8
		FW	2	June-13	6.1
		FW	1	November-13	15.4
O153:H2(3)	<i>eae(2), eae+ehxA(2)</i>	SFm(1), FW(1)	2 (1), 3 (1)	March-14	0.1
		SFc	2	July-14	1.4

NT, non-typable; NM, non-motile. Sample origin: SF: shellfish, o: oyster, m: mussel, c: cockle, FW: freshwater, SW: seawater, S: superficial sediment. ( ): number of strain and when it is not specified the no. of strain is one. (1) Brittany site, (2) first Normandy site, and (3) second Normandy site. Precipitation: 2-days cumulative rainfall before sampling date.



**TABLE 5 | Distribution of phylogroup A, B1, B2, and D among STEC and EPEC strains isolated in the three French shellfish-harvesting sites from the Eastern English Channel coastal area and their watersheds.**

Phylogroup	Total	A (%)	B1 (%)	B2 (%)	D (%)
<b>Site 1</b>					
No. STEC strains (%) <sup>a</sup>	12	2 (16.7)	4 (33.3)	0	6 (50.0)
No. EPEC strains (%) <sup>b</sup>	47	13 (27.7)	13 (27.7)	19 (40.4)	2 (4.4)
<b>Site 2</b>					
No. STEC strains (%) <sup>a</sup>	7	3 (42.9)	3 (42.9)	1 (14.2)	0
No. EPEC strains (%) <sup>b</sup>	23	2 (8.7)	13 (56.5)	5 (21.7)	3 (13.0)
<b>Site 3</b>					
No. STEC strains (%) <sup>a</sup>	9	6 (66.7)	3 (33.3)	0	0
No. EPEC strains (%) <sup>b</sup>	19	1 (5.3)	8 (42.1)	10 (52.6)	0
<b>Total of the three sites</b>					
No. STEC strains (%) <sup>c</sup>	28	11 (39.3)	10 (35.7)	1 (3.6)	6 (21.4)
No. EPEC strains (%) <sup>c</sup>	89	16 (18.0)	34 (38.2)	34 (38.2)	5 (5.7)

<sup>a</sup>Percentage calculated based on the total no. of STEC strains isolated from each site. <sup>b</sup>Percentage calculated based on the total no. of EPEC strains isolated from each site. <sup>c</sup>Percentage calculated based on the total no. of STEC and EPEC strains isolated from the three sites.

identified within the STEC strains and contained one or two individual isolates each.

Fifty-seven serotypes were identified among the EPEC strains. Eleven strains belonged to the highly pathogenic serotypes: O26:H11 ( $n = 6$ ), O103:H2 ( $n = 3$ ), and O145:H28 ( $n = 2$ ). The remaining EPEC strains belong to a large diversity of serotypes listed in **Table 4**.

It should be noted that some serotypes were isolated at different months and in different types of samples. For example, the nine strains of serotype O100:HNM *stx2*<sup>+</sup> were isolated from seven shellfish batches ( $n = 7$ ; oyster, mussel, and common cockle batches), from one freshwater ( $n = 1$ ) and from one surface sediment sample ( $n = 1$ ). Three O154:H31 *stx1*<sup>+</sup> and their immotile form were isolated from two shellfish batches ( $n = 2$ ; oyster and mussel batches) and from one freshwater sample ( $n = 1$ ). The EPEC serotypes, O108:H21 ( $n = 3$ ), O113:H6 ( $n = 4$ ), O15:H2 ( $n = 2$ ), O153:H2 ( $n = 3$ ), O23:H8 ( $n = 2$ ), O26:H11 ( $n = 6$ ), and O71:H49/HNM ( $n = 3$ ) were all isolated from shellfish batches and also from freshwater samples (**Table 4**).

The same serotypes were sometimes isolated from geographically independent sites. For example, serotypes O103:H2, O125:H6, and O26:H11 were isolated from sites 1 and 2 and serotypes O113:H6, O137:H6, and O179:H31 from sites 1 and 3. Finally, the O63:H6 and ONT:H6 serotypes were isolated from all the three sites (**Table 4**).

## PFGE and MLST Profiles

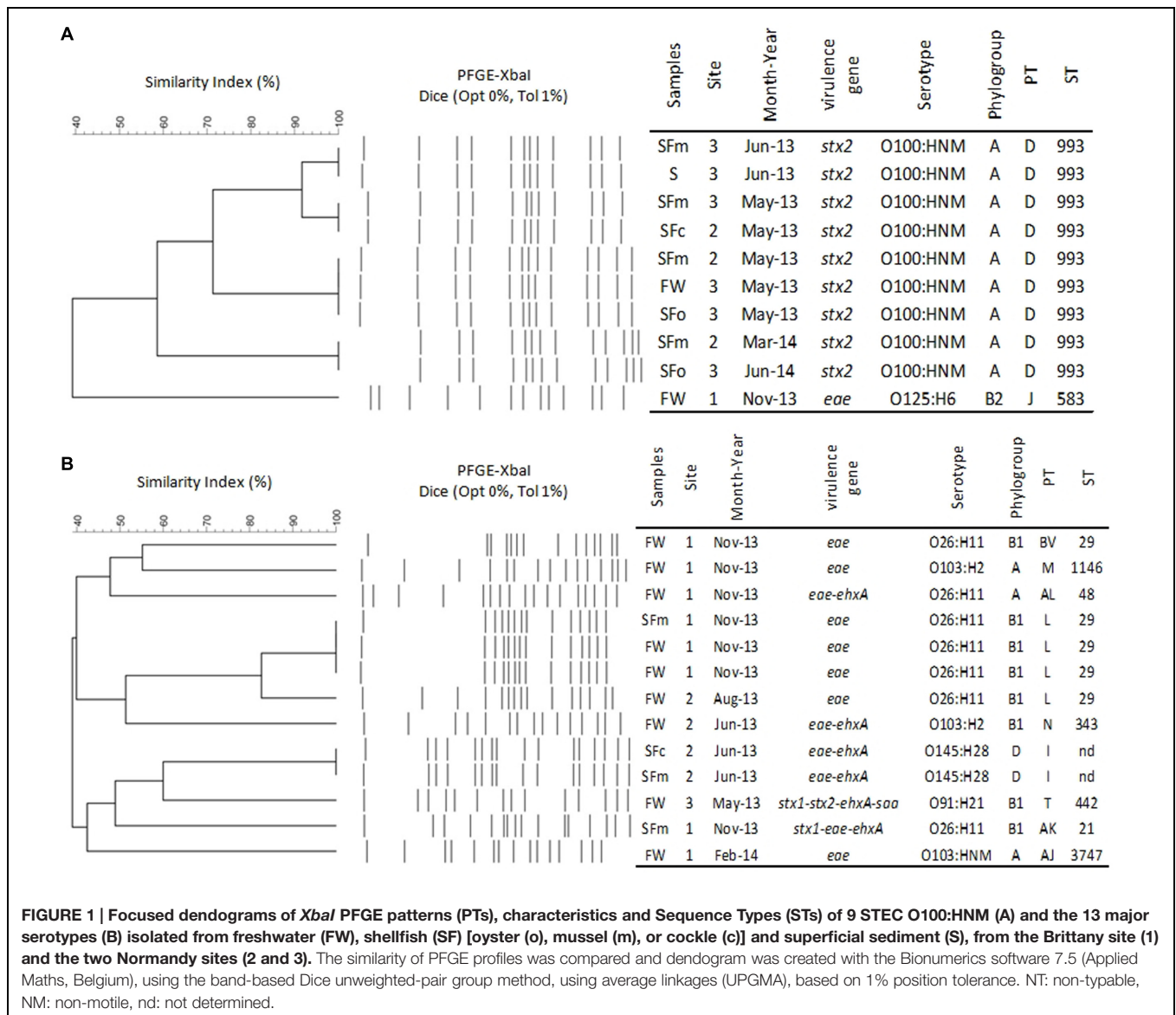
The genetic relatedness of 26 STEC and 79 EPEC strains was investigated by PFGE and MLST analysis (Supplementary Figure S2). Seventy-nine distinguishable PFGE patterns (PT) and 46 distinguishable sequence types (STs) were obtained. Seven other STs (seven strains, one STEC and six EPEC) were obtained but have not as yet been described. These results demonstrate a high level of genetic diversity among the strains isolated. The highest diversity was observed for the EPEC strains, which represented 8.1% of the PTs identified (64/79) and 71.7% of the STs (33/46).

The STEC serotype O100:HNM ( $n = 9$ ) presented identical PT (D) and ST (ST933; **Figure 1A**) despite of their three specificities:

isolated (a) from oyster, mussel, and common cockle batches, freshwater, and superficial sediment samples, (b) from the sites 2 and 3, (c) during the sampling campaigns of May 2013, June 2013, March 2014, and June 2014. With regards to the major serotypes (**Figure 1B**), the six EPEC O26:H11 strains presented three additional PTs (i.e., L, BV, and AL) and two STs (i.e., ST29 and ST48) isolated from mussel and common cockle batches and freshwater samples. One of those belonging to the ST29 was isolated from the same mussel batch from which the STEC O26:H11 belonging to the ST21 was isolated. A unique PT (I) was observed for the two EPEC O145:H28 (ST not yet described), isolated from mussel and common cockle batches and sampled during the same campaign (June 2013). Both O103:H2 isolated during two different months (i.e., June 2013 and November 2013) had distinguishable PTs (i.e., M and N) and STs (i.e., ST1146 and ST343). Additionally, identical PTs and STs were found among the other STEC and EPEC strains isolated from different types of sample (i.e., shellfish vs. freshwater) or between shellfish batches (i.e., mussel vs. common cockle) and between freshwater samples, often from samples taken from the same sites on the same date (e.g., O153:H2, O108:H21 serotypes; Supplementary Figure S2).

## Biofilm Formation

Biofilm formation by a subset of 13 EPEC and nine STEC strains was evaluated at 18 and 30°C on plastic surface. At both temperatures, strains varied in their ability to form biofilm (OD<sub>590</sub> = 0.03 for the lowest, OD<sub>590</sub> = 1.9 for the highest). In general, a large number of strains were strongly to moderately adherent and more strains formed a biofilm at 18 than at 30°C (**Figure 2**). Indeed, 11 of the 22 strains formed strong biofilms [serotypes O2:H32, O149:H1, ONT:H11, O91:H21, O185:H28, O26:H11 ( $n = 2$ ), O145:H28 ( $n = 1$ ), O103:H2 ( $n = 3$ )], six formed medium biofilms [serotypes O26:H11 ( $n = 3$ ), O145:H28 ( $n = 2$ ) and O125:H6] and five formed weak biofilms or no biofilm at all [serotypes O100:HNM, O154:H31, O15:H16, and O26:H11 ( $n = 2$ )]. At 30°C, 11 strains formed strong biofilms [serotypes O2:H32, O149:H1, ONT:H11, O91:H21, O185:H28, O145:H28 ( $n = 3$ ), O103:H2 ( $n = 2$ ) and O125:H6] but



fewer ( $n = 2$ ) were able to form a medium biofilm (O26:H11 and O145:H28) and nine formed a weak biofilm [serotypes O100:HNM, O15:H16, O154:H31, O26:H11 ( $n = 6$ ); **Figure 2**]. Interestingly, all O26:H11 strains formed significantly (Mann-Whitney test) more biofilm ( $p < 0.05$ ) at 18°C than at 30°C.

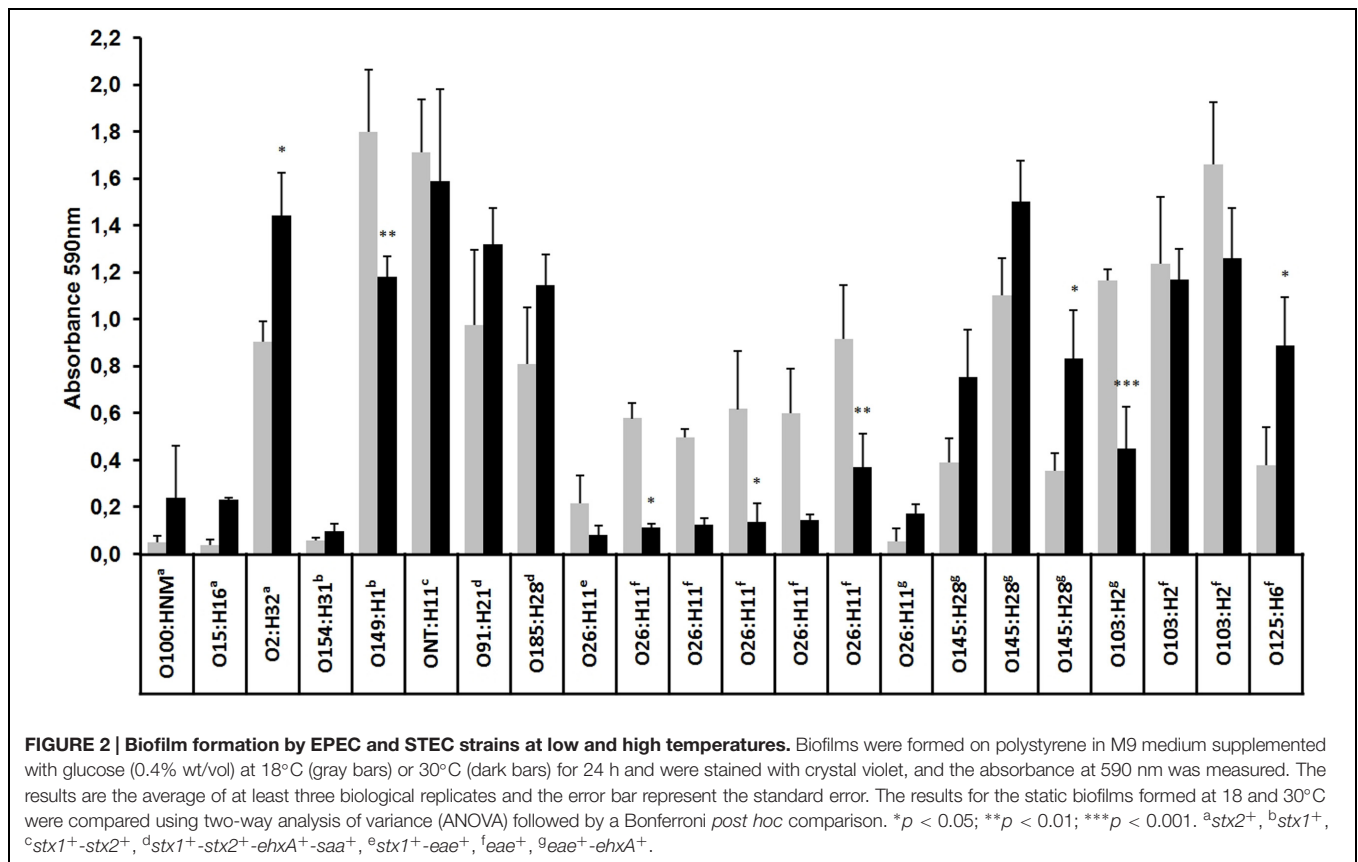
## Antibiotic Resistance

Antimicrobial susceptibility testing based on the disk diffusion method was performed on 38 EPEC strains and on all STEC strains ( $n = 28$ ). Most of the analyzed STEC and EPEC strains [i.e., 85.7% (24/28) and 73.7% (28/38), respectively] were sensitive toward all 16 used antibiotics. Only four STEC strains were resistant to one antibiotic (i.e., Doxycyclin). With regard to EPEC, 7.9% (3/38) of strains [i.e., serotypes O63:H6, O71:H49, and O98:H8] were resistant to one antibiotic (i.e., Doxycyclin or Imipenem) and 13.2% (5/38) of strains were resistant to two antibiotics (i.e., Cefotaxim/Cefoxitin, O63:H6

or Doxycyclin/Bactrim, O26:H11 or Ticarcillin/Amoxicillin, O26:H11,  $n = 3$ ). One of the O26:H11 serotype was resistant to three antibiotics (i.e., Gentamycin/Ticarcillin/Amoxicillin). Finally, the O2:H45 serotype ( $n = 1$ ) was resistant to four antibiotics (i.e., Cefalotin/Imipenem/Cefotaxim/Cefoxitin).

## DISCUSSION

To our knowledge, this study is the first to focus on the detection and characterization of environmental STEC and EPEC strains from shellfish-harvesting areas and their upstream watershed. Overall, among the environmental samples analyzed ( $n = 505$ ), very few STEC (0.2%,  $n = 28$ ) or EPEC (0.7%,  $n = 89$ ) strains were obtained from the *E. coli* that were isolated ( $n = 12,016$ ) and in comparison with the number of shellfish, water or surface sediment samples that were found to be positive for *stx* and



*eae* genes (54.1%, 273/505). The higher proportion of EPEC than STEC strains isolated from these environmental samples is in agreement with the results obtained in previous studies (Hamilton et al., 2010; Chandran and Mazumder, 2015). For example, only 3.6% EPEC and no STEC were detected among the 24,493 *E. coli* isolated from seawater collected in Santa Catalina Island, CA, USA (Hamilton et al., 2010). Conversely, more STEC strains (6.2%) than EPEC strains (1.8%) were isolated from water samples from the Yeongsan river basin in South Korea ( $n = 3,480$  *E. coli*; Jang et al., 2014). The low level of isolation of STEC or EPEC vs. the high frequency of detection of genetic markers in the analyzed samples has also been observed in various studies focusing on cattle feces, food, and samples from the environment (Miyagi et al., 2001; Bai et al., 2015; Bibbal et al., 2015). The low level of isolation of STEC vs. the high detection of *stx* genes in the environmental samples could be explained by the presence of free *stx*-encoding bacteriophages in the environment (Martinez-Castillo et al., 2013) and the presence of viable but non-culturable or dead bacteria as a result of the stressful conditions (sunlight, salinity, oligotrophy, predation, etc.) in riverine and especially coastal environments (Gourmelon et al., 1997, for review Rozen and Belkin, 2001). The difficulties of isolating these bacteria from environmental samples containing a significant background flora could also contribute to this low recovery of strains (Pradel et al., 2000; Gourmelon et al., 2006).

The strains isolated in coastal areas of Brittany (site 1) and Normandy (sites 2 and 3) present a high diversity of serotypes

as has been previously reported for environmental samples in California or Spain (García-Aljaro et al., 2005; Cooley et al., 2014). A subset of the serotypes isolated in the present study was previously isolated from humans, animals, or the environment. Serotypes such as O8:H14, O26:H11, O76:H19, O91:H21, O103:H2/HNM, O145:H28, and O154:H31 have previously been associated with human infections (Beutin and Fach, 2014). In addition, STEC serotypes O130:H11 and O154:HNM were detected in healthy cattle and waters (Hornitzky et al., 2002), the serotype O157:H16 in dogs, humans, and in the environment (Feng et al., 2012), and the serotype O149:H1 in shellfish (Gourmelon et al., 2006). The STEC O100:HNM was previously detected in swine fecal samples, wild boar feces, and drinking water contaminated by waste water (García-Aljaro et al., 2005; Lienemann et al., 2011; Mora et al., 2012).

In addition, a high genetic diversity among the 105 genotyped strains was observed, with 79 PFGE patterns and 46 distinguishable sequence types in agreement with the high genetic diversity observed by PFGE in other studies for STEC and EPEC strains (Bibbal et al., 2015; Singh et al., 2015). In this study, PFGE was found to be more discriminatory than MLST as previously described for bacteria such as *Salmonella* isolated in Californian coastal waters (Walters et al., 2013). For example, seven strains belonging to ST10 (seven different serotypes) were further discriminated into seven distinct PTs (S, AG, AH, AW, X, G, and Y). The identification of numerous PTs and STs highlights the potential presence of different strains in a same sample and

the presence of genetic diversity between strains belonging to the same serotype (e.g., *E. coli* O26:H11 ST21 and ST29 in the same mussel batch).

The non-detection of *E. coli* from the O157:H7 serotype in the shellfish, water and surface sediment samples investigated (from February 2013 to February 2014 ( $n = 282$ , Balière et al., 2015) is in agreement with the low detection or absence of *E. coli* O157 in shellfish and environmental water previously observed (Miyagi et al., 2001; Manna et al., 2008).

Several EPEC strains belonging to the highly pathogenic serogroups (i.e., O26, O103, and O145) were also isolated from some of the shellfish batches or freshwater samples that were analyzed. The STEC O26:H11 ST21 found in a mussel batch was shown to be implicated in STEC infections and has been detected in cattle in Europe (Zweifel et al., 2013).

The EPEC O26:H11 ST29 isolated in this study can be strains with no previous contact with *stx*-bacteriophages or bacteria that have lost the *stx*-bacteriophage either during their passage from their original source to water or shellfish or during their isolation steps. The presence of these bacteria in coastal environments could present a risk to human health as these EPEC could be lysogenized by *stx1*- or *stx2*-converting bacteriophages, which are present in the same environment and could become STEC of the highly pathogenic serotypes. In fact, Bielaszewska et al. (2007) demonstrated that STEC O26 strains can lose their *stx*-bacteriophages and become EPEC O26, and conversely EPEC O26 can be lysogenized by *stx1*- or *stx2*-bacteriophages and become STEC O26. Even if the conversion of strains was found to occur in the digestive tract of different animals (Toth et al., 2003) and in various food matrices (Imamovic et al., 2009), the environment could also provide the conditions for conversion of strains. However, the potential conversion of *E. coli* strains in the environment still needs to be evaluated in more details (Dumke et al., 2006). Interestingly, Solheim et al. (2013) have demonstrated the conversion of an *E. coli* strain (serotype O103:H25) by bacteriophages in a biofilm at 37°C, but also at 20°C.

In addition, another STEC strain isolated in a freshwater sample could present a potential human risk. Indeed, an O91:H21 *E. coli* was found to belong to ST442, a sequence type that had previously been isolated from adult patients in Germany with symptoms that ranged from diarrhea to hemolytic uremic syndrome (Mellmann et al., 2009).

The majority of strains isolated in this study would present low virulence as most of the isolated strains (87.2%) possessed only one of the five virulence genes (*stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, or *saa*); i.e., 70.1% of the strains carried the *eae* gene, 7.7% *stx1* and 11.1% *stx2*. The STEC O26:H11 was the only STEC isolate to carry the *eae* gene. These results are in agreement with previous studies describing STEC strains isolated from the environment (García-Aljaro et al., 2005) with the exception of the analysis of water samples from a Californian central coast agricultural region where Cooley et al. (2014) showed that the majority of STEC strains isolated contained *stx1*, *stx2*, and *eae* genes. The low level of isolation of STEC strains carrying the *saa* gene encoding another adherence factor, the STEC autoagglutinating adhesion, or the gene *ehxA* encoding enterohemolysin A was in

agreement with the results obtained from water samples in Spain by García-Aljaro et al. (2005).

Most of the STEC strains in this study were classified into the A, B1, and D phylogroups. Phylogroups A and B1 were also the main phylogroups of environmental STEC strains isolated by García-Aljaro et al. (2005) in Spain. In the Yeongsan river basin of South Korea, STEC strains isolated belonged mainly to phylogroup D and to a lesser extent to phylogroups A, B1, and B2 (Jang et al., 2014). In Brittany and Normandy, overall, the EPEC strains belonged mainly to phylogroups B1 and B2 and to a lesser extent to A and D. EPEC strains isolated from water samples in South Korea belonged mainly to the B2 phylogroups (Jang et al., 2014). The frequent isolation of *E. coli* from B1 phylogroup in the present study is in agreement with recent data showing that environmentally persistent *E. coli* belong mainly to the B1 phylogroup (Berthe et al., 2013).

Phenotypic differences in the ability to form biofilms among tested strains underline the genetic diversity of STEC or EPEC strains. Our study demonstrates that more than half of the tested strains (17/22) were able to form biofilms on polystyrene at 18 or 30°C, and most of these strains were able to form strong biofilm at 18°C, a temperature close to marine environment condition. A similar result had been observed previously when *E. coli* K12 biofilm was grown at low temperature (White-Ziegler et al., 2008). It has been shown that low temperatures (<30°C) promote the expression of genes associated with biofilm development, including genes involved in curli (*csgA* and *mlrA*) or cellulose (*yaiC*) production (Olsen et al., 1989; Arnqvist et al., 1992; White-Ziegler et al., 2008). Interestingly, although O26:H11 strains formed weaker biofilms than other strains, they formed significantly stronger biofilms at 18°C than at 30°C. Also, all but one O26:H11 strains were negative for *pgaA*, a gene coding for the export of poly-*N*-acetyl-D-glucosamine (PGA) that promotes biofilm formation (Itoh et al., 2008; data not shown). In addition, *pgaA* sequence is also absent in the sequenced genomes of STEC O26 strains available in GenBank. In conclusion, the ability of strains to form a biofilm might contribute to their persistence in coastal environments.

This study highlights the presence of a specific geographic distribution of some of the STEC and EPEC serotypes and a persistence of some of these serotypes in the coastal environments from Brittany and Normandy investigated in this study. The isolation of the serotype O100:HNM positive for *stx2* (PT D and ST993), at different dates (over a period of 1 year), in shellfish, waters and surface sediments from both sites in Normandy (sites 2 and 3), but its absence in Brittany (site 1), highlights potential specific contamination sources in these region and the higher persistence of some of these specific strains. This had previously been shown in water samples from California for O157 strains isolated up to 19 months apart by Cooley et al. (2014). The various livestock breeding in the three watersheds, i.e., mainly swine, poultry and bovine in Brittany and sheep, bovine and swine in Normandy, could explain differences in strain detection at specific sites. A potential explanation of the frequent isolation of the STEC O100:HNM is the high carriage of this *E. coli* strain in the animals in the upstream watersheds. Bibbal et al. (2015) have identified farms harboring STEC bovine carriers, highlighting the



fact that STEC of a given serotype could be carried by several animals belonging to the same farm. A probable prediction of the presence of these STEC strains in the coastal environment is their re-introduction to the water and consequently to shellfish from animal reservoirs, which enables persistence at high titer for months (Cooley et al., 2014). Another explanation could be that they are present in surface sediments in which a better persistence could occur and then they are re-introduced to the water and then filtered and accumulated by shellfish. The evaluation of the persistence of STEC and EPEC (especially those isolated several times in this study, i.e., *E. coli* O100 and *E. coli* O26) in freshwaters and seawaters and in shellfish needs to be studied to better understand their frequent detection in such shellfish-harvesting areas. Several studies have been carried out to evaluate the persistence of STEC in water or superficial sediments and these have shown that some *E. coli* strains are able to persist in the environment for periods of a few days to several months (Fremaux et al., 2010) and that the persistence could be variable according to the serotypes (Ma et al., 2014).

This study critically evaluated the nature of STEC and EPEC strains present in coastal environments. Knowledge of strains circulating in the environment is crucial to the investigation of potential new STEC serotypes and their human health risk. These results confirm that the environment is a reservoir for these strains. The presence of both EPEC strains and *stx*-converting bacteriophages in the same samples could lead to new pathogenic *E. coli*.

The risk of a human infection by STEC caused by shellfish consumption seems to be limited for two reasons. First, a depuration step or relaying step has to be performed before

shellfish from category B and C areas, respectively, reach market. Secondly, STEC were present in only a few samples and the majority of STEC strains lacked genes associated with high human virulence, such as *eae*, and few of the STEC isolated in this study have previously been shown to be involved in human infections.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the European Regional Development Fund Interreg IVA Programme, as part of the collaborative project RiskManche. The thesis of CB was supported by a grant from Ifremer and the Agence de l'Eau Loire-Bretagne. We thank Clémence Balière from the University of Caen and Céline Courroux from Hôpital Robert-Debré, for their participation in the sampling and technical assistance and Dominique Hervio-Heath (Ifremer) and Huw Taylor (University of Brighton, UK) for their critical review of the manuscript. Work in the LREC-USC-laboratory was financed by the grant CN2012/303 from Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (Xunta de Galicia) and The European Regional Development Fund, ERDF).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01356>

## REFERENCES

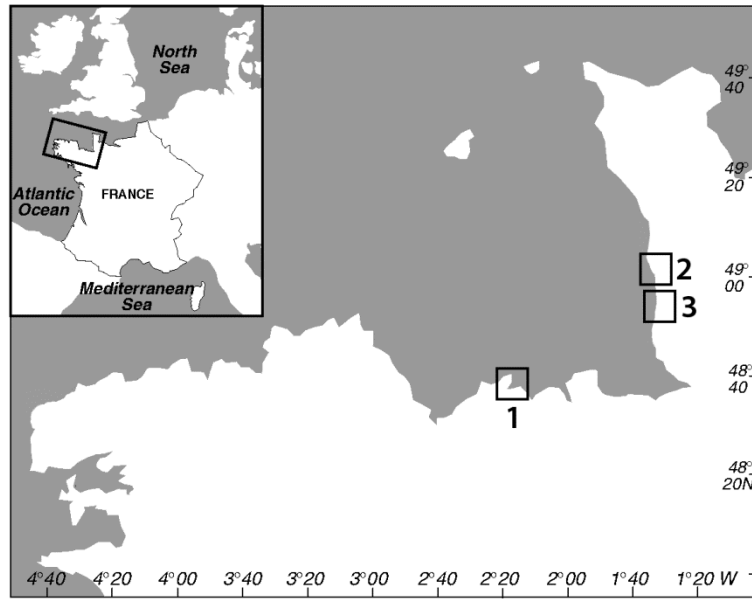
- Anonymous (2004). Regulation (EC) No 854/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official J. Euro. Union* L139, 83–127.
- Arnqvist, A., Olsen, A., Pfeifer, J., Russell, D. G., and Normark, S. (1992). The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol. Microbiol.* 6, 2443–2452. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01420.x
- Bai, X., Wang, H., Xin, Y., Wei, R., Tang, X., Zhao, A., et al. (2015). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. *Int. J. Food Microbiol.* 200, 31–38. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.018
- Balière, C., Rincé, A., Thevenot, D., and Gourmelon, M. (2015). Successful detection of pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish, environmental waters and sediment using the ISO/TS-13136 method. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 315–320. doi: 10.1111/lam.12386
- Bennani, M., Badri, S., Baibai, T., Oubrim, N., Hassar, M., Cohen, N., et al. (2011). First detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and coastal environments of Morocco. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165, 290–299. doi: 10.1007/s12010-011-9251-x
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., and Petit, F. (2013). Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4684–4693. doi: 10.1128/AEM.00698-13
- Beutin, L., and Fach, P. (2014). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. *Microbiol. Spectr.* 2, EHEC-0001–2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0001-2013
- Bibbal, D., Loukiadis, E., Kerouredan, M., Ferre, F., Dilasser, F., de Garam, C. P., et al. (2015). Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1397–1405. doi: 10.1128/aem.03315-14
- Bidet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Brahimi, N., Courroux, C., Grimont, P., et al. (2005). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *J. Med. Microbiol.* 54, 71–75. doi: 10.1099/jmm.0.45841-0
- Bielaszewska, M., Prager, R., Köck, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschäpe, H., et al. (2007). Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3144–3150. doi: 10.1128/AEM.02937-06
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., et al. (2003). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1351–1356. doi: 10.1128/JCM.41.4.1351-1356.2003
- Chandran, A., and Mazumder, A. (2013). Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various animal hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7371–7380. doi: 10.1128/AEM.02653-13
- Chandran, A., and Mazumder, A. (2015). Pathogenic potential, genetic diversity, and population structure of *Escherichia coli* strains isolated from a forest-dominated watershed (Comox Lake) in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1779–1789. doi: 10.1128/aem.03738-14
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558. doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000
- Cooley, M. B., Quiñones, B., Oryang, D., Mandrell, R. E., and Gorski, L. (2014). Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*,

- and *Listeria monocytogenes* at public access watershed sites in a California Central Coast agricultural region. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:30. doi: 10.3389/fcimb.2014.00030
- Costa, R. A. (2013). *Escherichia coli* in seafood: a brief overview. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 4, 450–454. doi: 10.4236/abb.2013.43A060
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., and Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822–880. doi: 10.1128/CMR.00022-13
- Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Jacobs, E., and Röske, I. (2006). Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 48–53. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01809.x
- EFSA (2013). EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA J.* 11, 3138. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3138
- Feng, P. C. H., Keys, C., Lacher, D. W., Beutin, L., Bentancor, A., Heuvelink, A., et al. (2012). Clonal relations of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H16 strains isolated from various sources from several countries. *FEMS Microbiol. Lett.* 337, 126–131. doi: 10.1111/1574-6968.12017
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Beutin, L., Gleizal, A., Trevisan, D., Quetin, P., et al. (2010). Survival and spread of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in alpine pasture grasslands. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1332–1343. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04527.x
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J., et al. (2005). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 55–65. doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.038
- Gourmelon, M., Montet, M., Lozach, S., Le Mennec, C., Pommepuy, M., Beutin, L., et al. (2006). First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J. Appl. Microbiol.* 100, 85–97. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02753.x
- Gourmelon, M., Touati, D., Pommepuy, M., and Cormier, M. (1997). Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of rpoS-dependent effects. *Can. J. Microbiol.* 43, 1036–1043. doi: 10.1139/m97-148
- Guinée, P. A. M., Jansen, H. W., Wadstrom, T., and Sellwood, R. (1981). “*Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves,” in *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: Current Topics in Veterinary and Animal Science*, Vol. 13, eds P. W. De Leew and P. A. M. Guinée (Hague: Martinus Nijhoff), 126–162.
- Hamilton, M. J., Hadi, A. Z., Griffith, J. F., Ishii, S., and Sadowsky, M. J. (2010). Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water Res.* 44, 5463–5473. doi: 10.1016/j.watres.2010.06.058
- Hornitzky, M. A., Vanselow, B. A., Walker, K., Bettelheim, K. A., Corney, B., Gill, P., et al. (2002). Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6439–6445. doi: 10.1128/AEM.68.12.6439-6445.2002
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., and Muniesa, M. (2009). Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1764–1768. doi: 10.1128/AEM.02273-08
- Itoh, Y., Rice, J. D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J., et al. (2008). Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J. Bacteriol.* 190, 3670–3680. doi: 10.1128/JB.01920-07
- Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E., and Swerdlow, D. L. (2010). Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 399–411. doi: 10.1128/CMR.00059-09
- Jang, J., Di, D. Y., Lee, A., Unno, T., Sadowsky, M. J., and Hur, H. G. (2014). Seasonal and genotypic changes in *Escherichia coli* phylogenetic groups in the Yeongsan River basin of South Korea. *PLoS ONE* 9:e100585. doi: 10.1371/journal.pone.0100585
- Jiang, C., An, T., Wang, S., Wang, G., Si, W., Tu, Y., et al. (2015). Role of the ehxA gene from *Escherichia coli* serotype O82 in hemolysis, biofilm formation, and in vivo virulence. *Can. J. Microbiol.* 61, 335–341. doi: 10.1139/cjm-2014-0824
- Levine, M. M., and Edelman, R. (1984). Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* 6, 31–51.
- Lienemann, T., Pitkanen, T., Antikainen, J., Molsa, E., Miettinen, I., Haukka, K., et al. (2011). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O100:H-: stx(2e) in Drinking Water Contaminated by Waste Water in Finland. *Curr. Microbiol.* 62, 1239–1244. doi: 10.1007/s00284-010-9832-x
- Ma, J., Ibekwe, A. M., Crowley, D. E., and Yang, C.-H. (2014). Persistence of *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains in agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 490, 822–829. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.069
- Manna, S. K., Das, R., and Manna, C. (2008). Microbiological quality of finfish and shellfish with special reference to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *J. Food. Sci.* 73, M283–M286. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00815.x
- Martinez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E., and Muniesa, M. (2013). Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4862–4868. doi: 10.1128/AEM.01158-13
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1664–1668. doi: 10.1073/pnas.92.5.1664
- Mellmann, A., Fruth, A., Friedrich, A. W., Wieler, L. H., Harmsen, D., Werber, D., et al. (2009). Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1474–1477. doi: 10.3201/eid1509.090161
- Miyagi, K., Omura, K., Ogawa, A., Hanafusa, M., Nakano, Y., Morimatsu, S., et al. (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. *Epidemiol. Infect.* 126, 129–133.
- Moldoveanu, A. M. (2012). Environmental factors influences on bacterial biofilms formation. *Ann. RSCB XVII*, 118–126.
- Mora, A., López, C., Dhahi, G., López-Beceiro, A. M., Fidalgo, L. E., Díaz, E. A., et al. (2012). Seropathotypes, phylogroups, *Stx* subtypes, and intimin types of wildlife-carried, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2578–2585. doi: 10.1128/AEM.07520-11
- Muniesa, M., Jofre, J., García-Aljaro, C., and Blanch, A. R. (2006). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7141–7149. doi: 10.1021/es060927k
- Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nielsen, E. M., and Andersen, M. T. (2003). Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2884–2893. doi: 10.1128/JCM.41.7.2884-2893.2003
- O'Brien, A. D., Newland, J. W., Miller, S. F., Holmes, R. K., Smith, H. W., and Formal, S. B. (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226, 694–696. doi: 10.1126/science.6387911
- Olsen, A., Jonsson, A., and Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652–655. doi: 10.1038/338652a0
- Paton, A. W., and Paton, J. C. (2002). Direct detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by Multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *J. Clin. Microbiol.* 40, 271–274. doi: 10.1128/JCM.40.1.271-274.2002
- Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C., and Paton, J. C. (2001). Characterization of saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 69, 6999–7009. doi: 10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001
- Paton, J. C., and Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450–479.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., and Fach, P. (2007). Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 284–288. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.014
- Potasman, I., Paz, A., and Odeh, M. (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* 35, 921–928. doi: 10.1086/342330
- Pradel, N., Livrelli, V., Champs, C. D., Palcoux, J.-B., Reynaud, A., Scheutz, F., et al. (2000). Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1023–1031.

- Rozen, Y., and Belkin, S. (2001). Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 513–529. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00589.x
- Russo, T. A., and Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753–1754. doi: 10.1086/315418
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., et al. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2951–2963. doi: 10.1128/JCM.00860-12
- Singh, P., Sha, Q., Lacher, D. W., Del Valle, J., Mosci, R. E., Moore, J. A., et al. (2015). Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:29. doi: 10.3389/fcimb.2015.00029
- Solheim, H. T., Sekse, C., Urdahl, A. M., Wasteson, Y., and Nesse, L. L. (2013). Biofilm as an environment for dissemination of stx genes by transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 896–900. doi: 10.1128/AEM.03512-12
- Toth, I., Schmidt, H., Dow, M., Malik, A., Oswald, E., and Nagy, B. (2003). Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7242–7247. doi: 10.1128/AEM.69.12.7242-7247.2003
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., et al. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5:e1000344. doi: 10.1371/journal.pgen.1000344
- Tremblay, Y. D., Vogeleer, P., Jacques, M., and Harel, J. (2015). High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2827–2840. doi: 10.1128/AEM.04208-14
- Usda Food Safety and Inspection Service (2011). *Risk Profile for Pathogenic Non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (non-O157STEC)*. USDA Food Safety and Inspection Service, Washington, DC. Available at: [http://www.fsis.usda.gov/pdf/non\\_o157\\_stec\\_risk\\_profile.pdf](http://www.fsis.usda.gov/pdf/non_o157_stec_risk_profile.pdf)
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., and Harel, J. (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 5:317. doi: 10.3389/fmicb.2014.00317
- Walters, S. P., González-Escalona, N., Son, I., Melka, D. C., Sassoubre, L. M., and Boehm, A. B. (2013). *Salmonella enterica* diversity in central Californian coastal waterways. *Appl. Environ. Microbiol.* 19, 4199–4209. doi: 10.1128/AEM.00930-13
- White-Ziegler, C. A., Um, S., Perez, N. M., Berns, A. L., Malhowski, A. J., and Young, S. (2008). Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 154, 148–166. doi: 10.1099/mic.0.2007/012021-0
- WHO (1987). *Program for Control of Diarrhoeal Diseases. Manual for Laboratory Investigation of Acute Enteric Infections*. Geneva: World Health Organization.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Zweifel, C., Cernela, N., and Stephan, R. (2013). Detection of the emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11/H- sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5411–5413. doi: 10.1128/AEM.01728-13

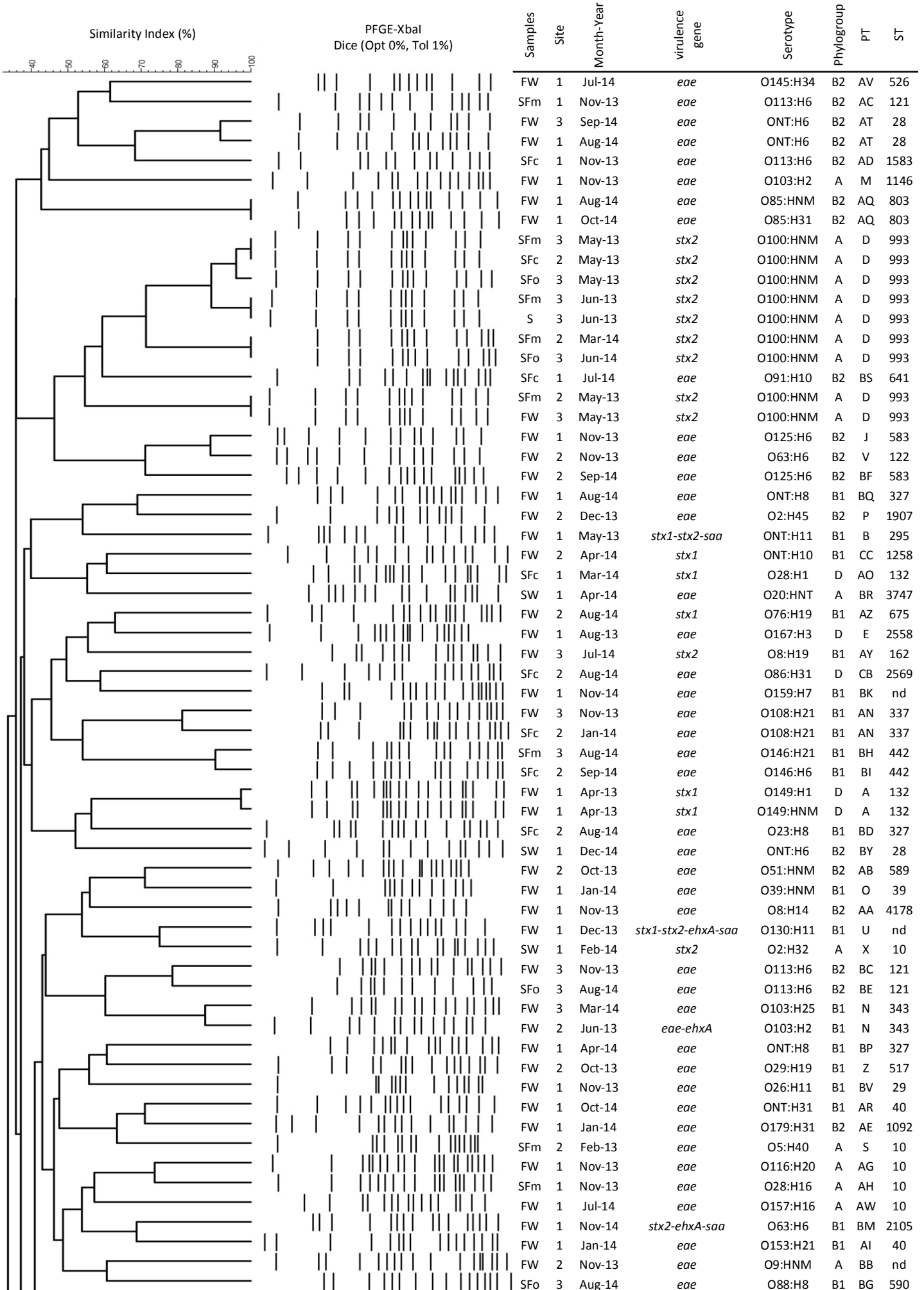
**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

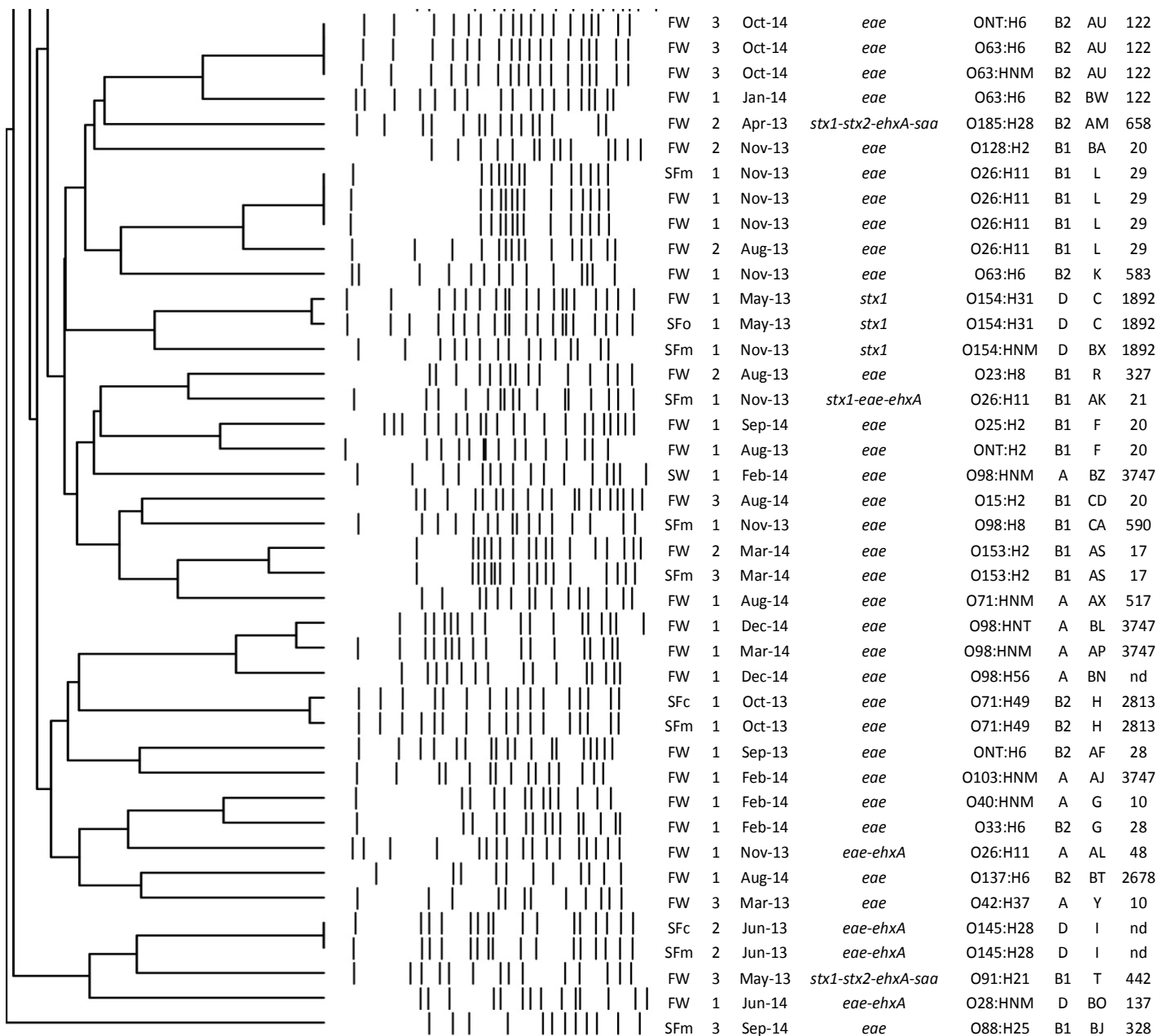
Copyright © 2015 Balière, Rincé, Blanco, Dahbi, Harel, Vogeleer, Giard, Mariani-Kurkdjian and Gourmelon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**Figure 1S:** Map of the three studied shellfish-harvesting sites on the French coast of within the Eastern English Channel. Localization of the Brittany site (site 1) and the two Normandy sites (site 2 and site 3).







**Figure 2S:** Dendograms of *Xba*I PFGE patterns (PT), characteristics and Sequence Type (ST) of STEC and EPEC strains isolated from freshwater (FW), shellfish (SF) [oyster (o), mussel (m) or cockle (c)] and superficial sediment (S), from the Brittany site (1) and the two Normandy sites (2 and 3). The similarity of PFGE profiles was compared and dendrogram was created with the Bionumerics software 7.5 (Applied Maths, Belgium), using the band-based Dice unweighted-pair group method, using average linkages (UPGMA), based on 1% position tolerance. NT: non-typable, NM: non-motile, nd : not determined.

## ***Chapitre 4 : PROFIL DE VIRULENCE DES E. COLI PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES ET DES E. COLI ENTEROPATHOGENES ISOLES EN ZONES CONCHYLICOLES FRANCAISES***

### **A. Contexte de la troisième partie de l'étude**

Le chapitre précédent a montré que des souches STEC et EPEC étaient présentes dans l'environnement littoral et qu'elles possédaient des gènes de virulence codant pour les Shiga-toxines, pour l'entérimine, l'entérohémolysine A et l'alpha-hémolysine. Toutefois, dans des études récentes, d'autres facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion, la production d'autres toxines et dans la virulence ont été mis en évidence dans des souches de *E.coli* pathogènes (Coombes *et al.*, 2008, Bugarel *et al.*, 2010, Delannoy *et al.*, 2013, Chui *et al.*, 2015). Aussi, pour avoir une meilleure évaluation de la virulence de ces souches environnementales, il nous est apparu important d'approfondir la recherche des gènes de virulence présents dans ces souches.

Au regard des progrès actuels, nous avons voulu poursuivre la caractérisation des souches STEC et EPEC isolées à partir des échantillons environnementaux présentés dans le chapitre N°3 (Publication N°2) en axant ce 4<sup>ème</sup> chapitre sur le potentiel de virulence des souches issues du littoral et des eaux en amont par une approche moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné dans la littérature des gènes codant pour des facteurs de virulence et des facteurs impliqués dans la formation de biofilms présents chez des souches de *E. coli* STEC et EPEC.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de sécurité alimentaire de l'ANSES, Plateforme IdentityPath, de l'Université Paris-Est, Maisons-Alfort, où ont été réalisées ensuite les PCR haut débit sur les souches environnementales.

Le choix des gènes codant des facteurs impliqués dans la formation de biofilms a été réalisé en collaboration avec le Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre de Recherche d'Infectiologie Porcine et Avicole, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

Soixante-quinze gènes cibles ont été sélectionnés en association avec leur rôle dans la virulence chez *E. coli*, leur implication dans des pathologies graves chez l'Homme et les animaux et leur capacité à être des marqueurs de différenciation des souches EHEC, des STEC et des EPEC. Dix gènes en association avec la capacité à former des biofilms ont également été sélectionnés. Ces gènes ont été recherchés par PCR haut débit au moyen de la technologie Fluidigm Puce 96.96 marqueur EvaGreen.

De plus, les variants des gènes *stx* et *eae* ont été caractérisés au laboratoire Ifremer de Plouzané et à l'Université de Caen par PCR et par séquençage pour les variants non identifiés par les systèmes PCR.

Le manuscrit présenté ci-après expose les résultats obtenus à partir d'une sélection de 28 souches STEC et de 75 souches EPEC jugées différentes après l'acquisition de l'ensemble des paramètres de caractérisation présentés dans le chapitre N°3 (Publication N°2) et d'une étude précédente concernant la détection et l'isolement de STEC dans d'autres coquillages du littoral français (n=4) (Gourmelon *et al.*, 2006).

Ce travail a permis de mettre en évidence par exemple :

Pour les STEC :

- La présence de 17 profils de virulence différents, avec de 2 à 47 gènes détectés par souche en plus des gènes *eae* et/ou *stx1* et/ou *stx2*
- La souche EHEC O26 :H11 *stx1*<sup>+</sup> *eae*<sup>+</sup>, isolée dans un lot de moules par la méthode ISO-TS-13136 (Publication N°1), dispose de 45 gènes de virulence supplémentaires
- La souche STEC de sérotype O100 :HNM *stx2*<sup>+</sup>, la plus fréquemment isolée dans les échantillons environnementaux, ne possède que 2 gènes de virulence supplémentaires
- Peu de gènes associés aux OI-122, OI-43-48, OI-57 et OI-71 sont détectés dans les souches STEC, hormis le O26 :H11 *stx1*<sup>+</sup> *eae*<sup>+</sup>, soit entre 1 et 2 gènes sur les 20 gènes recherchés
- La détection de plusieurs gènes codant des protéines d'adhésion pour les souches STEC LEE-négatives

Pour les EPEC :

- La présence de 56 profils de virulence différents, avec de 11 à 50 gènes détectés par souche en plus du gène *eae*
- Les souches appartenant aux sérotypes O26 :H11, O157 :H7, O103 :H2, O145 :H28 et O103 :H25 possèdent entre 33 et 49 gènes de virulence supplémentaires
- Entre 1 et 19 gènes de virulence associés aux OI-122, OI-43-48, OI-57 et OI-71 (sur un total de 20 gènes) sont détectés chez 67 souches EPEC (dont les sérotypes O26 :H11, O157 :H7, O103 :H2, O145 :H28 et O103 :H25 avec entre 13 et 19 gènes)

En conclusion, cette étude est, à notre connaissance, la première qui évalue la virulence de souches STEC et EPEC isolées d'échantillons de l'environnement littoral par une approche moléculaire par PCR haut débit. Au regard des 75 gènes de virulence sélectionnés dans cette étude et de la caractérisation des variants des gènes *stx* et *eae*, plusieurs souches EPEC et quelques souches STEC ont montré des combinaisons de gènes caractéristiques de souches associées à des pathologies humaines et animales. A ce jour, à notre connaissance, aucune toxi-infection alimentaire liée à la consommation de coquillages contaminés par des STEC ou des EPEC n'a été recensée dans le monde.

La réglementation sanitaire appliquée aux zones de production conchylicole (purification des coquillages en catégorie B avant commercialisation, par exemple) est sûrement un acteur important pour expliquer cette dernière observation. L'acquisition de ces données sur la virulence des souches STEC et EPEC circulant en zone littorale permet d'enrichir les connaissances sur la prévalence de ce type de *E. coli* pathogènes dans cet environnement.



**B. Publication N°3**

**Molecular profiling of STEC and EPEC strains isolated from French coastal environments**

**Balière C.<sup>1</sup>, Rincé A.<sup>2</sup>, Delannoy S<sup>3</sup>., Fach P<sup>3</sup>., Gourmelon M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, Unité Santé, Génétique et Microbiologie des mollusques, Département Ressources Biologiques et Environnement, IFREMER, Plouzané, France

<sup>2</sup> U2RM EA4655 Stress/Virulence, Normandie-Université; UCBN, Caen, France

<sup>3</sup> Université Paris-Est, ANSES Food Safety Laboratory, Platform IdentityPath, Maisons-Alfor

*Soumise le 27 janvier 2016 dans le journal Applied and Environmental Microbiology*





# **Molecular profiling of STEC and EPEC strains isolated from French coastal environments**

**Balière C.<sup>1</sup>, Rincé A.<sup>2</sup>, Delannoy S.<sup>3</sup>, Fach P.<sup>3</sup>, Gourmelon M.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, Unité Santé, Génétique et Microbiologie des mollusques, Département Ressources Biologiques et Environnement, IFREMER, Plouzané, France

<sup>2</sup> U2RM EA4655 Stress/Virulence, Normandie-Université; UCBN, Caen, France

<sup>3</sup> Université Paris-Est, ANSES Food Safety Laboratory, Platform IdentityPath, Maisons-Alfort

**Running title:** Molecular profiling of environmental *E. coli*

**Keywords:** *E. coli*, STEC; EPEC, environment, virulence genes, high-throughput real-time PCR method

\*Corresponding author:

Michèle Gourmelon

Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie LSEM, Ifremer, CS10070 Plouzané,  
France

E-mail : Michèle.Gourmelon@ifremer.fr

## ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains may be responsible for foodborne infections in humans. Twenty-eight STEC and 75 EPEC previously isolated from French shellfish-harvesting areas and their watersheds and belonging to 68 distinguishable serotypes were characterized in this study. High-throughput real-time PCR was used to search for the presence of 75 *E. coli* virulence-associated gene targets and genes encoding Shiga-toxin (*stx*) and intimin (*eae*) were subtyped using PCR tests and DNA sequencing, respectively. Results showed a high diversity between strains with 17 unique virulence gene profiles for STEC and 56 for EPEC. Six STEC and 15 EPEC strains were found to display a large number or a particular combination of virulence genetic markers and the presence of *stx* and/or *eae* variants suggesting their potential pathogenicity for humans. From them, a O26:H11 *stx1a eae 1* strain was associated with a large number of virulence-associated genes (*i.e.* 47) including genes carried on the locus of enterocyte effacement (LEE) or other pathogenicity islands such as OI-122, OI-71, OI-43/48, OI-50, OI-57, and HPI. One O91:H21 STEC containing 4 *stx* variants (*stx1a*, 2a, 2c, and 2d) was found to possess genes associated with pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-15. From EPEC strains harboring a large number of virulence genes (between 34 and 50), eight belonged to the serotypes O26:H11, O103:H2, O103:H25, O145:H28, O157:H7, and O153:H2. This study clearly highlights that if the majority of strains isolated from coastal environment are potentially weakly pathogenic, then some of these are likely to be more pathogenic.

## INTRODUCTION

*Escherichia coli* is a commensal aerobic bacterium of the warm-blooded animal intestinal microbiota and is used as a fecal indicator in the environment to classify shellfish-harvesting and bathing areas (1). However, *E. coli* can become pathogenic through the acquisition of mobile genetic elements such as bacteriophages, pathogenicity islands, and plasmids. Among pathogenic *E. coli*, are the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC).

STEC can cause infections ranging from uncomplicated diarrheas to hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS). Several STEC serotypes have been involved in numerous food-borne outbreaks worldwide (2, 3), and these strains have been identified as enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Although *E. coli* O157:H7 has been the main serotype implicated in HC and HUS since the early 1980s, recent studies have shown that non-O157 serotypes are also responsible for numerous human STEC infections. The most commonly implicated serogroups associated with human STEC infections in the US are O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 (4) whereas in Europe five major EHEC serogroups (Top 5; O157, O26, O103, O111, O145) dominate (5).

The primary virulence factor of STEC is the Shiga-toxin, encoded by a lambdoid bacteriophage, which inhibits host cell protein synthesis (6). Within the two major types of Shiga-toxin, namely Stx1 and Stx2, three subtypes of *stx1* gene (*stx1a*, *stx1c*, and *stx1d*) and seven subtypes of *stx2* gene (*stx2a*, *2b*, *2c*, *2d*, *2e*, *2f*, and *2g*) have been identified (7). Specific *stx* subtypes are involved in human infections (*e.g.* *stx2a* and *stx2c* are more often isolated from patients with HUS) (8) whereas others are related to non-human animal infections (*e.g.* *stx2e* causing edema disease in pigs; 9). Certain *stx*-subtypes present within the strain may indicate its source: *stx2c* is more prevalent in cattle (10) whereas *stx2f* is mainly associated with pigeon sources (11).

The STEC strains implicated in the major cases of human infection (also referred to as atypical EHEC) possess the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island, which is involved in attaching and effacing lesions on intestinal epithelial cells (12). Eighteen types and nine subtypes of the *eae* gene, namely  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\xi$ ,  $\omicron$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ , and  $\sigma$

have been deposited in the Genbank database (13). The *eae* subtypes are responsible for some host tissue cell tropisms (14) and are related to human infections; *eae* subtypes , , and are those most frequently associated with human infections (15, 16).

However, the emergence of human infections linked to LEE-negative STEC indicates that this pathogenicity island is not the only factor responsible for the adherence of bacteria and suggests the presence of other virulence factors carried by other pathogenicity islands or plasmids (17). Additional proteins associated with attachment were proposed as adhesive factors. For example, Paa is involved in intimate attachment of the bacteria to enterocytes and induced typical A/E (Attaching and Effacing) lesions in the pig ileal (18). EhaA, an enterohemorrhagic *E. coli* autotransporter, is involved in attachment to biotic and abiotic surfaces (19). Saa encodes an autoagglutinating adhesion unique to LEE-negative STEC (20). Lpf, long polar fimbriae facilitates attachment of the bacteria to murine Peyer's patches (21).

In addition to genes located on the LEE, a large number of non-LEE effector genes located on other pathogenicity islands were identified in strains responsible for human infections (*i.e. nleA, nleB, nleC, nleD, nleE, nleG, etc.*). These genes are involved in various functions, such as inhibiting phagocytosis, disruption of host innate immune responses, blockage of cell division, etc. (22).

Besides Shiga-toxins, other hemolysins or toxins have been identified in the pathogenesis of STEC strains. These include, for example, the enterohemolysin, encoded by the *ehxA* gene, linked to cytotoxic effects on endothelial cells (23), the enteroaggregative *E. coli* (EAEC) heat-stable enterotoxin encoded by the *astA* gene (24) or the alpha hemolysin encoded by the *hlyA* gene (25).

Among the virulence factors, the presence of various combinations of type III effector genes, toxin-producing genes or adhesin-producing genes present in pathogenicity islands (OI-122, OI-43/48, OI-57, OI-71, and HPI), plasmids or chromosome were used to discriminate EHEC from STEC strains and to perform a molecular risk assessment based on the presence of several virulence genes in STEC strains (26-30).

Among pathogenic *E. coli*, there are also EPECs. These are involved in the majority of infantile watery diarrheas in low-income countries but rarely in adult diarrhea (31). EPEC strains are characterized by the presence of the LEE, containing the *eae* gene, as described above. They are classified into typical EPEC and atypical EPEC, based on the presence of the EPEC adherence factor (EAF) plasmid. The plasmid harbors the *bfp* operon encoding the Bundle-Forming Pilus, involved in the initial adherence of strains to intestinal epithelial cells (31). Twelve serogroups have been recognized as EPEC by the World Health Organization: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, and O158 (32).

EPEC could possess the majority of the virulence genes described above other than *stx* genes. Furthermore, EPEC strains could be lysogenized by *stx*-converting bacteriophages and consequently could become EHEC. Conversely, STEC strains possessing the *eae* gene could lose the *stx*-converting bacteriophage and become EPEC or EHEC-like strains (33).

The main reservoir of STEC is cattle (10). However, other animals, such as sheep, goats, swine, birds, wild animals, and humans, can also harbor STEC strains in their digestive tract (34-36). For typical EPEC, the only reservoir is humans whereas for atypical EPEC, both humans and other animals can be reservoirs (36). Contamination of the environment by STEC and EPEC may occur through the spreading of livestock manure, animal wastes on pastures, *via* wastewaters from slaughterhouses or from treatment plant effluents, and by wildlife (37, 38). Only a few studies have focused on the prevalence and description of STEC and EPEC strains in the environment and particularly on the virulence gene profiles of such strains (39-42). Thus, the authors were prompted to characterize STEC and EPEC strains isolated from French shellfish-harvesting areas.

In the present study, high-throughput microfluidic real-time PCR methods, which had been previously developed and used to investigate the pathogenic potential of *E. coli* strains isolated mainly from animals feces (9), from carcasses of cattle (43), and from food and animals (44, 45), were used. During a two-year study, STEC and EPEC strains were isolated from three French shellfish-harvesting areas

(from shellfish, sediment, and seawater samples) and their watersheds (from river water samples), (46). In addition to the *stx* and *eae* genes already investigated, 75 *E. coli* virulence-associated gene targets were examined in these strains using high throughput microfluidic PCR.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and DNA extraction.** Most of the strains used in this study were isolated between February 2013 and January 2015 from three French shellfish-harvesting areas and their watersheds located on the English Channel coast (46), except three strains, which were isolated from other French shellfish-harvesting areas during 2006 (47). A total of 28 STEC and 75 EPEC strains belonging to 68 distinguishable serotypes isolated from three types of shellfish (oysters, mussels, and cockles), from freshwater, seawater and surface sediment samples were investigated. The determination of their serotype, phylogroups and MLST sequence type has been previously described (46, 47). After cultivation of bacteria on Trypton-Bile-X-glucuronide agar (TBX) (AES chemunex, Bruz, France) at 37°C for 24 hours, DNA was extracted with the InstaGene<sup>®</sup> Matrix kit (Bio-Rad, Nanterre, France) according to the manufacturer's instructions.

**Characterization of the *stx* subtypes.** STEC strains (n=28) were previously identified by Baliere *et al.* (46) by PCR using the *stx* primers and probes described by Perelle *et al.* (48) and the *stx*-subtyping was performed here using the PCR tests described by Scheutz *et al.* (7) for targeting the *stx1a*, *stx1c* and *stx1d* subtypes and *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* and *stx2g* subtypes.

**Characterization of the *eae* subtypes.** *E. coli* *eae*-positive strains (n=76) were previously identified by Baliere *et al.* (46) with the *eae* primers and probe described by Nielsen and Andersen (49). The *eae*-subtypes were determined here by sequencing 311 to 722bp amplicons of the 3' variable region of the *eae* gene. Amplicons were obtained with the universal EAE-F and EAE-RB primers, which target the 3' variable region of the *eae*- 1, - 2, - 1, - 2, - 2, - , - , - , - and - subtypes or with primers targeting the 3' variable region of the *eae*- , - , - , - and - subtypes (Table 1). The amplicons obtained following the PCR program described by Blanco *et al.* (50) were then subjected to gel

electrophoresis before being sequenced in both directions with the corresponding primers and using the fluorescent dye terminator Sanger method ABI3730 (Applied Biosystem) by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). DNA sequences were edited using the BioEdit program (52) and were compared with the GenBank database. The first valid published sequence with 100% similarity was chosen to identify the *eae*-variant.

Nine *E. coli* strains, which were PCR-negative for these primer combinations, were chosen for sequencing the entire *eae* gene. Two overlapping DNA fragments of the *eae* gene were PCR amplified using primers *eae*-F1 and *escD*-R1 on the one hand and *cesT*-F3 and *eae*-R3 on the other hand (Table 1). The PCR program included a 10 min initial denaturing step at 94°C, followed by 35 cycles of amplification (94°C for 20 s, 56°C for 20 s, and 72°C for 90 s) and a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR amplicons were then subjected to gel electrophoresis and purified using the Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) before being sequenced as described above.

**High-throughput real-time PCR system.** The BioMark real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, CA) was used for high-throughput microfluidic real-time PCR amplification using the 96.96 dynamic arrays (Fluidigm). Amplifications were performed in accordance with the recommendations of the manufacturer, using the EvaGreen DNA binding dye (Biotium Inc., Hayward, CA) followed by a melting curve analysis. The BioMark real-time PCR system was used with the following thermal profile: 95°C for 10 min (enzyme activation) followed by 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min (annealing of primers and amplification step).

Seventy-five *E. coli* virulence-associated gene targets were selected according to their role in pathogenesis, their ability to be associated with human and non-human animal illness and because they had previously been shown to be useful for the characterization of STEC and EPEC strains, isolated mainly from finishing swine (9), human patients and animals feces, food and animals (44, 45), carcasses of cattle originating from different farms and food (43) and adult and children's feces (27, 29, 30, 53).

Virulence gene targets were classified in five groups according to their function; adhesion group [*eibG*, *iha*, *saa*, *toxB*, *orfA*, *orfB*, *paa*, *stcE*, *sab*, *efa1/LifA*, *bfpA*, *espP*, *F6/F987P (fasA)*, *F18/F107 (fedA)*, *F41 (fim41a)*, *lpfAO157*, *lpfAO26*, *lpfAO113*, *ehaA*, *epeA*; n=20], the type III secretion system group (*espB*, *espD*, *espA*, *tir*, *espZ*, *escC*, *espG*, *escD*, *escN*, *escV*, *escJ*, *nleB*, *nleE*, *nleF*, *nleG*, *nleH1-2*, *nleA*, *espM1*, *nleC*, *nleD*, *nleH1-1*, *nleG2*, *nleG5-1*, *nleG5-2*, *nleG6-2*, *espV*, *espK*, *espN*, *espJ*, *espM2*; n= 30), toxin group (*subA*, *ent*, *ehxA*, *cdt-I*, *cdt-III*, *cdt-V*, *STa*, *LT*, *hlyA*, *cnf1*, *cnf2*, *astA*; n=12) and other function group (*katP*, *ecf1*, *pagC*, *terE*, *ureD*, *aggR*, *pic*, *irp2*, *fyuA*, *Z2098*, *ecs1763*, *ecs1822*, *etpD*; n=13). The *wecA* gene was used as an *E. coli* reference genetic marker.

## RESULTS

**STEC and EHEC virulence gene profiles.** A collection of *E. coli* strains, comprising 27 STEC (*stx*-positive, *eae*-negative) and one EHEC (*stx*-positive, *eae*-positive) collected from French coastal areas, was investigated. Eleven STEC strains were positive for the *stx1* gene only, 13 were positive for the *stx2* gene only, while four strains harbored a combination of the *stx1* and *stx2* gene. The most commonly identified *stx1* subtype was *stx1d* (23% of detected *stx* genes), followed by *stx1a* (17%) (Figure 1, Table 2). The most common *stx2* subtype was *stx2a* (17%) (Figure 1). Five strains were identified with several *stx* subtypes; three possessed *stx1a* and *stx2a* and belonged to the serotypes O185:H28, ONT:H11 and O130:H11; one possessed *stx2a* and *stx2d* and one possessed *stx1a*, *stx2a*, *stx2c* and *stx2d* corresponding to the serotypes O8:H19 and O91:H21, respectively (Table 2). Three strains harbored either the *stx1c*, *stx2e* or the *stx2g* variant.

Among the STEC strains investigated, 17 unique virulence gene profiles were identified, based on virulence gene detection (Table 2). The EHEC O26:H11 strain harbored the profile with the highest number of *E. coli* virulence-associated gene targets, with 47 genes detected (profile N°1). In addition to the genes carried on the LEE and linked to the type III secretion system and to the *eae* gene (and precisely the *eae* 1 subtype; Table 2), this strain harbors the genes associated with pathogenicity islands such as OI-122 (*nleB*, *nleE*, and *ent*), OI-71 (*espM1*), OI-43/48 (*ureD* and *terE*), OI-50 (*espK*



and *espN*), OI-57 (Z2098) and HPI (*irp2* and *fuyA*). One strain of serotype O91:H21 (profile N°2) was isolated and found to possess genes associated with some pathogenicity islands, such as OI-122 (*pagC*), OI-43/48 (*iha*), OI-15 (*ehaA*) and with plasmids (pO113: *sab* and *epeA* and pO157: *espP* and *ehxA*). For the other STEC strains, between two and 12 genes were detected, corresponding to 15 additional virulence gene profiles. These strains did not possess genes from the LEE, nor genes associated with the pathogenicity islands OI-122, OI-71, OI-50, and HPI. The serotype O100:HNM, which was the most commonly represented serotype in isolated STECs (n=9), was only associated with two additional virulence genes.

In those STEC strains without the LEE pathogenicity island, other genes involved in adhesion were detected. Of these, the *paa* gene, which encodes the porcine A/E associated gene, was the most frequently detected (57% of STEC strains) (Figure 2). This was followed by the *ehaA* gene, which was detected in 54% of strains. The other genes involved in adhesion detected were mainly those encoding long polar fimbriae (*lpfAO113* (39%) and *lpfAO26* (18%)), genes encoding extracellular serine protease (*espP*) (32%), IrgA homologue adhesion *iha* (21%), autoagglutinating adhesion (*saa*) (18%), and autotransporter (*sab*) (18%).

In addition to the *stx* genes, genes that could lead to the production of other toxins or hemolysins were present in 11 different STEC strains (corresponding to 11 different virulence profiles). The most frequent toxin-associated gene detected was *ehxA* (25% of strains) (Figure 2). The *subA*, *cdt-V* and *astA* genes encoding the subtilase cytotoxin, a cytolethal distending toxin, and an EAEC heat-stable enterotoxin, respectively were each detected in 11% of the strains. The *STa* gene, encoding a heat-stable toxin and the *hlyA* gene, which encodes the alpha hemolysin, were both detected in 7% of strains.

**EPEC virulence gene profiles.** Seventy-five EPEC (*i.e.* *eae*-positive and *stx*-negative strains) from the French coastal areas were also investigated. The isolated EPEC strains were mainly atypical EPEC strains (93%) as the typical EPEC marker *bfpA* was detected only in 7% of EPEC strains (Table 2).

The most commonly identified *eae* subtype was *eae* (26% of strains), followed by *eae* 1 (17%), *eae* 2 (16%) and *eae* 2 (11%) (Figure 1). All four O26:H11 EPEC isolated from shellfish and freshwater harbored the *eae* 1 (Table 2). All the strains of serotypes O63:H6/HNM (n=5) and O125:H6 (n=2) harbored *eae* 2, even though they belonged to four different profiles (N° 30, 32, 37 and 43). The same observation was made for the strains from serotypes O33:H6 (n=2), and O113:H6 (n=4), which belonged to six different profiles but which all harbored the *eae* 2 subtype and with strains from serotypes O23:H8 (n=2) and ONT:H8 (n=2), which belonged to four different profiles but which all harbored the *eae* subtype. The 21 other strains harbored one of the following *eae* subtypes: , 1, / , , or (Table 2).

Among the 75 EPEC strains, 56 unique virulence gene profiles were identified, based on the virulence genes detected, suggesting a high diversity of virulence genes in the EPEC isolated from the environment (Table 2). The number of virulence genes detected fluctuated between 11 and 50. Most of the profiles were represented by one serotype, except for seven EPEC profiles (n° 3, 13, 37, 42, 45, 52 and 53), which were represented by two to four different serotypes. The EPEC profile number 37, corresponding to the serotypes O63:H6/HNM and ONT:H6 with 17 virulence genes, was the most represented in EPEC (n=5). The profiles with the highest numbers of *E. coli* virulence-associated genes were represented by 10 strains for which the serotypes belonged to the Top 5 EHEC serotypes (*i.e.*, O26:H11, O103:H2, O103:H25, O145:H28, and O157:H7) and to the serotype O153:H2, harboring between 34 and 50 virulence genes. These strains possess genes carried by some pathogenicity islands such as OI-122, OI-71, OI-43/48 and at least one of the following genes: *espM1*, *espK*, *espV*, *espN*, *ureD* and *Z2098* that are highly associated with typical EHEC. These latter genes were also detected in 13 additional EPEC strains corresponding to serotypes O125:H6, O128:H2, O159:H7, O167:H3, O23:H8, O28:HNM, O29:H19, O40:HNM, O71:HNM, O86:H31, O88:H8 and O98:H8.

Among EPECs, in addition to *eae*, seven genes (*i.e.* *espB*, *espD*, *escC*, *espG*, *escD*, *escV*, and *escJ*) were detected in 100% of strains, all of which carried by the LEE. The other most frequently detected genes (*i.e.* *espM2*, *escN*, *nleC*, *nleH1-2*, *espJ*, and *nleH1-1*) were observed in more than 60% of strains

and are also genes associated with the type III secretion system (Figure 2). Among the 20 genes of the adhesion function group investigated, *paa* was the most frequently detected gene (60% of strains) followed by *ehaA*, *lpfAO113* and *lpfAO26* genes, with 39%, 33% and 29% of strains, respectively, and by the *efa1/LifA* gene encoding EHEC factor for adherence (20%) (Figure 2). A number of genes that encode toxins and hemolysins were present in EPEC strains. For example, 33% of strains carried the *astA* gene, which encodes the EAEC heat-stable toxin. The *ent* gene, which encodes a Ankyrin repeat was also detected in 33% of the EPEC strains. The *ehxA* gene, which encodes an entero-haemolysin and the *cdt-I*, which encodes a cytolethal distending toxin, were detected in 11% and 7% of strains, respectively. Finally, the *hlyA* gene, which encodes for the alpha-haemolysin was present in 5% of EPECs.

**Genes not detected in STEC and EPEC.** Nine virulence genes were never detected in STEC and EPEC strains, four of which are linked to the adhesion function [*eibG*, *F6/987P (fasA)*, *F18,F107 (fedA)*, *F41 (fimF41a)*], four to the toxin production function [*cdt-III*, *LT (elt)*, *cnf1* and *cnf2*] and one, (*aggR*), to the entero-aggregative function. No obvious difference was observed between the virulence profiles and the type of sample from which the strains were isolated (shellfish, waters or sediments).

## DISCUSSION

This study presents a molecular risk assessment of STEC and EPEC strains isolated in France from shellfish, seawater and sediment samples, collected from shellfish-harvesting areas and from freshwater samples in their upstream watersheds. These strains derived from a larger collection of *E. coli* strains (12,016 isolates) isolated during a recent study (46). The molecular risk assessment of 28 STEC and 75 EPEC strains was conducted by testing a large panel of virulence genetic markers (*i.e.* a total of 75 markers) associated with human and animal infections using a high-throughput real-time PCR approach and by identifying *stx* and *eae* subtypes.

Some STEC and EPEC strains characterized in this study were found to display a large number or a particular combination of virulence genetic markers and the presence of *stx* and/or *eae* variants, suggesting their potential pathogenicity for humans.

Among the *stx*-positive strains, only the EHEC O26:H11 *stx1a eae 1* was associated with a large number of virulence-associated gene targets (60% of genes). Furthermore, this strain, isolated from shellfish, was the only one to harbor the two EHEC gene markers *stx* and *eae*. The combined presence of *stx*, *eae* and the 45 supplementary virulence genes has been associated with enhanced virulence. Similar O26:H11 *stx1a eae 1* strains (sequence type 21; phylogroup B1) have previously been isolated from human patients with HUS or diarrhea in Europe (54, 55)

Although lacking the *eae* gene, most of the STEC strains isolated here have the genetic potential to adhere to host cells through other structures. For example, 18% of *eae*-negative STEC strains displayed the *saa* gene, encoding the STEC auto-agglutinating adhesion factor. This gene was only observed in LEE-negative STEC, in agreement with previous findings from strains of human and bovine origin (56). Other genes encoding proteins associated with attachment were detected in some strains. These include *paa*, detected here in 15 *eae*-negative STEC as well as *ehaA*, *lpfAO113*, *lpfAO26*, *espP*, *iha*, and *sab*. Many of these genes have previously been detected in *eae*-negative strains isolated from other studies and could play a role in adhesion to the host cells and consequently in the virulence potential of the isolated strains (18-21, 57).

Among the strains that were negative for the *eae* gene, STEC strain O91:H21, isolated from freshwater, could potentially be pathogenic for humans as a result of: 1) the presence of seven alternative adhesion factors (*saa*, *ehaA*, *lpfAO113*, *lpfAO26*, *espP*, *iha*, and *sab*), some of which are included in pathogenicity islands such as OI-15 or OI-43/48; 2) the presence of three *stx2* variants, including *stx2d*. This latter *stx2* variant has been found to be associated with the ability to cause severe diseases, including bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome, in atypical EHEC (58). Furthermore, this strain also possesses the *cdt-V* gene, which has been found in STEC strains involved in serious diseases (59). Finally, this strain presented the sequence type ST442, which has been found

to be the unique ST associated with hemolytic uremic syndrome among the 10 ST identified in 100 STEC O91 isolated from different patients (60).

In addition to the O91:H21 strain, four other STEC strains (*i.e.* O8:H19, O185:H28, ONT:H11 and O130:H11) were found to combine several distinct *stx1* and/or *stx2* subtypes. The presence of a combination of *stx* genes has previously been observed among strains of similar serotypes isolated from humans (17). Furthermore, in the study of Bertin *et al.* (61), strains harboring two or three *stx* subtypes were found to be more frequently highly cytotoxic toward Vero cells than the other strains. We can hypothesize that strains with a combination of *stx1* and/or *stx2* subtypes are more virulent. Furthermore, strains of serotypes O8:H19 and O130:H11 were previously isolated from human patients (62). The latter strain, like the O91:H21 strain described above, harbor the *iha*, *lpfAO113*, *ehxA*, and *cdt-V* genes, suggesting a potential virulence trait for humans. Indeed, these genetic markers have already been identified in human LEE-negative STEC strains associated with diseases (17, 63).

The subtypes *stx1a* and *stx2a* were each found in 17% of the STEC strains (essentially from freshwater samples) and have been associated with only six to eight supplementary virulence genes. These subtypes have frequently been identified in STEC strains from human, animal, environmental and food samples (64-67). STEC strains with *stx2a* have been found to be associated with several clinical symptoms, such as HUS and HC, whereas STEC with *stx1a* have been mainly associated with diarrhea without HUS (8).

On the other hand, the simultaneous detection of the subtype *stx2e*, and of the *paa*, *orfA*, *hlyA* and *ecs1763* genes in the strain of O2:H32 serotype (from seawater sample) suggests that this strain could potentially be associated with swine edema disease (9) or from a pig source (66). In the same way, strain O15:H16 (from shellfish sample) associated with the *stx2g* subtype and four supplementary virulence genes (two toxins and two adhesion factors), could potentially be linked with cattle sources as it has been previously shown for similar strains (40, 68). We can hypothesize that this strain is associated with a low human risk. Similarly, the O38:H26 STEC strain isolated from shellfish was associated with a low human risk; indeed it was associated with the *stx1c* subtype and only one other

toxin gene (*subA*) and one adhesion gene (*espP*) and may potentially derive from a sheep source as previously shown (66, 69). Finally, the *stx1d* subtype dominates in STEC strains isolated (23% of detected *stx* genes) in our study (from shellfish and freshwater samples). This subtype does not appear to be common in STEC (64-66). However, a proportion of *stx1d*-variants similar to those observed here has been observed in STEC strains from ruminant stools in India (18.7%) (70). Little is known about the clinical significance of this subtype, but it seems to be associated with a low risk (71). In agreement with this suspected low virulence, STECs with *stx1d* were found to be associated with only one to four additional virulence genes from the panel of 75 genes investigated.

Among the EPEC strains isolated in this study, some appear potentially pathogenic for humans due to the high number and the selection of virulence genes they possess. First, the *E. coli* O157:H7 isolated from shellfish possessed the highest number of virulence genes (50 genes) and especially the following genes (*ehxA*, *astA*, *lpfA*, *katP*, *etpD*, *espP*, *terE*, and *ureD*) identified by using whole genome sequencing analyses in STEC O157:H7 and the EPEC O157:H7 isolated from patients with gastrointestinal complaints in the Netherlands (72). These EPEC strains were mostly related to the STEC group and might be referred to as EHEC strains that have lost the Shiga-toxin (EHEC-LST; 72). Another category of such strains could be  $\alpha$ EHEC  $\alpha$ like $\alpha$ , as previously proposed for strains of the O26:H11 serotype (73). In addition, non-O157 serotypes, such as O145:H28, O103:H25, O103:H2, O26:H11 isolated in this study, were also found to possess a high number of genes (from 27 to 39 virulence genes) and could also be regarded as EHEC strains that have lost the Shiga-toxin. The large number of virulence genes in these strains is in agreement with the fact that members of the Top 5 serotypes are the strains most frequently associated with human diseases (5). Among the strains with the highest number of virulence genes (> 25 virulence genes), there are also strains of serotypes O153:H2 and O23:H8. STEC of the O153:H2 serotype has already been isolated from human patients (62) whereas EPEC strains of serotype O23:H8 and with similarities to those of the present study (same ST: ST327, with genes encoding the same adhesins [*lpfAO26*, *lpfAO113*, and *paa*] and genes of the OI-122) were previously associated with non-bloody diarrhea (74).

In addition to the high number of virulence genes, several strains could be potentially pathogenic as specific virulence gene associations were found. For example, the detection of the four genetic markers, *espK*, *espV*, *ureD* and Z2098, in strains belonging to the O103:H2 and O103:H25 serotypes suggests that these strains, isolated from freshwater samples, could be highly virulent for humans, as previously proposed by studies into the detection of EHEC and their *stx*-negative derivative strains (29) and on prediction of virulence of strains (28).

Furthermore, ten strains displayed more than 60% of the genetic markers related to the pathogenicity islands OI-122 (*efa1*, *pagC*, *nleB*, *nleE* and *ent*), OI-57 (*nleG2*, *nleG5-1*, *nleG5-2*, *nleG6-2*, Z2098 and *ecs1763*), OI-71 (*espM1*, *nleA*, *nleF*, *nleG*, and *nleH1-2*) and OI-43-48 (*iha*, *terE* and *ureD*) and to the High Pathogenic Island (HPI) (*irp2* and *fuyA*), used to identify strains that are able to cause severe disease outbreaks (21, 42). These strains were isolated from shellfish and freshwater samples and belonged to the serotypes O23:H8, O26:H11, O103:H25, O103:H2, O145:H28 and O157:H7. They are among the strains described above as having the largest number of virulence genes and represent a group of strains with a high virulence potential for humans. This is also corroborated by their serotype, which is associated with the classical EHEC serotype.

The presence of *nle* (non-LEE effector) genes and the number of genes carried by an *E. coli* strain is an important criterion for estimating its virulence potential (26, 75). Eight strains carried at least 10 of the 13 *nle* genes analyzed. These strains belong to the O26:H11, O23:H8, O157:H7 serotypes described above and two strains of serotypes O157:H16, O39:HNM, isolated from shellfish and freshwater samples.

The majority of the EPEC strains isolated in this study was found to possess the four main intimin subtypes, which could be highly related to pathogenic serotypes (*eae* subtypes , , , and ; 72% of the EPEC strains; 16). The *eae* 1 subtype was found in the strain from serotype O157:H7 and the two O145:H28, while *eae* 1 was found in the four strains from the O26:H11 serotype (isolated from shellfish and freshwater samples). These correlations are consistent with results previously shown for strains belonging to the Top 5 EHEC serotypes isolated from slaughtered adult cattle (10) and from

strains linked to human diseases (50). These data are also consistent with publications that showed that the *eae* and *eae* subtypes were the two most frequently detected subtypes in clinical isolates associated with human infections (14, 50, 76). Moreover, these serotypes were associated with the highest number of genes studied for virulence, with 26 to 49 supplementary virulence genes and the *E. coli* strains isolated here could be EHEC strains that have lost the *stx* gene as suggested above.

Some correlations were found between the *eae* subtype and specific virulence genes or phylogroups. Among EPECs, all strains with the *eae* 1 subtype, and only these, harbored the *espA* and *espZ* genes. Although from different serotypes, the three *eae* 1-containing phylogrouped strains were from phylogroup D and harbored the *tir* gene that was also detected in seven of the nine *eae* 2 variants. Similarly, all *eae*- 2 strains (n = 12) were from phylogroup B2 and contained the *fyuA* and *irp2* genes (HPI), while only 18% of other EPEC variant strains harbored these genes. This resulted in a greater proportion of strains carrying these *fyuA* and *irp2* genes among members from phylogroup B2. However, strains from phylogroup B1 preferentially carried the *ehaA* (89.2%), *lpfAO113* (83.8%), *lpfAO26* (70.3%), *nleE* (62.2%), *nleB* (59.5%) and *ent* (59.5%) genes compared with those of phylogroups A, B1 and D (less than 15%).

In conclusion, this is the first molecular risk assessment study on STEC and EPEC strains isolated from the coastal environment in which genetic markers associated with human or non-human animal diseases were used to evaluate the potential risk for shellfish consumers. Six STEC (corresponding to profiles number 1-4, 7 and 9) and 15 EPEC strains (corresponding to profiles number 1-9, 36), which could be EHEC-like displayed a large number or particular combination of virulence genetic markers, suggesting their association with human or non-human animal infections. This study clearly highlights the ubiquitous presence of potentially pathogenic STEC and EPEC strains in coastal environment (shellfish, waters and sediment samples) even if these strains may be less prevalent in such environment than in upstream watersheds as a result of the distance from the source and the negative impact of a saline environment. To date, no shellfish outbreak involving STEC or EPEC



strains has been described. The sanitary classification of shellfish-harvesting areas in Europe is probably an important feature that helps to prevent shellfish-foodborne outbreaks caused by these bacteria. However, the absence of a case description could also be linked to an underestimation of the potential hazard associated with potentially pathogenic STEC and EPEC. Therefore, acquisition of data on circulating strains in the environment is crucial to prevent the risk of human infection and to improve our understanding of STEC and EPEC.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the European Regional Development Fund Interreg IVA Programme, as part of the collaborative project RiskManche. The thesis of Charlotte Balière was supported by a grant from Ifremer and the Agence de l'Eau Loire-Bretagne. We thank Huw Taylor (University of Brighton, UK) for his critical review of the manuscript.

## REFERENCES

1. **Anonymous.** 2004. Regulation (EC) No 854/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption.
2. **Mathusa EC, Chen Y, Enache E, Hontz L.** 2010. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J Food Prot* **73**:1721-1736.
3. **Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, Mody RK.** 2014. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect* **142**:2270-2280.

4. **USDA Food Safety and Inspection Service.** 2011. Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157STEC). USDA Food Safety and Inspection Service, Washington, DC.
5. **EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** 2013. Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal* **11**:3138.
6. **O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB.** 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**:694-696.
7. **Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD.** 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* **50**:2951-2963.
8. **Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H.** 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**:74-84.
9. **Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Delannoy S, Fach P, Manning SD, Funk JA.** 2014. Diverse virulence gene content of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from finishing swine. *Appl Environ Microbiol* **80**:6395-6402.
10. **Bibbal D, Loukiadis E, Kerouredan M, Ferre F, Dilasser F, de Garam CP, Cartier P, Oswald E, Gay E, Auvray F, Brugere H.** 2015. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol* **81**:1397-1405.
11. **Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**:1205-1208.

12. **Paton JC, Paton AW.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**:450-479.
13. **Ito K, Iida M, Yamazaki M, Moriya K, Moroishi S, Yatsuyanagi J, Kurazono T, Hiruta N, Ratchtrachenchai OA.** 2007. Intimin types determined by heteroduplex mobility assay of intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **45**:1038-1041.
14. **Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H.** 2002. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **40**:4486-4492.
15. **Yang K, Pagaling E, Yan T.** 2014. Estimating the prevalence of potential enteropathogenic *Escherichia coli* and intimin gene diversity in a human community by monitoring sanitary sewage. *Appl Environ Microbiol* **80**:119-127.
16. **Bibbal D, Loukiadis E, Kérourédan M, Peytavin de Garam C, Ferré F, Cartier P, Gay E, Oswald E, Auvray F, Brugère H.** 2014. Intimin gene (*eae*) subtype-based real-time PCR strategy for specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in cattle feces. *Appl Environ Microbiol* **80**:1177-1184.
17. **Galli L, Miliwebsky E, Irino K, Leotta G, Rivas M.** 2010. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. *Vet Microbiol* **143**:307-313.
18. **Vidotto MC, Florian ECT, Ono MA.** 2013. Prevalence of the *paa* gene (porcine attaching and effacing associated) in porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (PEPEC) associated with postweaning diarrhea in south Brazil. *Bra J Microbiol* **44**:515-517.
19. **Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, Mahajan A, Beatson SA, Torpdahl M, Webb RI, Allsopp LP, Gobius KS, Gally DL, Schembri MA.** 2008. EhaA is a novel autotransporter protein of

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. Environ Microbiol **10**:589-604.
20. **Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun **69**:6999-7009.
  21. **Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, Hartland EL.** 2002. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun **70**:6761-6769.
  22. **Garcia-Angulo VA, Martinez-Santos VI, Villasenor T, Santana FJ, Huerta-Saquero A, Martinez LC, Jimenez R, Lara-Ochoa C, Tellez-Sosa J, Bustamante VH, Puente JL.** 2012. A distinct regulatory sequence is essential for the expression of a subset of *nle* genes in attaching and effacing *Escherichia coli*. J Bacteriol **194**:5589-5603.
  23. **Jiang C, An T, Wang S, Wang G, Si W, Tu Y, Liu Y, Wu J, Liu S, Cai X.** 2015. Role of the *ehxA* gene from *Escherichia coli* serotype O82 in hemolysis, biofilm formation, and *in vivo* virulence. Can J Microbiol **61**:335-341.
  24. **Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Kitase T, Abe N, Nakamura H, Wada T, Ishii E, Haruki K.** 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. Jpn J Infect Dis. **55**:183-190.
  25. **Lorenz SC, Son I, Maounounen-Laasri A, Lin A, Fischer M, Kase JA.** 2013. Prevalence of hemolysin genes and comparison of *ehxA* subtype patterns in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and non-STEC strains from clinical, food, and animal sources. Appl Environ Microbiol **79**:6301-6311.

26. **Coombes BK, Wickham ME, Mascarenhas M, Gruenheid S, Finlay BB, Karmali MA.** 2008. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* **74**:2153-2160.
27. **Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L.** 2011. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *Bmc Microbiol* **11**
28. **Ju W, Shen J, Toro M, Zhao S, Meng J.** 2013. Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **79**:3406-3412.
29. **Delannoy S, Beutin L, Fach P.** 2013. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *J Clin Microbiol* **51**:3257-3262.
30. **Delannoy S, Beutin L, Fach P.** 2013. Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* **51**:1083-1088.
31. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-140.
32. **WHO World Health Organization.** 1987. Program for control of diarrhoeal diseases. Manual for laboratory investigation of acute enteric infections. World Health Organization, Geneva
33. **Bielaszewska M, Prager R, Köck R, Mellmann A, Zhang W, Tschäpe H, Tarr PI, Karch H.** 2007. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* **73**:3144-3150.
34. **Mora A, López C, Dhabhi G, López-Beceiro AM, Fidalgo LE, Díaz EA, Martínez-Carrasco C, Mamani R, Herrera A, Blanco JE, Blanco M, Blanco J.** 2012. Seropathotypes, phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. Appl Environ Microbiol. **78**:2578-2585.
35. **Chandran A, Mazumder A.** 2013. Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various animal hosts. Appl Environ Microbiol **79**:7371-7380.
  36. **Singh P, Sha Q, Lacher DW, Del Valle J, Mosci RE, Moore JA, Scribner KT, Manning SD.** 2015. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. Front Cell Infect Microbiol. **5**:29.
  37. **Muniesa M, Jofre J, García-Aljaro C, Blanch AR.** 2006. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. Environ Sci Technol **40**:7141-7149.
  38. **Loukiadis E, Kérourédan M, Beutin L, Oswald E, Brugère H.** 2006. Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. Appl Environ Microbiol **72**:3245-3251.
  39. **Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Blanco J, Parro V.** 2006. STEC-EPEC oligonucléotide microarray: un nouvel outil pour le typage des variantes génétiques de l'îlot de pathogénicité LEE des producteurs de shigatoxines *Escherichia coli* humaine et animale (STEC) et *E. coli* entéropathogènes (EPEC) souches. Clin Chem **52**:192-201.
  40. **Martínez-Castillo A, Allué-Guardia A, Dahbi G, Blanco J, Creuzburg K, Schmidt H, Muniesa M.** 2012. Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. Environ Microbiol Rep **4**:147-155.
  41. **Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Manzinger D, Funk JA.** 2015. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. Epidemiol Infect **143**:505-514.

42. **Chui L, Li V, Fach P, Delannoy S, Malejczyk K, Patterson-Fortin L, Poon A, King R, Simmonds K, Scott AN, Lee MC.** 2015. Molecular Profiling of *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Strains Isolated from Humans and Cattle in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* **53**:986-990.
43. **Miko A, Rivas M, Bentancor A, Delannoy S, Fach P, Beutin L.** 2014. Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Front Cell Infect Microbiol* **4**:78
44. **Miko A, Delannoy S, Fach P, Strockbine NA, Lindstedt BA, Mariani-Kurkdjian P, Reetz J, Beutin L.** 2013. Genotypes and virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 strains from different origins and sources. *Int J Med Microbiol* **303**:410-421.
45. **Feng P.** 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh produce--a food safety dilemma. *Microbiology spectrum* **2**:EHEC-0010-2013.
46. **Balière C, Rincé A, Blanco J, Dahbi G, Harel J, Vogeleer P, Giard JC, Mariani-Kurkdjian P, Gourmelon M.** 2015. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds. *Front Microbiol* **6**:1356.
47. **Gourmelon M, Montet M, Lozach S, Le Mennec C, Pommepuy M, Beutin L, Vernozy-Rozand C.** 2006. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J Appl Microbiol* **100**:85-97.
48. **Perelle S, Dilasser F, Fach P.** 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O103, O111, O113, O145 and O157H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes* **18**:185-192.
49. **Nielsen EM, Andersen MT.** 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol* **41**:2884-2893.

50. **Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI, Etcheverría AI, Arroyo GH, Lucchesi PM, Parma AE, Blanco J.** 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* **7**:269-276.
51. **Lacher DW, Steinsland H, Blank TE, Donnenberg MS, Thomas S. Whittam TS.** 2007. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J Bacteriol* **189**:342-350.
52. **Hall TA.** 2013. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98.
53. **Chui L, Li V, Fach P, Delannoy S, Malejczyk K, Patterson-Fortin L, Poon A, King R, Simmonds K, Scott AN, Lee MC.** 2014. Molecular profiling of human and cattle *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* **53**:986-990.
54. **Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Koeck R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Hoeller D, Marejkova M, Morabito S, Caprioli A, Pierard D, Smith G, Jenkins C, Curova K, Karch H.** 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis* **56**:1373-1381.
55. **Bonanno L, Loukiadis E, Mariani-Kurkdjian P, Oswald E, Garnier L, Michel V, Auvray F.** 2015. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 strains examined via *stx* subtypes and insertion sites of Stx and EspK bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **81**:3712-3721.
56. **Jenkins C, Perry NT, Cheasty T, Shaw DJ, Frankel G, Dougan G, Gunn GJ, Smith HR, Paton AW, Paton JC.** 2003. Distribution of the *saa* gene in strains of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol* **41**:1775-1778.



57. **Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jr., Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**:1400-1407.
58. **Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H.** 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* **43**:1160-1167.
59. **Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape H, Schmidt MA, Karch H.** 2004. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun* **72**:1812-1816.
60. **Mellmann A, Fruth A, Friedrich AW, Wieler LH, Harmsen D, Werber D, Middendorf B, Bielaszewska M, Karch H.** 2009. Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerg Infect Dis* **15**:1474-1477.
61. **Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C.** 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* **39**:3060-3065.
62. **Beutin L, Fach P.** 2014. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. *Microbiology spectrum* **2**:1-23.
63. **Hauser E, Mellmann A, Semmler T, Stoeber H, Wieler LH, Karch H, Kuebler N, Fruth A, Harmsen D, Weniger T, Tietze E, Schmidt H.** 2013. Phylogenetic and molecular analysis of food-borne shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **79**:2731-2740.
64. **Feng PCH, Reddy S.** 2013. Prevalences of Shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Appl Environ Microbiol* **79**:6917-6923.

65. **Monaghan A, Byrne B, Fanning S, Sweeney T, McDowell D, Bolton DJ.** 2011. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. *Appl Environ Microbiol* **77**:8662-8668.
66. **Martin A, Beutin L.** 2011. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *Int J Food Microbiol* **146**:99-104.
67. **Shen J, Rump L, Ju W, Shao J, Zhao S, Brown E, Meng J.** 2015. Virulence characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from food, humans and animals. *Food Microbiol* **50**:20-27.
68. **Zweifel C, Schumacher S, Blanco M, Blanco JE, Tasara T, Blanco J, Stephan R.** 2005. Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. *Vet Microbiol* **105**:37-45.
69. **Brett KN, Ramachandran V, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP.** 2003. *stx1c* is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *J Clin Microbiol* **41**:926-936.
70. **Kumar A, Taneja N, Kumar Y, Sharma M.** 2012. Detection of Shiga toxin variants among Shiga toxin-forming *Escherichia coli* isolates from animal stool, meat and human stool samples in India. *J Appl Microbiol* **113**:1208-1216.
71. **Beutin L, Miko A, Krause G, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N.** 2007. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Appl Environ Microbiol* **73**:4769-4775.
72. **Ferdous M, Zhou K, Mellmann A, Morabito S, Croughs PD, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Rossen JW, Friedrich AW.** 2015. Is Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7 enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli*? Comprehensive molecular analysis using whole-genome sequencing. *J Clin Microbiol* **53**:3530-3538.

73. **Bugarel M, Beutin L, Scheutz F, Loukiadis E, Fach P.** 2011. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Appl Environ Microbiol.* **77**:2275-2281.
74. **Bielaszewska M, Middendorf B, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Karch H, Schmidt MA, Mellmann A.** 2008. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. *Clin Infect Dis* **47**:208-217.
75. **Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB.** 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **26**:822-880.
76. **Jenkins C, Lawson AJ, Cheasty T, Willshaw GA, Wright P, Dougan G, Frankel G, Smith HR.** 2003. Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. *Mol Cell Probes* **17**:149-156.

**Table 1: PCR primers used in this study for *stx* and *eae* subtyping**

**Table 2: Distribution of STEC and EPEC strains by serotype and virulence gene profiles<sup>a, b</sup>**

<sup>a</sup> Serotype, Phylogroup and ST (MLST-Sequence Type) as previously determined by Balière *et al.* (46) and Gourmelon *et al.* (47).

<sup>b</sup> Virulence gene targets *eibG*, F6/987P (*fasA*), F18,F107 (*fedA*), F41 (*fimF41a*), *cdt-III*, LT (*elt*), *cnf1*, *cnf2* and *aggR* that were detected in any of the strains are not listed in this table.

<sup>c</sup> nd: not done

**Figure 1: Shiga toxin and intimin encoding genes subtyping.**

A: distribution of *stx* gene subtypes found in STEC strains. B: distribution of *eae* gene subtypes found in *E.coli* strains.

**Figure 2: Prevalence of virulence gene targets among STEC and EPEC strains.**

Results are expressed as a percentage of the strains bearing the corresponding gene.

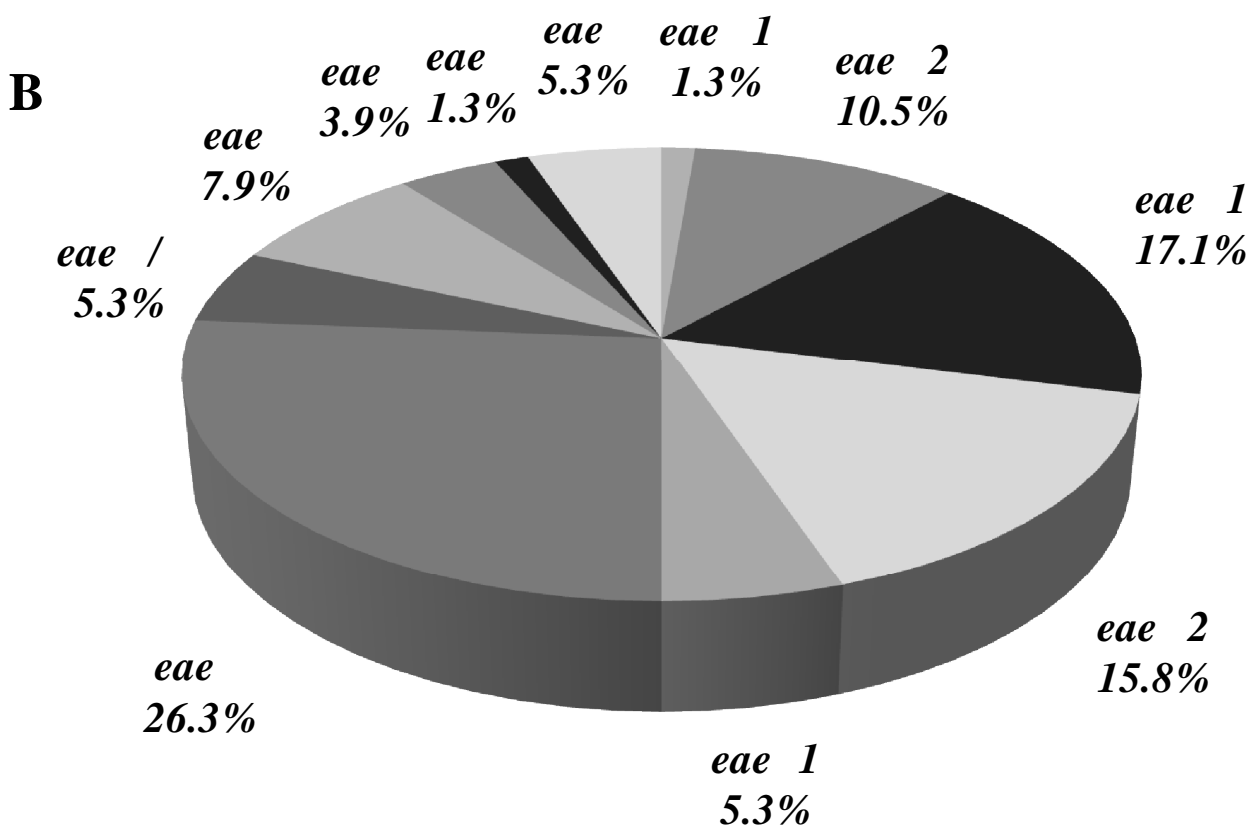
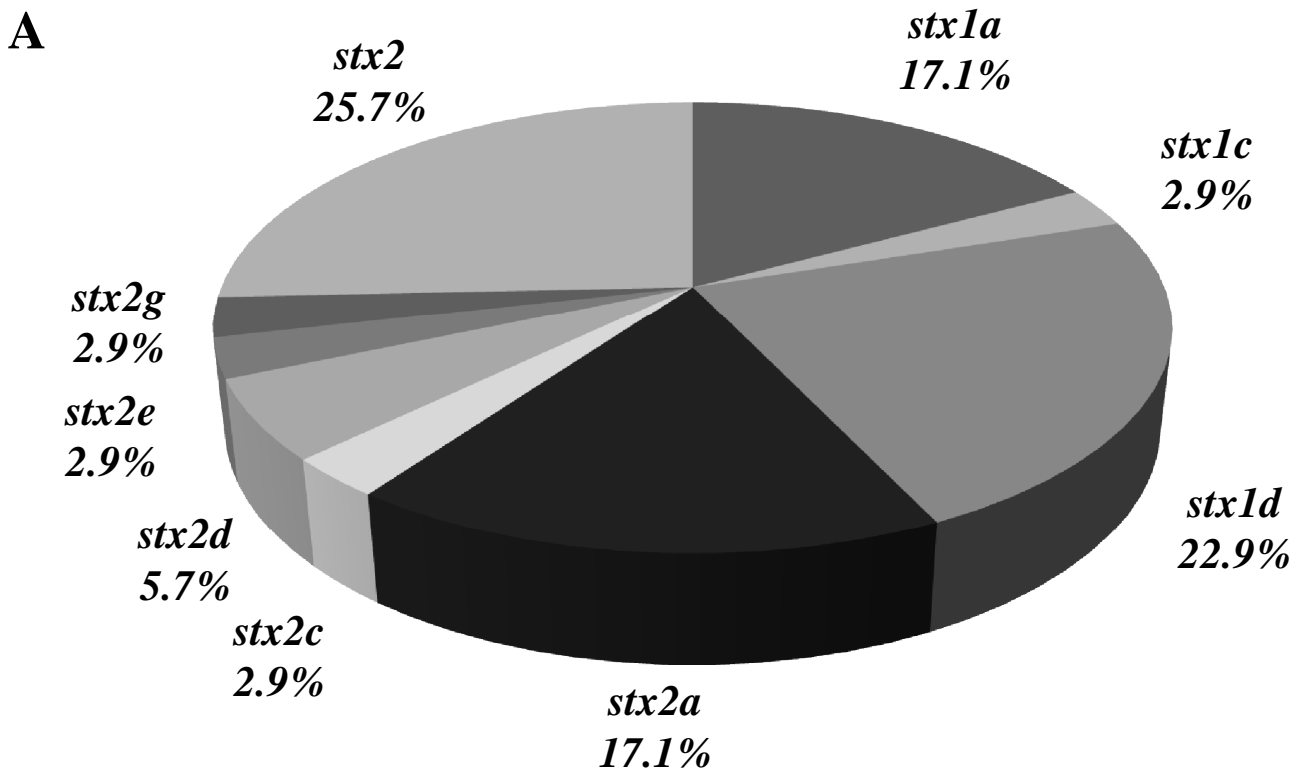
**Table 1: PCR primers used in this study for *stx* and *eae* subtyping.**

Gene	Primers	Sequence of primer (5'–3')	Fragment size (bp)	Reference
<i>stx2</i>	F4 R1	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC	627	7
<i>stx2</i>	F4-f R1-e/f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	625	7
<i>eae</i> <sup>a</sup>	EAE-F EAE-RB	ATTACTGAGATTAAGGCTGAT ATTTATTTGCAGCCCCCAT	682	50
<i>eae</i> -	EAE-F LP5	ATTACTGAGATTAAGGCTGAT AGCTCACTCGTAGATGACGGCAAGCG	722	50
<i>eae</i> -	EAE-F LP8	ATTACTGAGATTAAGGCTGAT TAGATGACGGTAAGCGAC	712	50
<i>eae</i> -	EAE-F B49R	ATTACTGAGATTAAGGCTGAT ACCACCTTTAGCAGTCAATTTG	468	50
<i>eae</i> -	FV373F FV373R	CAACGGTAAGTCTCAGACAC CATAATAAGCTTTTTGGCCTACC	443	50
<i>eae</i> -	IH1229aF IH1229aR	CACAGCTTACAATTGATAACA CTCACTATAAGTCATACGACT	311	50
<i>eae</i> <sup>b</sup>	eae-F1 escD-R1	ACTCCGATTCCTCTGGTGAC GTATCAACATCTCCCGCCCA	~1800–2100 depending on the allele	51
<i>eae</i> <sup>b</sup>	cesT-F3 eae-R3	CAGGAGCACAATCGCTGTTG CAGACGATACGATCCAGACC	1727	This study

<sup>a</sup> universal primers targeting the 3' variable region of the *eae*-1, -2, -1, -2, -2, -, -, -, - and - subtypes

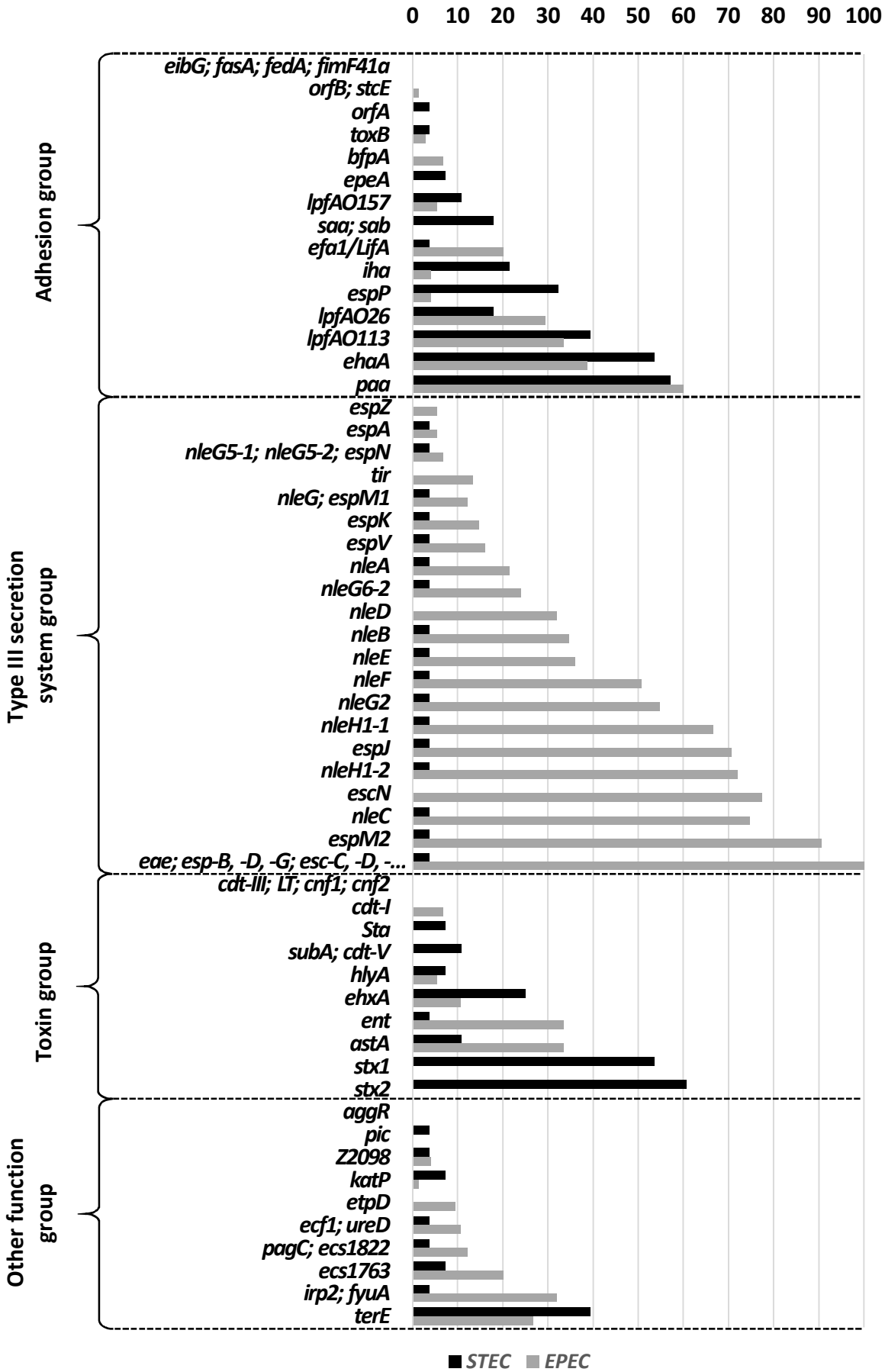
<sup>b</sup> primers targeting overlapping DNA fragments of the *eae* gene





**Figure 1: Shiga toxin and intimin encoding genes subtyping.**

A: distribution of *stx* gene subtypes found in STEC strains. B: distribution of *eae* gene subtypes found in *E.coli* strains.



**Figure 2: Prevalence of virulence gene targets among STEC and EPEC strains.** Results are expressed as a percentage of the strains bearing the corresponding gene.



## ***Chapitre 5 : EVALUATION DE LA CINÉTIQUE DE CONTAMINATION ET DE DECONTAMINATION DE COQUILLAGES AU CONTACT DE SOUCHES STEC***

L'objectif de ce chapitre était d'évaluer la cinétique de contamination et de décontamination d'huîtres en baignade dans de l'eau de mer naturelle au contact de souches STEC isolées au cours de cette étude, parallèlement à celle d'huîtres contaminées par des souches de *E. coli* non STEC.

### **A. Contexte de la quatrième partie de l'étude**

*E. coli* est utilisé comme indicateur de contamination fécale pour classer les eaux de baignade et les zones conchylicoles (Anonyme 2004, 2006). Les zones conchylicoles sont classées en trois principales catégories : A, B et C selon les concentrations en *E. coli* retrouvées dans les coquillages. Les coquillages en catégorie B sont placés dans des bassins de purification pendant un temps suffisant pour permettre la diminution des concentrations en *E. coli* des coquillages et obtenir des concentrations < 230 *E. coli* / 100 g de CLI (correspondant à des coquillages en catégorie A). Plusieurs études ont été réalisées pour évaluer la cinétique de contamination et de décontamination de coquillages au contact de souches de *E. coli* ou d'autres bactéries entériques (de Abreu Corrêa *et al.*, 2007, Love *et al.*, 2010, Chinnadurai *et al.*, 2014, Ottaviani *et al.*, 2015). La phase de contamination des coquillages par les *E. coli* est le plus souvent très rapide de l'ordre d'une heure, jusqu'à une contamination maximale appelée « l'équilibre cinétique ». Les *E. coli* sont éliminés rapidement du coquillage entre deux et six heures (Marino *et al.*, 2005). Un rapport entre la concentration en *E. coli* initiale présente dans l'eau de mer et la concentration mesurée dans les coquillages à l'équilibre cinétique permet de définir le facteur de bioaccumulation de chaque type de coquillage dans des conditions environnementales particulières. Ce facteur est extrêmement dépendant de l'état physiologique du coquillage, de sa taille, de l'espèce étudiée mais également des conditions environnementales (température, salinité, pH) (Love *et al.*, 2010).

Les *E. coli*, en plus d'être des bactéries commensales et des indicateurs de contamination fécale, peuvent aussi être des bactéries pathogènes telles que des STEC. A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à la cinétique de contamination et de décontamination de coquillages au contact d'une souche appartenant au sérotype O157:H7 mais *stx* négatif (Ottaviani *et al.*, 2015).

L'objectif de notre étude était donc d'évaluer la cinétique de contamination et de décontamination de souches STEC isolées de l'environnement dans des lots d'huîtres en baignade et de la comparer à celle de bactéries *E. coli* non STEC issues également de l'environnement.

## **B. Matériels et méthodes**

### **Souches bactériennes, huîtres et eau de mer**

Deux souches de *E. coli* STEC ont été sélectionnées parmi la collection de souches environnementales obtenue à partir de l'analyse précédente d'échantillons de coquillages, d'eaux et de sédiments (Publication N°2). La première souche STEC est une souche O100 :HNM *stx2+* (code : *E. coli stx2*) et la seconde une souche O154 :H31 *stx1+* (code : *E. coli stx1*), isolées à partir de lot de coquillages. Deux souches de *E. coli* non STEC (codes : *E. coli 1* et *E. coli 2*) ont été sélectionnées parmi la collection de souches environnementales obtenue dans le cadre plus global du projet Riskmanche isolées à partir des mêmes lots de coquillages que les souches STEC sélectionnées pour cette étude.

Les huîtres (*Crassostrea gigas*) de calibre 3-4 provenaient d'une exploitation conchylicole finistérienne (COIC ; Pointe du Château) située en Rade de Brest. Les tests ont été réalisés en Octobre 2014 sur des huîtres maigres en fin de période de ponte.

L'eau de mer utilisée pour les expérimentations a été prélevée directement à la mer. Les paramètres turbidité, concentrations en ammonium, nitrate, phosphate et chlorophylle A de cette eau de mer ont été mesurés avant son utilisation dans les microcosmes (données non présentées). Pendant l'expérience, les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer : le taux d'oxygène, la température, la salinité ont été mesurés à l'aide d'une sonde PT100 et d'un analyseur multiparamétrique (Eutech Instrument PD650 ; ThermoScientific).

### **Préparation des souches bactériennes et dénombrement des *E. coli***

Chaque souche a été mise en culture dans un bouillon d'eau peptonée tamponnée, à 37°C pendant 24 heures. Les suspensions bactériennes ont été titrées à l'aide de la méthode de dénombrement *E. coli* par étalement sur le milieu solide Tryptone-Bile-X-glucuronidase agar (TBX ; AES cheminex, Bruz, France), selon la norme ISO NF-EN-8199. Les suspensions bactériennes ont été préparées à une concentration d'environ 6 log<sub>10</sub> UFC/100 mL (10 mL de suspension bactérienne) pour avoir une contamination de l'eau mer d'environ 4 log<sub>10</sub> UFC/100 mL une fois la suspension bactérienne versée dans le bac.

La numération des *E. coli* dans l'eau de mer a été réalisée par filtration de 1, 10, 100 ou 500 mL d'eau sur membrane 0,45 µm (Pall Gelman GN-6 Metrocel : Pall Corporation, St Germin-en-Laye, France) et le dépôt du filtre sur le milieu TBX, incubé 24h à 44°C ; inspiré des normes ISO NF-EN-8199 et ISO TS-16649-3:2005. La concentration en *E. coli* réelle dans les bacs de contamination à T0 a été mesurée après quelques minutes d'homogénéisation de l'eau de mer avec la suspension bactérienne titrée versée. La numération des *E. coli* dans les huîtres a été réalisée par impédancemétrie selon la norme NF V 08-106.

## **Infrastructures et organisation**

L'étude de la cinétique de contamination et de décontamination a été réalisée en collaboration avec l'autre partie de l'équipe du laboratoire LSEM (Brest) localisé sur le site Ifremer de Nantes. L'équipe de Nantes disposait des infrastructures adaptées à ce genre d'expérimentation. Les cultures bactériennes ont été préparées au laboratoire Ifremer de Plouzané et les suspensions à Nantes. Cette répartition des tâches a nécessité l'élaboration d'un planning prenant en considération la préparation des souches bactériennes, le temps d'acheminement des coquillages, leur acclimatation en eau de mer (minimum 24 heures) et la mise en place des expérimentations de contamination/décontamination pour les deux types de souches STEC et non STEC sélectionnées. Les souches ont été testées par couple soit les souches *E. coli* stx1 et *E. coli* 1 ou *E. coli* stx2 et *E. coli* 2, en parallèle.

De plus, des essais préalables de suivi de croissance en cultures successives des souches sélectionnées dans les conditions d'expérimentations (préparation, expédition, conservation) ont permis de montrer que l'organisation générale de l'expérience n'avait pas d'impact sur la cinétique de croissance des *E. coli* (données non présentées). Les tests préliminaires sur la réponse des souches sélectionnées à l'analyse par impédancemétrie ont également montré une bonne sensibilité de la méthode pour la détection des souches (données non présentées).

## **Expérience de biaccumulation**

L'étude de la cinétique de contamination et de décontamination des huîtres a été réalisée pendant 24 heures.

Lors de la phase de contamination, les essais ont été réalisés en triplicat dans des bacs de 30 litres d'eau de mer (Bac A, B et C) avec un nombre de 30 huîtres par bac. Des dispositifs d'oxygénation d'aquarium ont été placés dans chaque bac pour l'oxygénation de l'eau et le maintien d'un courant d'eau continu dans les bacs.

La mesure de la concentration en *E. coli* réelle à T0 a montré que les bacs d'eau de mer ont été contaminés à hauteur de :

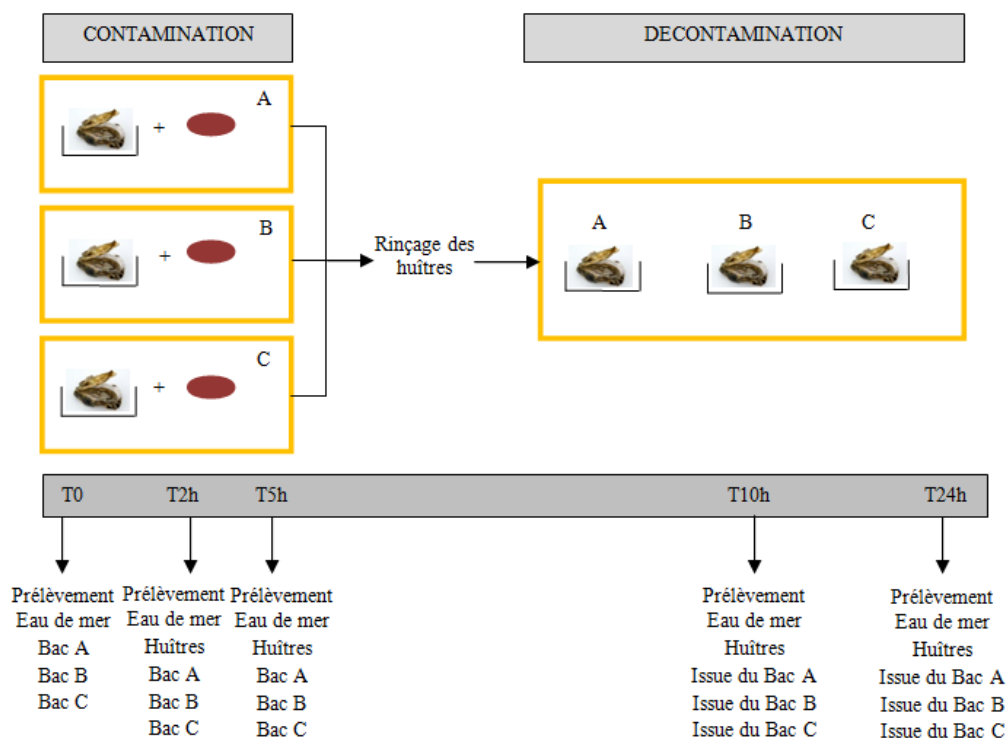
- souche *E. coli* stx1 : 4,1 log<sub>10</sub> UFC/100 mL d'eau de mer (A), 4,2 log<sub>10</sub> UFC/100 mL (B) et 6,1 log<sub>10</sub> UFC/100 mL (C)
- souche *E. coli* stx2 : 4,1 log<sub>10</sub> UFC/100 mL pour les 3 bacs (A, B et C)
- souche *E. coli* 1 : 7 log<sub>10</sub> UFC/100 mL (A), 3,9 log<sub>10</sub> UFC/100 mL (B) et 5,7 log<sub>10</sub> UCF/100 mL (C)
- souche *E. coli* 2 : 4,2 log<sub>10</sub> UFC/mL (A), 4,2 log<sub>10</sub> UFC/mL (B) et 4 log<sub>10</sub> UFC/mL (C)

Un prélèvement de six huîtres a été effectué à T0 (avant contamination) à partir du lot entier dans le bac d'acclimatation, puis à T2h et à T5h dans chaque bac de contamination (triplicat A, B et C) pour étudier la phase de contamination.

Pour la phase de décontamination, après le T5h, les huîtres ont été rincées rapidement à l'eau douce (eau du robinet) avant d'être ré-immersées dans deux bacs de 300 litres d'une nouvelle eau de mer : un bac pour les huîtres contaminées avec une souche STEC et un bac pour les huîtres contaminées avec une souche non STEC. Pour des raisons pratiques, toutes les huîtres contaminées par une souche STEC issues des triplicats A, B et C de contamination ont été rassemblées dans un même bac mais en ne modifiant pas la répartition des huîtres dans les paniers A, B et C (triplicat de contamination) de même pour les huîtres contaminées avec une souche non STEC (Figure 24).

Un prélèvement de six huîtres a été effectué à T10h et à T24h pour étudier la phase de décontamination.

Les temps de prélèvement ont été choisis en fonction des trois répétitions de test réalisés préalablement (données non présentées). Les résultats préliminaires ont mis en évidence que les temps T0, T2h, T5h, T10h et T24h suffisaient pour avoir un bon aperçu de la cinétique de contamination et de décontamination des huîtres. De plus, il était difficile d'augmenter le nombre de prélèvement pour des raisons pratiques (nombre d'échantillons analysables en 24h limité ; capacité d'analyses par impédancemétrie).



**Figure 24** : Organisation du suivi de la cinétique de contamination et de décontamination d'huîtres au contact d'une souche de *E. coli* (*E. coli* stx1 ou *E. coli* stx2 ou *E. coli* 1 ou *E. coli* 2)

## C. Résultats

La salinité mesurée dans l'eau de mer était de 32,5 ‰, le taux d'oxygénation était 82,8 % et la température de l'eau de mer était de  $17 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ .

Les variations observées entre les triplicats pour les concentrations en *E. coli* dans l'eau de mer à T0 étaient probablement dues à une mauvaise homogénéisation dans le bac.

Pour toutes les expériences, la concentration en *E. coli* mesurée dans les huîtres avant contamination était en dessous du seuil de détection établi de la méthode par impédancemétrie qui est de  $1,83 \log_{10}$  UFC/ 100 g de CLI (Figure 25).

Le suivi des concentrations en *E. coli* dans l'eau de mer est présenté dans la Figure 26 et celui des concentrations en *E. coli* dans les huîtres est présenté en Figure 25 pour les quatre souches testées.

Pendant la phase de contamination entre T0 et T5h, les concentrations en *E. coli* dans l'eau de mer ont évoluées :

- de  $4,8 \pm 1,1 \log_{10}$  UFC/100 mL à  $4,6 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/100 mL pour la souche *E. coli* stx1
- de  $5,5 \pm 1,6 \log_{10}$  UFC/100 mL à  $4,5 \pm 0,9 \log_{10}$  UFC/100 mL pour la souche *E. coli* 1
- de  $4,1 \pm 0 \log_{10}$  UFC/100 mL à  $4,6 \pm 0,6 \log_{10}$  UFC/100 mL pour la souche *E. coli* stx2
- de  $4,1 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC/100 mL et  $4 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC/100 mL pour la souche *E. coli* 2

Pendant la phase de contamination, entre T0 et T2h, la concentration en *E. coli* dans les huîtres est passée de  $< 1,8 \log_{10}$  *E. coli*/100 g CLI (seuil de détection) à :

- $3,9 \pm 0,3 \log_{10}$  *E. coli*/100 g CLI pour la souche *E. coli* stx1
- $4,5 \pm 0,8 \log_{10}$  *E. coli*/100 g CLI pour la souche *E. coli* 1
- $3,7 \pm 0,7 \log_{10}$  *E. coli*/100 g CLI pour la souche *E. coli* stx2
- $4,5 \pm 0,3 \log_{10}$  *E. coli*/100 g CLI pour la souche *E. coli* 2.

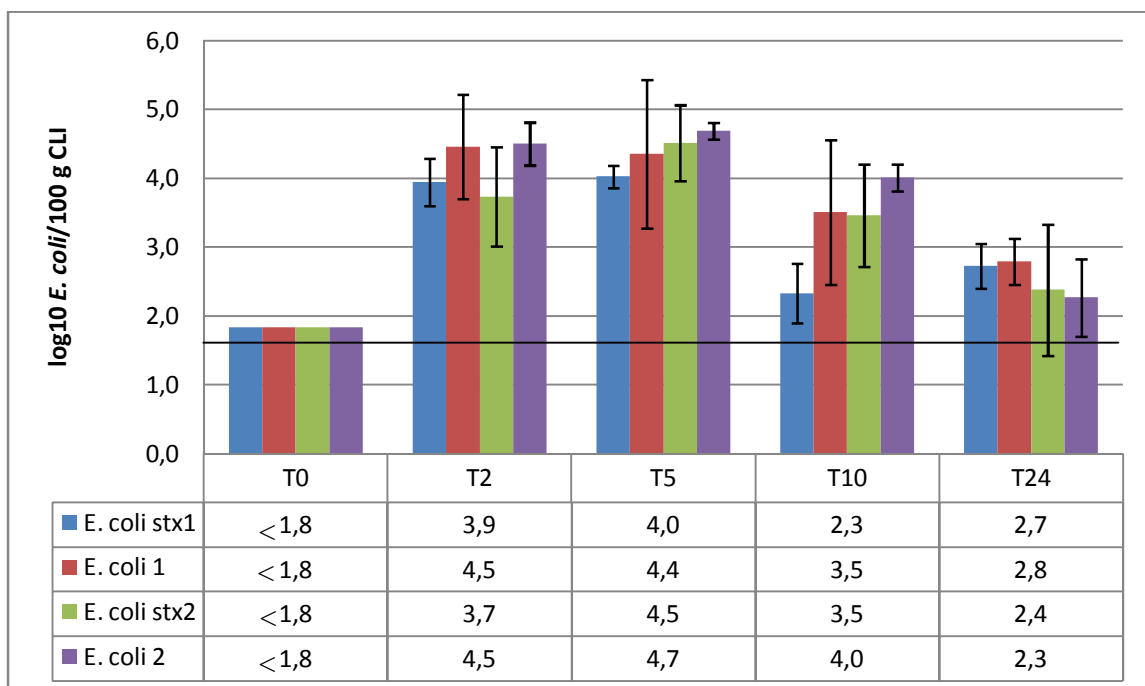
Les facteurs de bioaccumulation calculés sont donc de :

- $0,9 \pm 0,1$  pour les huîtres contaminées avec la souche *E. coli* stx1
- $1 \pm 0,1$  pour les huîtres contaminées avec la souche *E. coli* 1
- $0,9 \pm 0,1$  pour les huîtres contaminées avec la souche *E. coli* stx2
- $1,1 \pm 0,1$  pour les huîtres contaminées avec la souche *E. coli* 2

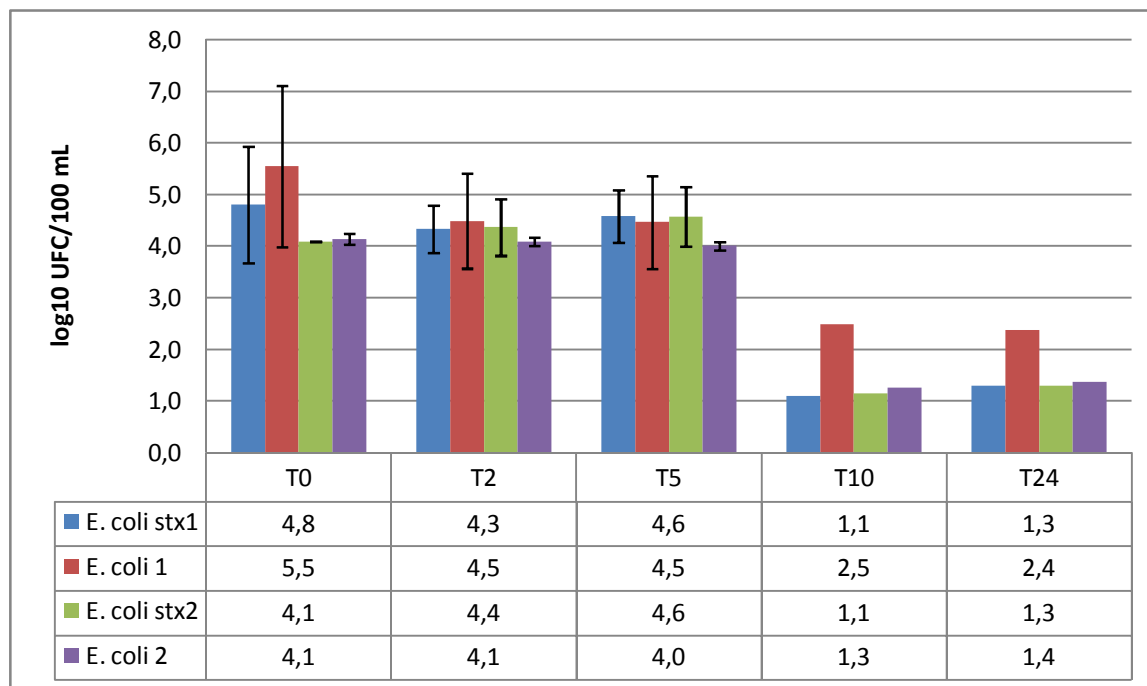
Les concentrations en *E. coli* ont très peu varié dans les huîtres pour les quatre souches testées entre T2h et T5h avec une moyenne de  $4,3 \pm 0,3 \log_{10}$  *E. coli*/100 g CLI.

Pendant la phase de décontamination, de T10h à T24h, les concentrations en *E. coli* pour les quatre souches testées ont varié en moyenne, dans l'eau de mer, de  $1,5 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/100 mL à  $1,6 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/100 mL.

Pendant la phase de décontamination, de T5h à T10h, les concentrations en *E. coli* pour les quatre souches testées ont chuté en moyenne, dans les huîtres, de  $4,4 \pm 0,3 \log_{10}$  *E. coli*/100 g CLI à  $3,3 \pm 0,7 \log_{10}$  *E. coli* /100 g CLI. De T10h à T24h, les concentrations en *E. coli* dans les huîtres ont encore chuté en moyenne d'un log avec une concentration moyenne en fin d'expérience de  $2,5 \pm 0,3 \log_{10}$  *E. coli* /100 g CLI.



**Figure 25** : Niveaux moyens des concentrations en *E. coli* stx1, *E. coli* 1, *E. coli* stx2 et *E. coli* 2 mesurés dans les huîtres au cours des phases de contamination (T0 à T5h) et de décontamination (T5h à T24h). Représentation du seuil de détection de la méthode de numération par impédancemétrie (ligne).



**Figure 26** : Niveaux moyens des concentrations en *E. coli* stx1, *E. coli* 1, *E. coli* stx2 et *E. coli* 2 mesurés dans l'eau de mer au cours des phases de contamination (T0 à T5h) et de décontamination (T5h à T24h)

#### D. Discussion

Cette étude est, à notre connaissance, la première évaluation du comportement des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines pendant des phases de contamination et de décontamination chez l'huître *Crassostrea gigas*.

Les niveaux de contamination de l'eau de mer utilisée dans cette expérience, de 4,1 à 5,5 log<sub>10</sub> UFC/100 mL, sont des niveaux de concentration en *E. coli* élevés, observés également dans l'environnement (Publication N°1 : concentrations mesurées dans les eaux douces de 1,6 à 5,3 log<sub>10</sub> UFC/100 mL) et utilisées dans d'autres études sur la bioaccumulation des *E. coli* dans les coquillages (Marino *et al.*, 2005, Love *et al.*, 2010, Ottaviani *et al.*, 2015).

Cette étude montre une contamination très rapide et maximale des huîtres par les *E. coli*, avec des concentrations en *E. coli* évoluant de < 1,8 log<sub>10</sub> *E. coli* /100 g CLI mesurées à T0 avant contamination, vers une moyenne maximale de 4,2 ±0,4 log<sub>10</sub> *E. coli* /100 g CLI mesurée après deux heures de baignade. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans l'étude de Jozic *et al.*, en 2012, qui avaient contaminé des huîtres dans une eau de mer avec une concentration en *E. coli* d'environ 5 log<sub>10</sub>/100 mL. La concentration maximale en *E. coli* a été observée dans les huîtres dès la première heure de baignade avant d'atteindre un plateau (l'équilibre cinétique). La rapidité de la contamination des coquillages par *E. coli* a également été mise en évidence dans des moules en baignade dans une eau de mer contaminée à hauteur de 7 log<sub>10</sub>/ 100 mL. La concentration maximale en *E. coli* mesurée dans les coquillages a été observée dès 3 heures de baignade (Marino *et al.*, 2005).

Le facteur de bioaccumulation moyen calculé dans cette étude est de  $1 \pm 0,1$ . Ce facteur est en accord avec ceux retrouvés dans la littérature en conditions expérimentales, de  $>0,6$ , 1 et 1,1 pour des huîtres au contact de fèces de porc, d'effluents ou de fèces de bovin, respectivement, pour des concentrations initiales en *E. coli* mesurées dans l'eau de mer de 7,1, 5,8 et 4,3  $\log_{10}$  UFC/100 mL (Mauffret *et al.*, 2013). Toutefois, ces facteurs peuvent être variables car très dépendants des conditions environnementales (température et salinité) qui vont influencer la physiologie du coquillage ou de l'espèce de coquillage étudiée (Jozic *et al.*, 2012, Derolez *et al.*, 2013). Le facteur de bioaccumulation de l'indicateur *E. coli* peut varier entre 0,3 et 7,7 chez les moules et entre 0,9 et 10,3 chez les huîtres en balnéation (Campos *et al.*, 2013). Les variations peuvent être encore plus importantes *in situ* avec des variations observées entre 0,1 et 406 chez les huîtres dans l'environnement (Derolez *et al.*, 2013).

Aucune différence de cinétique n'a été mise en évidence entre des souches de *E. coli* STEC (souches *E. coli* stx1 ou *E. coli* stx2) et les souches de *E. coli* non STEC (souches *E. coli* 1 ou *E. coli* 2) dans les conditions de l'expérience, suggérant ainsi que la présence des gènes *stx* n'a pas incidence sur le comportement des *E. coli* dans les huîtres. Il semble également que le sérotype ne soit pas un facteur intervenant dans la cinétique de contamination et de décontamination car les souches de sérotype O100 :HNM (souche *E. coli* stx2) et O154 :H31 (souche *E. coli* stx1) ont le même comportement face aux huîtres. Il serait intéressant de comparer d'autres souches de sérotypes différents pour confirmer cette observation.

Au final, cette expérience expose les premiers éléments de réponse concernant l'influence de la présence des gènes *stx* chez *E. coli* sur la cinétique de contamination et de décontamination d'huîtres au contact de STEC. *E. coli* étant utilisé comme indicateur de contamination fécale pour la classification sanitaire des zones conchylicoles, il était important de savoir si le fait d'acquérir des gènes de virulence, était un critère à prendre en compte dans l'élaboration des protocoles de décontamination des coquillages mis en place par la réglementation CE/854/2004. Les premiers tests suggèrent donc l'absence de l'influence des gènes *stx* sur la persistance des STEC dans les coquillages. Néanmoins, il serait important d'appliquer ce protocole d'évaluation à un panel plus grand de souches STEC isolées de l'environnement pour mieux démontrer que la présence des gènes *stx* n'a aucune influence sur la cinétique de contamination et de décontamination de coquillages. Il serait intéressant de tester deux souches d'un sérotype donné possédant un gène *stx* pour l'une et dépourvu de gène *stx* pour l'autre. Il serait également nécessaire de tester ces souches sur d'autres espèces de coquillages (coques, moules, palourdes) et dans des conditions environnementales différentes.



## ***DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES***

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'évaluer la présence des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) et des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) dans l'environnement littoral. Cette étude constitue, à notre connaissance, la première recherchant et caractérisant simultanément des STEC et EPEC dans cet environnement. Elle présente de plus l'avantage de rechercher, à la fois, ces bactéries dans les zones conchylicoles au niveau des coquillages, les sédiments superficiels et les eaux côtières mais également aux exutoires des bassins versants amont.

Si de nombreuses études ont eu comme objectifs d'évaluer la présence de ces souches au niveau des sources : fèces, effluents ou rivières, des données manquaient au niveau des exutoires de bassins versants et des zones littorales (Garcia-Aljaro *et al.*, 2005, Mora *et al.*, 2012, Bibbal *et al.*, 2015).

Parmi les différents pathovars de *E. coli*, nous avons sélectionné les STEC et les EPEC du fait des pathologies qui leur sont associées, de leurs réservoirs potentiellement présents en amont du littoral et des gènes de virulence pouvant être présents à la fois dans ces deux pathovars. Ces agents pathogènes gastro-intestinaux continuent de poser une menace pour la santé humaine dans le monde entier. Alors que les EPEC restent une cause importante de diarrhées dans les pays à faibles revenus, les STEC et tout particulièrement les EHEC sont responsables de colites hémorragiques ou du Syndrome Hémolytique et Urémique chez l'enfant.

La réalisation des trois étapes majeures de ce travail de thèse a permis : 1) d'évaluer la présence de STEC et de EPEC dans trois zones conchylicoles françaises et d'investiguer les paramètres pouvant influencer sur leur présence, 2) de caractériser les souches isolées et d'évaluer la présence de marqueurs génétiques potentiellement associés à ces pathovars, 3) et enfin de comparer la cinétique de contamination et de décontamination de coquillages par des souches de *E. coli* STEC et non STEC, isolées dans cette étude.

La première étape pour rechercher les *E. coli* STEC ou EPEC a reposé sur la détection des gènes caractéristiques de ces pathovars, soient les gènes *stx1*, *stx2* et *eae*, dans les bouillons d'enrichissement des échantillons analysés. Ces gènes ont été fréquemment mis en évidence dans ces bouillons d'enrichissement avec la détection des gènes *stx1* ou *stx2* respectivement dans 30,3 % des lots de coquillages, 85,9 % des eaux de rivière, 41,7 % des eaux marines et 29,2 % des sédiments superficiels. La détection du gène *eae* a été faite dans 74,8 % des lots de coquillages, 100 % des eaux de rivière, 100 % des eaux marines et 43,6 % des sédiments superficiels. L'analyse des données acquises sur les deux années de suivi montre une fréquence similaire de détection des gènes *stx1* et *stx2* dans les échantillons pour les différentes matrices analysées. Au niveau des coquillages, les gènes *stx1* et *stx2* ont été plus fréquemment détectés dans les coques (31,5 % et 31,5 %, respectivement) que dans les

moules (18,7 % et 17,7%, respectivement) ou les huîtres (9,6 % et 9,6 %, respectivement). Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus lors d'une précédente étude au cours de laquelle les gènes *stx* avaient été également plus fréquemment détectés dans des coques (100 %) que dans des moules (43,9%) ou des huîtres (33,3 %) collectées sur des sites des différentes façades maritimes françaises (n=72 lots de coquillages analysés) entre 2002 et 2004 (Gourmelon *et al.*, 2006).

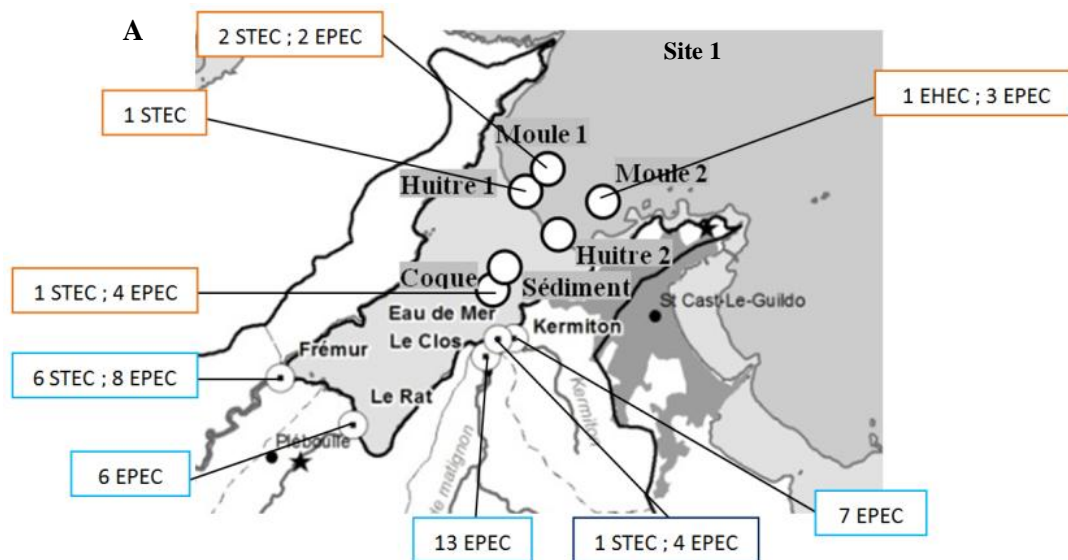
La présence fréquente de ces gènes dans des eaux environnementales (eaux de mer ou effluents) a été également observée dans des études précédentes (Bennani *et al.*, 2011, Bibbal *et al.*, 2014). Toutefois, au cours de notre étude, des souches STEC ou EPEC n'ont été isolées respectivement que dans 5,1 % et 13,7 % des échantillons analysés (n=505). La faible fréquence d'isolement de souches STEC et EPEC vs la fréquence élevée de détection des gènes dans les échantillons analysés a également été observée dans des études ciblées sur les fèces d'origine bovine, des aliments ou des échantillons de l'environnement (Miyagi *et al.*, 2001, Bai *et al.*, 2013, Bibbal *et al.*, 2015).

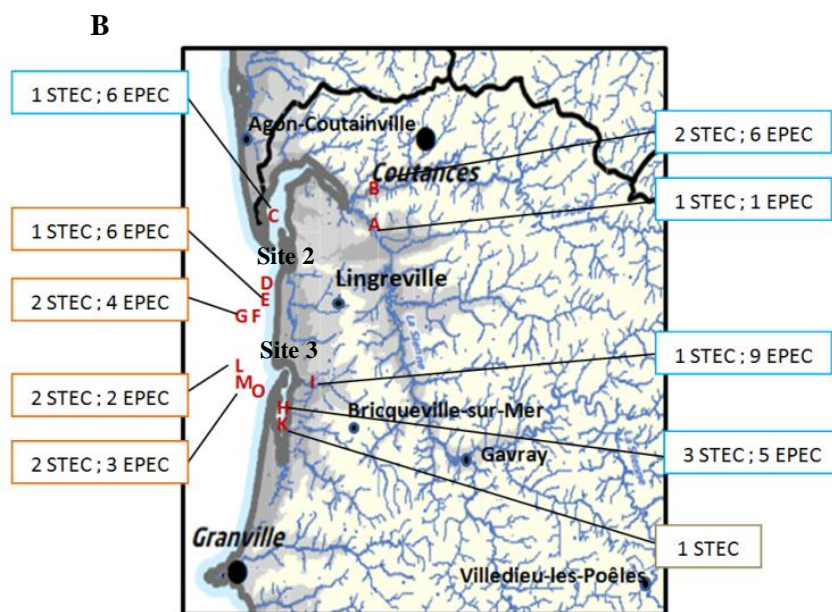
La fréquence élevée de détection des gènes *stx* dans ces bouillons d'enrichissement pourrait être due à la présence de bactéries viables non cultivables, de cellules mortes ou de bactériophages porteurs des gènes *stx*, à l'état libre, éventuellement présents dans ces bouillons (Gourmelon *et al.*, 2006, Rozen et Belkin, 2001, Martinez-Castillo *et al.*, 2013). Pour évaluer cette dernière possibilité, nous avons recherché si des bactériophages porteurs de gènes *stx* pouvaient être présents dans une partie des échantillons analysés (24 eaux de rivière et six eaux de mer prélevées d'août 2014 à Janvier 2015 et 34 bouillons d'enrichissements d'eaux ou de coquillages trouvés positifs pour les gènes *stx1* ou *stx2* au cours de la même période sur le site en Bretagne) (collaboration avec le Laboratoire du Département de Microbiologie, Faculté de Biologie de l'Université de Barcelone, Espagne). La présence des bactériophages *stx1* et *stx2* a été mise en évidence dans respectivement 25 % des eaux à des concentrations variant entre 3,2 log<sub>10</sub> Copies de Génome (CG)/100 mL d'eau et 5,6 log<sub>10</sub> CG/100 mL et dans 83,3 % des eaux entre 3,0 log<sub>10</sub> CG/100 mL et 4,8 log<sub>10</sub> CG/100 mL. Ces concentrations sont en accord avec les concentrations généralement retrouvées dans des effluents ou eaux de rivières dans d'autres études (Immamovic *et al.*, 2010a, Yang *et al.*, 2011) et la plus forte fréquence de détection de bactériophages *stx2* dans des eaux environnementales (Martinez-Castillo et Muniesa 2014). Dans les bouillons d'enrichissement analysés, les bactériophages *stx2* ont été détectés dans 27,3 % des eaux de rivière (n=6/22) et dans une eau de mer (n=1/3) mais ils n'ont pas été mis en évidence dans les bouillons d'enrichissement de coquillages. Les bactériophages *stx1* ont été détectés dans 9,1 % des eaux douces (n=2/22), dans deux eaux de mer et dans un bouillon d'enrichissement correspondant au lot de coques prélevé en août 2014. Ce résultat constitue, à notre connaissance, la première mise en évidence de bactériophages *stx1* dans des coquillages. La présence de bactériophages dans les enrichissements obtenus à partir des eaux filtrées suggère que des bactériophages ont été retenus en même temps que les bactéries sur les filtres. Ces résultats confortent notre hypothèse que les

bactériophages Stx pourraient être responsables d'une partie de la détection des gènes *stx* dans les échantillons analysés dans ce travail.

Au cours de cette étude, un total de 27 souches STEC, 1 EHEC, 70 EPEC atypiques et 5 EHEC typiques différentes a été isolé, montrant une faible présence de ces bactéries potentiellement pathogènes au regard des 12 016 isolats de *E. coli* analysés.

Cette étude montre la présence de STEC ou EPEC sur les trois zones conchylicoles étudiées en Bretagne et Normandie et dans tous les matrices étudiées : coquillages : 12 souches STEC et 23 souches EPEC isolées sur la période étudiée ; eaux de rivières, 14 souches STEC et 62 souches EPEC isolées ; eaux côtières une souche STEC et quatre souches EPEC isolées ; sédiments : une souche STEC isolée et aucune souche EPEC isolée (Février 2013 à Janvier 2015 ; Figure 27).





**Figure 27** : Répartition des souches de *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) et *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et *E. coli* entérohémorragique (EHEC) isolées à partir des échantillons environnementaux prélevés (coquillage en orange, sédiment en gris, eaux en bleu clair et foncé) entre Février 2013 et Janvier 2015 sur le site 1 : Baie de la Fresnaye (A), le site 2 : Havre de Regnéville et le site 3 : Havre de la Vanlée (B). huîtres :L et F ; moules :G et M et coques :E. eaux de rivière :A, B, C, I, H. sédiments :K et D.

Ces résultats montrent donc qu'un faible nombre de souches STEC et EPEC a été isolé dans ces échantillons environnementaux, et que pour les trois sites, la majorité des souches STEC et EPEC ont été isolées dans les eaux de rivières et dans les coquillages et qu'enfin une plus forte proportion de souches EPEC que de souches STEC a été observée, en accord avec les résultats d'études précédentes (Hamilton *et al.*, 2010, Chandran et Mazumder 2015).

Le faible isolement de souches *E. coli* pathogènes (1 STEC et 0 EPEC) dans les sédiments superficiels peut être expliqué par la nature des sédiments des zones conchylicoles étudiées. Ils étaient constitués principalement de particules grossières (sable) avec une absence ou une faible présence de vase et donc peu propices au maintien d'une population de *E. coli* dans ce compartiment. Des études précédentes avaient montré que les sédiments superficiels pouvaient jouer le rôle de réservoir de souches de *E. coli* mais dans ce cas les sédiments avaient une teneur élevée en matière organique et étaient riches en vase (Luna *et al.*, 2010, Whitman *et al.*, 2014). La recherche des *E. coli* dans les sédiments indépendamment de la recherche de STEC ou de EPEC a permis d'obtenir 21 isolats pour 39 échantillons de sédiments, soit un nombre beaucoup plus faible que dans les eaux ou les coquillages, confirmant la faible présence de ce genre de bactéries dans ces sédiments.

Une partie des souches isolées appartenait à un des sérotypes majeurs soit une souche STEC (*E. coli* O26:H11) isolée d'un lot de moules correspondant à une souche EHEC et un total de 14 souches EPEC appartenant aux sérotypes O26:H11, O145:H28 et O103:H2. Au cours de cette étude, trois protocoles complémentaires avaient été utilisés pour rechercher les souches STEC et EPEC : i)

application du protocole ISO/TS-13136 ciblant les sérotypes majeurs, ii) isolement de souches de *E. coli* dans les bouillons d'enrichissement et iii) isolement de souches de *E. coli* directement dans les échantillons, ces deux derniers protocoles étant indépendants des sérotypes. Le protocole ISO/TS-13136 a été le seul protocole permettant d'isoler une souche STEC de sérotype majeur ou EHEC typique, au cours de l'étude et a conduit à une plus forte détection de souches EPEC de sérotypes majeurs que les autres protocoles (n=9/14). Cette étude présentait la première application de ce protocole ISO/TS-13136 à des coquillages et à des eaux littorales (Publication N°1). Ces résultats suggèrent que ce protocole est à privilégier dans le cas d'une recherche des sérotypes majeurs dans des échantillons environnementaux. Les deux autres protocoles ont, quant à eux, permis d'isoler un total de 56 souches STEC et 103 souches EPEC n'appartenant pas aux sérotypes majeurs. Lors de cette étude, aucune souche de sérotype O157:H7 n'a été isolée bien que le protocole ISO/TS-13136 ciblant les sérotypes majeurs incluant le O157 (protocole appliqué sur 282 échantillons de Février 2013 à Février 2014) ait été appliqué. Ce résultat est en accord avec la faible prévalence de ce sérotype dans l'environnement au niveau des effluents d'origine agricole (Bibbal *et al.*, 2014), des eaux de rivières (Jokinen *et al.*, 2011), des eaux marines (Miyagi *et al.*, 2001) et des coquillages (Manna *et al.*, 2008).

Cette étude a également permis d'apporter des données sur la présence de souches STEC et EPEC dans les échantillons environnementaux en fonction de différents paramètres : sites, périodes d'isolement (saisons), matrices, pluviométrie et concentrations en indicateur de contamination fécale (*E. coli*). Pour les sites étudiés, l'analyse de l'ensemble des données acquises sur les deux ans d'étude montre un effet saisonnier de la détection des *E. coli* pathogènes avec la détection de souches STEC plus fréquemment en été et des souches EPEC plus fréquente en été et en automne (test khi-deux ;  $p < 0,05$ ).

Cependant, aucune relation n'a été observée entre la prévalence des STEC et des EPEC et la pluviométrie ou la température. Concernant les concentrations en *E. coli* des échantillons analysés, l'isolement des souches STEC a été plus fréquent dans les eaux faiblement contaminées (présence dans 8 % des eaux avec des concentrations  $< 500 E. coli / 100 \text{ ml}$ ) que dans les eaux fortement contaminées (présence dans 5 % des eaux avec des concentrations  $> 1000 E. coli / 100 \text{ ml}$ ). Tandis que dans les coquillages l'isolement des souches a été plus important dans les coquillages fortement contaminés (présence dans 2 % des coquillages avec des concentrations  $> 4\ 600 E. coli / 100 \text{ g de CLI}$ ) que dans les coquillages faiblement contaminés (concentrations  $< 230 E. coli / 100 \text{ g de CLI}$ ). Pour les EPEC, l'isolement de souches a été plus fréquent dans les échantillons d'eaux et de coquillages fortement contaminés en *E. coli* avec la présence de souches EPEC dans 25 % des eaux avec des concentrations  $> 1\ 000 E. coli / 100 \text{ ml}$  et dans 23 % des coquillages avec des concentrations  $> 4\ 600 E. coli / 100 \text{ g de CLI}$ .

Ce travail de thèse s'insérant dans un projet plus large, il a été également possible de comparer les données de présence de STEC et de EPEC dans les échantillons environnementaux à celles acquises en utilisant les marqueurs *Bacteroidales* associés à l'Homme (HF183, Seunrick *et al.*, 2005), aux ruminants (bovin et ovin ; Rum2Bac ; Mieszkin *et al.*, 2010) et aux porcs (Pig2Bac ; Mieszkin *et al.*, 2009) dans les échantillons d'eaux. Si les marqueurs *Bacteroidales* ont été également recherchés dans les coquillages collectés sur les trois sites conchylicoles, il n'a pas été possible d'obtenir des résultats par ces marqueurs sur l'origine de la contamination fécale ; des développements méthodologiques sont encore nécessaires pour obtenir une sensibilité suffisante.

Les résultats montrent généralement que dans 58 % des échantillons d'eaux où une souche STEC a été isolée (7 sur 12 échantillons), une origine de contamination a pu être mise en évidence : soit une contamination mixte (humaine et animale ; détection du marqueur HF183 et Rum2Bac) dans 5 échantillons sur 12, une contamination seulement par les ruminants (bovins ou ovins) dans deux échantillons. De même pour les souches EPEC, une origine de contamination a pu être mise en évidence dans 69 % des échantillons (31 sur 45 échantillons) : soit une contamination mixte (humaine et animale ; détection du marqueur HF183 et Rum2Bac) dans 16 échantillons sur 45 et une contamination seulement par les ruminants (bovins ou ovins) dans 15 échantillons. Ces résultats suggèrent que la présence de ces souches est souvent associée à une présence de contamination par les ruminants. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution car il est également à noter que ces marqueurs associés à l'Homme et aux ruminants étaient également détectés dans les échantillons dans lesquels aucune souche STEC ou EPEC n'a été isolée (présence d'une origine de contamination fécale identifiée dans 70 % des échantillons).

Ce travail de thèse a permis également d'acquérir des données sur la diversité des souches STEC et EPEC dans des échantillons environnementaux. La caractérisation des souches montre une diversité très importante des souches environnementales isolées lors de cette étude : 75 sérotypes différents, 46 ST différents, 79 profils PFGE différents et 75 profils de gènes de virulence ont été ainsi obtenus. Ces résultats sont en accord avec la grande diversité de sérotypes précédemment observée dans des échantillons d'effluents ou d'eaux environnementales en Espagne ou en Californie (Garcia-Aljaro *et al.*, 2005, Cooley *et al.*, 2014). Il est également à noter que des phylogroupes différents ont été observés au sein de ces souches STEC et EPEC avec une majorité de souches STEC de phylogroupe A et B1 et une répartition des souches EPEC au sein des quatre phylogroupes A, B1, B2 et D étudiés.

Cette très grande diversité de souches suggère un apport de multiples souches STEC ou EPEC, présentes chacune probablement en faible quantité dans les échantillons analysés. De plus, il est probable que d'autres souches STEC ou EPEC étaient également présentes dans les enrichissements mais n'ont pas pu être mises en évidence car nous n'avons analysé qu'un faible pourcentage d'isolats de *E. coli* au vu de l'ensemble des *E. coli* présents. Il est possible aussi que certaines souches STEC ou

EPEC ne se soient pas développées dans les enrichissements ou sur les milieux solides du fait de leur plus faible présence dans la population de départ ou de leur mauvais état physiologique du au transit de la source aux coquillages. Des souches STEC ou EPEC peuvent en effet perdre leur capacité à cultiver mais rester viables (bactéries viables non cultivables) du fait des conditions stressantes rencontrées par ces bactéries lors de leur transfert jusqu'aux coquillages.

Un des objectifs de cette étude était également d'évaluer le caractère plus ou moins pathogène des souches isolées de l'environnement en déterminant des profils de gènes de virulence reposant sur un nombre élevé de gènes (technique de PCR haut débit permettant la recherche de 75 gènes de virulence).

Parmi les souches potentiellement les plus virulentes du fait de la mise en évidence d'un nombre important de gènes présents, nous pouvons citer une souche de sérotype O26 :H11 *stx1<sub>a</sub><sup>+</sup>eae I<sup>+</sup>*, caractéristique des EHEC du fait de la présence du gène *eae* et de son appartenance aux sérotypes majeurs, isolée à partir d'un lot de moules sur le site 1. La caractérisation de cette souche O26 :H11 a permis de l'associer au ST21 qui avait déjà été décrit pour des souches O26 :H11 responsables de SHU et de colites hémorragiques chez l'Homme (Bielaszewska *et al.*, 2013, Zweifel *et al.*, 2013). Cette étude a mis en évidence la présence de 45 gènes de virulence dans cette souche. Une autre souche STEC susceptible d'être associée à des infections humaines est la souche appartenant au sérotype O91 :H21 *stx1<sub>a</sub><sup>+</sup>, stx2<sub>a</sub><sup>+</sup>, stx2<sub>c</sub><sup>+</sup> stx2<sub>d</sub><sup>+</sup>*, ST442, soit un ST qui a également été associé à une souche de O91 :H11 responsable de SHU (Mellmann *et al.*, 2009).

Au regard de la caractérisation des souches EPEC isolées de l'environnement, 11 souches appartenant aux sérotypes O23 :H8 (n=2), O153 :H2 (n=2), O26 :H11 (n=3), O103 :H25 (n=1), O103 :H2 (n=1) et O145 :H28 (n=2) pourraient être potentiellement pathogènes pour l'Homme. Ces souches possèdent entre 13 et 19 gènes de virulence sur un total de 20 gènes associés à des marqueurs de virulence retrouvés sur les îlots de pathogénicité OI-122, OI-43-48, O-57 et OI-71 typiquement utilisés pour identifier les souches EHEC hautement pathogènes pour l'Homme parmi les souches STEC et EPEC avec un potentiel de virulence moindre (Coombes *et al.*, 2008, Bugarel *et al.*, 2010, Chui *et al.*, 2013).

Si d'autres souches isolées au cours de cette étude présentaient également un profil moléculaire de virulence, la majorité des souches isolées semble toutefois présenter un risque faible pour la santé humaine avec par exemple la présence majoritaire du variant *stx1d* au sein des souches STEC isolées, peu associé à des cas sévères d'infection chez l'Homme et la détection que de un à 13 gènes de virulence supplémentaires aux gènes *stx*.

Parmi les souches potentiellement peu virulentes, le sérotype O100 :HNM a présenté un intérêt particulier pour plusieurs raisons. Ce sérotype O100 :HNM *stx2<sup>+</sup>* a été en effet le sérotype le plus isolé à partir des échantillons prélevés sur les sites normands : sites 2 et 3 (9 isolats différents après retrait

des éventuels répliquats). Ces clones ont plus particulièrement été isolés dans les coquillages (n=7/9). Ils proviennent des différents types de coquillages (huîtres, moules et coques), d'un sédiment et d'une eau de rivière, prélevés aux mois de Mai et Juin 2013 et Mars et Juin 2014. La caractérisation de ces isolats par PFGE et MLST (ST993) a confirmé la présence d'un même et unique clone au sein de l'ensemble de ces échantillons. L'étude de son profil de virulence nous a amené à penser que cette souche était peu virulente puisqu'elle ne possédait que les gènes *paa*, codant une adhésine et *terE*, codant une enzyme impliquée dans la dégradation des tellurites, sur les 75 gènes de virulence ciblés, en plus du gène *stx2*. D'ailleurs, ce variant du gène *stx2* reste encore inconnu et devrait être identifié rapidement grâce au séquençage total du génome en cours.

Pour terminer la caractérisation des souches, nous avons recherché si des souches isolées dans cette étude possédaient des capacités à former des biofilms, favorables à une meilleure survie dans l'environnement. Nous avons donc recherché la présence de gènes en association avec la production de biofilm et évalué la capacité de certaines souches environnementales à former des biofilms. Pour cela, 10 gènes de virulence associés à la formation de biofilms (*crl*, *ang43K12 (flu)*, *csgA*, *csgD*, *pgaA*, *fim1/H*, *fim9*, *ehaA*, *ehaB* et *ehaD*) ainsi que six gènes impliqués dans les mécanismes d'adhésion aux cellules: *lpfAO157*, *lpfAO26*, *lpfAO113*, *sab*, *iha* et *efal* ont été recherchés par PCR haut débit (données non présentées). Brièvement, les résultats ont montré qu'au moins cinq gènes sur 10 (*crl*, *csgD*, *fim1H*, *fim9* et *ehaB*) étaient présents chez toutes les souches qu'elles soient capables de former ou non des biofilms. L'expression de ces gènes est une notion à prendre en considération dans cette analyse et qui serait intéressante à étudier en ciblant les ARN issus de ces gènes par RT-PCR (Biscola *et al.*, 2011). En effet, dans une récente étude, Kim *et al.* (2013) ont observé que la détection des gènes *fim1/A/I/C/D/F/G/H* chez des souches O91:H21 n'était pas systématiquement associée à leur expression.

Nous avons terminé ce travail par l'étude du comportement des souches STEC par rapport à l'indicateur *E. coli* vis à vis de la cinétique de contamination et de décontamination d'huîtres. Aucune différence de cinétique n'a été mise en évidence entre les souches STEC et non STEC sélectionnées dans les conditions expérimentales mises en œuvre. Cette expérience a exposé des premiers éléments de réponse concernant l'influence de la présence des gènes *stx* chez *E. coli* sur la cinétique de contamination et de décontamination d'huîtres au contact de STEC. Beaucoup d'études se sont intéressées au comportement des *E. coli* dans les coquillages mais à notre connaissance aucune n'avait encore abordé l'influence de la présence de gènes de virulence tels que les gènes *stx* (Marino *et al.*, 2005, Love *et al.*, 2010, Chinnadurai *et al.*, 2014, Ottaviani *et al.*, 2015).

*E. coli* étant utilisé comme indicateur de contamination fécale pour la classification sanitaire des zones conchylicoles, il est important de connaître si le fait d'acquérir des gènes de virulence, est un critère à



prendre en compte dans l'élaboration des protocoles de décontamination des coquillages mis en place par la réglementation CE/854/2004.

En conclusion, cette étude sur la prévalence, la distribution et la virulence des souches STEC et EPEC présentes dans l'environnement littoral, au niveau des coquillages, des sédiments, de l'eau de mer et des exutoires de rivières a permis de constituer une collection de souches intéressantes pour évaluer le risque sanitaire lié à la présence de ces pathogènes dans l'environnement littoral.

Cette étude a permis d'avoir un premier aperçu de la présence de souches de *E. coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme. Néanmoins, il serait intéressant par rapport aux résultats obtenus, de poursuivre l'évaluation du pouvoir pathogène de certaines souches. Pour cela, l'étude concernant l'expression des gènes de virulence s'identifie comme une étape essentielle à l'évaluation du pouvoir pathogène des souches, car la présence des gènes dans les souches bactériennes ne signifie pas systématiquement que les gènes sont exprimés et une souche est vraiment pathogène sous réserve qu'elle exprime les gènes en protéines effectrices. En ce qui concerne l'expression des gènes *stx* plusieurs approches existent, orientées sur l'effet cytotoxique des toxines produites sur des cellules Véro en culture (cellule de rein de singe) (Staples *et al.*, 2012) ou bien sur la quantification des toxines produites par méthode ELISA (Yamasaki *et al.*, 2015). Plus généralement, d'autres moyens permettent de mettre en évidence la toxicité de certaines souches par l'évaluation de l'effet pathogène en produisant une infection à STEC sur des modèles vivants. Un des modèles vivants déjà utilisé pour l'étude de la toxicité des souches STEC est le modèle lapin (Shringi *et al.*, 2012). Cependant, la mise en œuvre de ce type de test étant assez lourde et contraignante (notion d'éthique), le modèle chenille (*Galleria mellonella*) apparaît récemment comme un modèle vivant d'invertébré simple et facile à mettre en œuvre, de plus en plus utilisé pour étudier la virulence de souches bactériennes (Kalkanci *et al.*, 2015).

L'émergence des méthodes de séquençage de nouvelles générations (NGS) apparaît comme un élément indispensable à mettre en œuvre au niveau de ces souches environnementales pour mieux connaître et prédire l'émergence de nouvelles souches pathogènes. Dans cet objectif, le projet H2020 Compare débuté au laboratoire en 2015, a pour objectif d'évaluer le pouvoir pathogène de certaines souches de la collection par le séquençage total du génome.

L'étude plus approfondie de certaines souches comme celles de sérotype O100 :HNM *stx2* dont le variant du gène reste encore non identifié à l'issue de ce travail, est une perspective très intéressante par rapport à l'étude de la diversité des souches isolées. L'identification d'un nouveau variant pourrait être une avancée concernant le gène *stx* à l'origine de la production de la Shiga-toxine de type 2.

Comprendre pourquoi certaines souches ont été isolées plus que d'autres est également un point très intéressant à développer suite à ce travail. La souche de sérotype O100:HNM reste encore le parfait exemple, avec sa prévalence très marquée au niveau des sites d'étude de Normandie et son isolement dans les trois types de coquillages (huîtres, moules et coques) à différentes périodes (Mai et Juin 2013 et Mars et Juin 2014). Il serait intéressant de voir si certaines souches ont la capacité de persister plus longtemps dans l'eau de mer que d'autres en évaluant sa persistance dans des microcosmes d'eau de mer sur une longue période.

Avec une autre approche, il serait intéressant d'identifier les sources potentielles de contamination liées à la présence de certaines souches dans les coquillages, le sédiment et les eaux de rivière en allant échantillonner plus en amont des exutoires des rivières ainsi qu'au niveau des cheptels présents au niveau des bassins versants.

*E. coli* est encore de nos jours l'indicateur de contamination fécale utilisé pour évaluer la qualité sanitaire de produits destinés à la consommation humaine. Ce travail a permis d'avoir un premier aperçu de la présence de *E. coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme avec le cas des STEC et des EPEC dans les compartiments soumis à des contaminations d'origine fécale. Suite à ce travail on pourrait également se demander ce qu'il en est des autres pathovars de *E. coli* dans l'environnement littoral. Connaître et évaluer la circulation et le pouvoir pathogène des *E. coli* présents au niveau des zones côtières ainsi que leur comportement dans le coquillage sont des enjeux majeurs pour la pérennité de certains usages littoraux tels que la conchyliculture, la pêche à pied et la baignade.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



## A

Afset, J. E., K. Bergh, and L. Bevanger. 2003. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*. 52 (11):1015-1019.

Afset, J. E., L. Bevanger, P. Romundstad, and K. Bergh. 2004. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*. 53 (11):1137-1144.

AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).

Ahmed, S. A., J. Awosika, C. Baldwin, K. A. Bishop-Lilly, B. Biswas, S. Broomall, P. S. G. Chain, O. Chertkov, O. Chokoshvili, S. Coyne, K. Davenport, J. C. Detter, W. Dorman, T. H. Erkkila, J. P. Folster, K. G. Frey, M. George, C. Gleasner, M. Henry, K. K. Hill, K. Hubbard, J. Insalaco, S. Johnson, A. Kitzmiller, M. Krepps, C.-C. Lo, L. Truong, L. A. McNew, T. Minogue, C. A. Munk, B. Osborne, M. Patel, K. G. Reitenga, C. N. Rosenzweig, A. Shea, X. Shen, N. Strockbine, C. Tarr, H. Teshima, E. van Gieson, K. Verratti, M. Wolcott, G. Xie, S. Sozhamannan, H. S. Gibbons, and C. Threat Characterization. 2012. Genomic Comparison of *Escherichia coli* O104:H4 Isolates from 2009 and 2011 Reveals Plasmid, and Prophage Heterogeneity, Including Shiga Toxin Encoding Phage *stx2*. *Plos One*. 7 (11): e48228.

Aidar-Ugrinovich, L., J. Blanco, M. Blanco, J. E. Blanco, L. Leomil, G. Dahbi, A. Mora, D. L. Onuma, W. D. Silveira, and A. F. Pestana de Castro. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 115 (3):297-306.

Akashi, S., K. Joh, A. Tsuji, H. Ito, H. Hoshi, T. Hayakawa, J. Ihara, T. Abe, M. Hatori, and T. Mori. 1994. A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *European Journal of Pediatrics*. 153 (9):650-655.

Alikhani, M. Y., A. Mirsalehian, and M. M. Aslani. 2006. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* 55 (9):1159-1163.

Allue-Guardia, A., A. Martinez-Castillo, and M. Muniesa. 2014. Persistence of Infectious Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages after Disinfection Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (7):2142-2149.

Amézquita-López, B. A., B. Quiñones, M. B. Cooley, J. León-Félix, N. Castro-del Campo, R. E. Mandrell, M. Jiménez, and C. Chaidez. 2012. Genotypic analyses of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. *Plos One*. 7 (12):e51565.

Amézquita-López, B. A., B. Quiñones, B. G. Lee, and C. Chaidez. 2014. Virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4:7.

Anderson, K. L., J. E. Whitlock, and V. J. Harwood. 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*.71 (6):3041-3048.

Anonyme. 2004. Regulation (EC) No 854/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption.

Anonyme. 2006. Directive 2006/7/CE du Parlement Européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade.

Anonyme. 2011. Commissariat général au développement durable Service de l'observation et des statistiques. Références. Environnement littoral et marin.

Appling, D., M. Y. Habteselassie, D. Radcliffe, and J. K. Bradshaw. 2013. Preliminary Study on the Effect of Wastewater Storage in Septic Tank on *E. coli* Concentration in Summer. *Water*. 5 (3):1141-1151.

Araujo, J. M., G. F. Tabarelli, K. R. S. Aranda, S. H. Fabbriotti, U. Fagundes-Neto, C. M. F. Mendes, and I. C. A. Scaletsky. 2007. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *Journal of Clinical Microbiology*.. 45 (10):3396-3399.

Araujo, S., I. S. Henriques, S. M. Leandro, A. Alves, A. Pereira, and A. Correia. 2014. Gulls identified as major source of fecal pollution in coastal waters: A microbial source tracking study. *Science. of the Total Environment*. 470:84-91.

Arbeloa, A., C. V. Oates, O. Marches, E. L. Hartland, and G. Frankel. 2011. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Type III Secretion Effector EspV Induces Radical Morphological Changes in Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*. 79 (3):1067-1076.

## **B**

Badea, L., S. Doughty, L. Nicholls, J. Sloan, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland. 2003. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 34 (5):205-215.

Badouei, M. A., M. Jajarmi, and A. Mirsalehian. 2015. Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. 38:15-20.

Bai, X., A. Zhao, R. Lan, Y. Xin, H. Xie, Q. Meng, D. Jin, B. Yu, H. Sun, S. Lu, J. Xu, and Y. Xiong. 2013. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Yaks (*Bos grunniens*) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *Plos One* 8 (6):e65537.

Barlow, R. S., R. G. Hirst, R. E. Norton, C. Ashhurst-Smith, and K. A. Bettelheim. 1999. A novel serotype of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) as a major pathogen in an outbreak of infantile diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* 48 (12):1123-1125.

Barni, S., D. Butti, F. Mori, N. Pucci, M. E. Rossi, A. Cianferoni, and E. Novembre. 2015. Azithromycin Is More Allergenic Than Clarithromycin in Children With Suspected Hypersensitivity

Reaction to Macrolides. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 25 (2):128-132.

Barret, A.S., Charron, M., Mariani-Kurkjian, P., Poignet-Leroux, B., Loukiadis, E., Harambat, J., Gouali, M., Gault, G., Le Hello, S., Bréchat, B., Servas, V., Faure, M., Godron, A., Rolland, P., Simoes, J., Vaillant, V., de Valk, H., Mailles, A. 2012. Outbreak of O157 *Escherichia coli* infections associated with consumption of fresh ground beef burgers, South West France, June 2012. Soumis à EuroSurveillance.

Barth, S., A. Tscholshiew, C. Menge, R. Weiss, G. Baljer, and R. Bauerfeind. 2007. Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 120 (7-8):307-316.

Bennani, M., S. Badri, T. Baibai, N. Oubrim, M. Hassar, N. Cohen, and H. Amarouch. 2011. First detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and coastal environments of Morocco. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 165 (1):290-299.

Bentancor, A., M. V. Rumi, M. V. Gentilini, C. Sardoy, K. Irino, A. Agostini, and A. Cataldi. 2007. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*. 267 (2):251-256.

Bergan, J., A. B. Dyve Lingelem, R. Simm, T. Skotland, and K. Sandvig. 2012. Shiga toxins. *Toxicon*. 60 (6):1085-1107.

Berger, C. N., V. F. Crepin, K. Baruch, A. Mousnier, I. Rosenshine, and G. Frankel. 2012. EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation. *mBio*. 3 (5).

Bertin, Y., K. Boukhors, N. Pradel, V. Livrelli, and C. Martin. 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (9):3060-3065.

Beutin, L., and P. Fach. 2014. Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonhuman Sources and Strain Typing. *Microbiology spectrum*. 2 (3):1-23.

Bibbal, D., E. Loukiadis, M. Kérourédan, C. Peytavin de Garam, F. Ferré, P. Cartier, E. Gay, E. Oswald, F. Auvray, and H. Brugère. 2014. Intimin gene (*eae*) subtype-based real-time PCR strategy for specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in cattle feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (3):1177-1184.

Bibbal, D., E. Loukiadis, M. Kerouredan, F. Ferre, F. Dilasser, C. P. de Garam, P. Cartier, E. Oswald, E. Gay, F. Auvray, and H. Brugere. 2015. Prevalence of Carriage of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among Slaughtered Adult Cattle in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (4):1397-1405.

Bielaszewska, M., M. Fell, L. Greune, R. Prager, A. Fruth, H. Tschape, M. A. Schmidt, and H. Karch. 2004. Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Non-O157 Serogroups. *Infection and Immunity*. 72 (3):1812-1816.

- Bielaszewska, M., R. Prager, R. Köck, A. Mellmann, W. Zhang, H. Tschäpe, P. I. Tarr, and H. Karch. 2007. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (10):3144-3150.
- Bielaszewska, M., A. Mellmann, S. Bletz, W. Zhang, R. Koeck, A. Kossow, R. Prager, A. Fruth, D. Orth-Hoeller, M. Marejkova, S. Morabito, A. Caprioli, D. Pierard, G. Smith, C. Jenkins, K. Curova, and H. Karch. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H11/H-: A New Virulent Clone Emerges in Europe. *Clinical Infectious Diseases* .56 (10):1373-1381.
- Biscola, F. T., C. M. Abe, and B. E. Guth. 2011. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Applied in Environmental Microbiology*. 77 (7):2201-2208.
- Blanco, M., N. L. Padola, A. Kruger, M. E. Sanz, J. E. Blanco, E. A. Gonzalez, G. Dahbi, A. Mora, M. I. Bernardez, A. I. Etcheverria, G. H. Arroyo, P. M. Lucchesi, A. E. Parma, and J. Blanco. 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*. 7 (4):269-276.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277 (5331):1453-1462.
- Blaustein, R. A., R. L. Hill, S. A. Micallef, D. R. Shelton, and Y. A. Pachepsky. 2016. Rainfall intensity effects on removal of fecal indicator bacteria from solid dairy manure applied over grass-covered soil. *Science. of the Total Environment*. 539:583-591.
- Blyton, M. D. J., H. Pi, B. Vangchhia, S. Abraham, D. J. Trott, J. R. Johnson, and D. M. Gordon. 2015. Genetic Structure and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and Cryptic Clades in Birds with Diverse Human Associations. *Applied and Environmental Microbiology*.81 (15):5123-5133.
- Bosch, X. 2000. Spain's *E. coli* outbreak highlights mistakes. *The Lancet*. 356 (9242):1665-1665.
- Brennan, F. P., V. O'Flaherty, G. Kramers, J. Grant, and K. G. Richards. 2010. Long-Term Persistence and Leaching of *Escherichia coli* in Temperate Maritime Soils. *Applied and Environmental Microbiology*.76 (5):1449-1455.
- Brett, K. N., V. Ramachandran, M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic. 2003. *stx1c* Is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*.. 41 (3):926-936.
- Brown, J. A., D. S. Hite, L. A. Gillim-Ross, H. F. Maguire, J. K. Bennett, J. J. Patterson, N. A. Comstock, A. K. Watkins, T. S. Ghosh, and R. L. Vogt. 2012. Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serotype O26:H11 Infection at a Child Care Center in Colorado. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 31 (4):379-383.
- Bruce, M. G., M. B. Curtis, M. M. Payne, R. K. Gautom, E. C. Thompson, A. L. Bennett, and J. I. Kobayashi. 2003. Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 in Clark County, Washington, August 1999. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 157 (10):1016-1021.



Brzuszkiewicz, E., A. Thürmer, J. Schuldes, A. Leimbach, H. Liesegang, F. D. Meyer, J. Boelter, H. Petersen, G. Gottschalk, and R. Daniel. 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology*. 193 (12):883-891.

Bugarel, M., L. Beutin, A. Martin, A. Gill, and P. Fach. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *International Journal of Food Microbiology*. 142 (3):318-329.

Burkhardt, W., and K. R. Calci. 2000. Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (4):1375-1378.

Buvens, G., and D. Pierard. 2012. Low prevalence of STEC autotransporter contributing to biofilm formation (Sab) in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolates of humans and raw meats. *European Journal of Clinical Microbiology. & Infectious Diseases*. 31 (7):1463-1465.

## C

Cadona, J. S., A. V. Bustamante, A. E. Parma, P. M. Lucchesi, and A. M. Sanso. 2013. Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw products in Argentina. *Letter in Applied Microbiology*. 56 (6):449-455.

Campos, C. J. A., S. R. Kershaw, and R. J. Lee. 2013. Environmental Influences on Faecal Indicator Organisms in Coastal Waters and Their Accumulation in Bivalve Shellfish. *Estuaries and Coasts*. 36 (4):834-853.

Carlos, C., M. M. Pires, N. C. Stoppe, E. M. Hachich, M. I. Z. Sato, T. A. T. Gomes, L. A. Amaral, and L. M. M. Ottoboni. 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *Bmc Microbiology*. 10 (161).

Carvalho, V. M., C. L. Gyles, K. Ziebell, M. A. Ribeiro, J. L. Catao-Dias, I. L. Sinhorini, J. Otman, R. Keller, L. R. Trabulsi, and A. F. P. de Castro. 2003. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (SPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (3):1225-1234.

Cergole-Novella, M. C., L. S. Nishimura, L. F. Dos Santos, K. Irino, T. M. Vaz, A. M. Bergamini, and B. E. Guth. 2007. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiology Letters*. 274 (2):329-334.

Chandran, A., and A. Mazumder. 2014. Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (6):1933-1940.

Chen, H. D., and G. Frankel. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 29 (1):83-98.

Ching, J. C. Y., N. L. Jones, P. J. M. Ceponis, M. A. Karmali, and P. M. Sherman. 2002. *Escherichia coli* Shiga-like toxins induce apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase via *in vitro* activation of caspases. *Infection and Immunity*. 70 (8):4669-4677.

- Chinnadurai, S., K. S. Mohamed, V. Venkatesan, J. Sharma, and V. Kripa. 2014. Depuration of bacterial populations in the Indian backwater oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston, 1916): Effects on surface and bottom held oyster. *Journal of Shellfish Research*. 33 (2):409-414.
- Chui, L., V. Li, P. Fach, S. Delannoy, K. Malejczyk, L. Patterson-Fortin, A. Poon, R. King, K. Simmonds, A. N. Scott, and M.-C. Lee. 2015. Molecular Profiling of *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Strains Isolated from Humans and Cattle in Alberta, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*. 53 (3):986-990.
- Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10):4555-4558.
- Clements, A., K. Smollett, S. F. Lee, E. L. Hartland, M. Lowe, and G. Frankel. 2011. EspG of enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* binds the Golgi matrix protein GM130 and disrupts the Golgi structure and function. *Cellular Microbiology*. 13 (9):1429-1439.
- Clermont, O., J. K. Christenson, E. Denamur, and D. M. Gordon. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*. 5 (1):58-65.
- Clermont, O., D. M. Gordon, S. Brisse, S. T. Walk, and E. Denamur. 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia coli* lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental Microbiology*. 13 (9):2468-2477.
- Cobeljic, M., B. Dimic, D. Opacic, Z. Lepsanovic, V. Stojanovic, and S. Lazic. 2005. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia. *Epidemiology and Infection*. 133 (2):359-366.
- Cook, K. L., A. M. P. Netthisinghe, and R. A. Gilfillen. 2014. Detection of Pathogens, Indicators, and Antibiotic Resistance Genes after Land Application of Poultry Litter. *Journal of Environmental Quality*. 43 (5):1546-1558.
- Cooley, M.B., B. Quiñones, D. Oryang, R. E. Mandrell, and L. Gorski. 2014. Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* at public access watershed sites in a California Central Coast agricultural region. *Frontier in Cellular Infection Microbiology*. 4:30.
- Coombes, B. K., M. E. Wickham, M. Mascarenhas, S. Gruenheid, B. B. Finlay, and M. A. Karmali. 2008. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (7):2153-2160.
- Cornick, N. A., A. F. Helgerson, V. Mai, J. M. Ritchie, and D. W. K. Acheson. 2006. In vivo transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (7):5086-5088.
- Cortes, C., R. De la Fuente, J. Blanco, M. Blanco, J. E. Blanco, G. Dhahi, A. Mora, P. Justel, A. Contreras, A. Sanchez, J. C. Corrales, and J. A. Orden. 2005. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Veterinary Microbiology*. 110 (1-2):67-76.
- Coura, F. M., A. P. Lage, and M. B. Heinemann. 2014. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in calves: an update. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 34 (9):811.

Couturier, M. R., B. Lee, N. Zelyas, and L. Chui. 2011. Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Detection in Stool Samples Screened for Viral Gastroenteritis in Alberta, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*. 49 (2):574-578.

Cowan, S. T. 1954. Abbreviation of bacterial generic names. *Science*. 120 (3131):1103-1104.

Cox, P., M. Griffith, M. Angles, D. Deere, and C. Ferguson. 2005. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (10):5929-5934.

Crampin, M., G. Willshaw, R. Hancock, T. Djuretic, C. Elstob, A. Rouse, T. Cheasty, and J. Stuart. 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *European Journal of Clinical Microbiology. & Infectious Diseases*. 18 (4):286-288.

Crowther, J., D. Kay, and M. D. Wyer. 2002. Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: relationships with land use and farming practices. *Water Research*. 36 (7):1725-1734.

Croxen, M. A., R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, and B. B. Finlay. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (4):822-880.

## **D**

Dallman, T., G. P. Smith, B. O'Brien, M. A. Chattaway, D. Finlay, K. A. Grant, and C. Jenkins. 2012. Characterization of a verocytotoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O111:H21 strain associated with a household outbreak in Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (12):4116-4119.

Darcan, C., R. Ozkanca, O. Idil, and K. P. Flint. 2009. Viable but Non-Culturable State (VBNC) of *Escherichia coli* Related to EnvZ under the Effect of pH, Starvation and Osmotic Stress in Sea Water. *Polish Journal of Microbiolog*. 58 (4):307-317.

De Abreu Corrêa, A., J. D. Alabarnaz, V. Morescoa, C. R. Poli, A. L. Teixeira, C. M. Oliveira Simõesb, C. R. Monte Barardia. 2007. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research*. 63 (5):479-489.

De la Fuente, R., S. Garcia, J. A. Orden, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, R. Diez, and D. Cid. 2002. Prevalence and characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy sheep and goats. *American Journal of Veterinary Research*. 63 (2):262-266.

Delannoy, S., L. Beutin, and P. Fach. 2013. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 51 (10):3257-3262.

Delannoy, S., P. Mariani-Kurkdjian, S. Bonacorsi, S. Liguori, and P. Fach. 2015. Characteristics of emerging human-pathogenic *Escherichia coli* O26:H11 isolated in France between 2010 and 2013 and carrying the stx2d gene only. *Journal of Clinical Microbiology*. 53 (2) 486-492.

- Derolez, V., D. Soudant, A. Fiandrino, L. Cesmat, and O. Serais. 2013. Impact of weather conditions on *Escherichia coli* accumulation in oysters of the Thau lagoon (the Mediterranean, France). *Journal of Applied Microbiology*. 114 (2):516-525.
- Diaz-Sanchez, S., S. Sanchez, M. Sanchez, S. Herrera-Leon, I. Hanning, and D. Vidal. 2012. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in game meat and ready-to-eat meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 160 (2):179-182.
- Dipineto, L., A. Gargiulo, T. P. Russo, L. M. D. L. Bosse, L. Borrelli, D. d'Ovidio, M. Sensale, L. F. Menne, and A. Fioretti. 2010. Survey of *Escherichia coli* O157 in Captive Frogs. *Journal of Wildlife Diseases*. 46 (3):944-946.
- Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch, and J. Hacker. 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *Journal of Bacteriology*. 185 (6):1831-1840.
- Dobrindt, U. 2005. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 295 (6-7):357-371.
- Dobrindt, U., M. G. Chowdary, G. Krumbholz, and J. Hacker. 2010. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Medical Microbiology and Immunology*. 199 (3):145-154.
- Doughty, S., J. Sloan, V. Bennett-Wood, M. Robertson, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland. 2002. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 70 (12):6761-6769.
- Drouaz, N., J. Schaeffer, T. Farkas, J. Le Pendu, and F. S. Le Guyader. 2015. Tulane Virus as a Potential Surrogate To Mimic Norovirus Behavior in Oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (15):5249-5256.
- Ducluzeau, R., and P. Raibaud. 1985. Microbial ecology of the digestive system. *Agressologie: revue internationale de physio-biologie et de pharmacologie appliquées aux effets de l'agression*. 26 (2):161-163.
- Dumke, R., U. Schröter-Bobsin, E. Jacobs, and I. Röske. 2006. Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Letter in Applied Microbiology*. 42 (1):48-53.
- Dutta, S., G. P. Pazhani, J. P. Nataro, and T. Ramamurthy. 2015. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: Evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. *International Journal of Medical Microbiology* 305 (1):47-54.
- Dutta, T. K., P. Roychoudhury, S. Bandyopadhyay, S. A. Wani, and I. Hussain. 2011. Detection & characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) & enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in poultry birds with diarrhoea. *Indian Journal of Medical Research*. 133 (5):541-545.
- Dziva, F., A. Mahajan, P. Cameron, C. Currie, I. J. McKendrick, T. S. Wallis, D. G. Smith, and M. P. Stevens. 2007. EspP, a Type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*. 271 (2):258-264.

## **E**

ECDC European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. Annual epidemiological report 2014 émerging and vector-borne diseases. Stockholm.

Echtenkamp, F., W. Deng, M. E. Wickham, A. Vazquez, J. L. Puente, A. Thanabalasuriar, S. Gruenheid, B. B. Finlay, and P. R. Hardwidge. 2008. Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. 281 (1):98-107.

EEA European Environment Agency. 2015. Quality of bathing water - 2014 bathing season. Reports.

EFSA European Food Safety Authority. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2013. Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*. 11(4):3138.

Escobar-Páramo, P., O. Clermont, A. B. Blanc-Potard, H. Bui, C. Le Bouguéneç, and E. Denamur. 2004. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*. 21 (6): 1085-1094

Escobar-Páramo, P., A. Le Menac'h, T. Le Gall, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, D. Skurnik, and E. Denamur. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*. 8 (11):1975-1984.

Espie, E., F. Grimont, V. Vaillant, M. P. Montet, I. Carle, C. Bavai, H. de Valk, and C. Vernozy-Rozand. 2006a. O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clinical Microbiology and Infection*. 12 (10):992-998.

Espie, E., V. Vaillant, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, R. Martin-Schaller, H. De Valk, and C. Vernozy-Rozand. 2006b. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats cheese. *Epidemiology and Infection*. 134 (1):143-146.

Espié, E., F. Grimont, P. Mariani-Kurkdjian, P. Bouvet, S. Haeghebaert, I. Filliol, C. Loirat, B. Decludt, N. N. Minh, V. Vaillant, and H. de Valk. 2008. Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996-2006. *Pediatric Infectious Disease Journal*. J 27 (7):595-601.

Estrada-Garcia, T., C. Lopez-Saucedo, R. Thompson-Bonilla, M. Abonce, D. Lopez-Hernandez, J. I. Santos, J. L. Rosado, H. L. DuPont, and K. Z. Long. 2009. Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic E-coli with Acute Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 47 (1):93-98.

## **F**

Farfan, M. J., and A. G. Torres. 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity*. 80 (3):903-913.

Farooq, S., I. Hussain, M. A. Mir, M. A. Bhat, and S. A. Wani. 2009. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Letter in Applied Microbiology*. 48 (6):692-697.

- Farrokh, C., K. Jordan, F. Auvray, K. Glass, H. Oppegaard, S. Raynaud, D. Thevenot, R. Condron, K. De Reu, A. Govaris, K. Heggum, M. Heyndrickx, J. Hummerjohann, D. Lindsay, S. Mischczycha, S. Moussiégt, K. Verstraete, and O. Cerf. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*. 162 (2):190-212.
- Favier, G. I., C. Lucero Estrada, T. I. Cortinas, and M. E. Escudero. 2014. Detection and Characterization of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, and *Yersinia* Strains from Human, Animal, and Food Samples in San Luis, Argentina. *International Journal of Microbiology*. 2014:284649-284649.
- Feldman, K. A., J. C. Mohle-Boetani, J. Ward, K. Furst, S. L. Abbott, D. V. Ferrero, A. Olsen, and S. B. Werner. 2002. A cluster of *Escherichia coli* O157: Nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. *Public Health Reports*. 117 (4):380-385.
- Feng, P. C., T. Councell, C. Keys, and S. R. Monday. 2011. Virulence characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from wholesale produce. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (1):343-345.
- Feng, P. C. H., and S. Reddy. 2013. Prevalences of Shiga Toxin Subtypes and Selected Other Virulence Factors among Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Fresh Produce. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (22):6917-6923.
- Ferens, W. A., and C. J. Hovde. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens Disease*. 8 (4):465-487.
- Fitzhenry, R. J., D. J. Pickard, E. L. Hartland, S. Reece, G. Dougan, A. D. Phillips, and G. Frankel. 2002. Intimin type influences the site of human intestinal mucosa colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Gut*. 50 (2):180-185.
- Frank, C., D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M. J. Kemper, P. Follin, L. Müller, L. A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, G. Krause, and H. I. Team. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England Journal of Medicine*. 365 (19):1771-1780.
- Franzolin, M. R., R. C. B. Alves, R. Keller, T. A. T. Gomes, L. Beutin, M. L. Barreto, C. Milroy, A. Strina, H. Ribeiro, and L. R. Trabulsi. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 100 (4):359-363.
- Fratamico, P. M., L. K. Bagi, E. J. Bush, and B. T. Solow. 2004. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (12):7173-7178.
- Fremaux B., P.-C. C., Delignette-Muller M.L., Dothol M., Vernozy-Rozand C. 2007. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. *Letter in Applied Microbiology*. 45 (1):55-61.
- Fremaux, B., C. Prigent-Combaret, L. Beutin, A. Gleizal, D. Trevisan, P. Quetin, L. Jocteur-Monrozier, and C. Rozand. 2010. Survival and spread of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in alpine pasture grasslands. *Journal of Applied Microbiology*. 108 (4):1332-1343.

Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Diseases*. 185 (1):74-84.

Friedrich, A. W., J. Borell, M. Bielaszewska, A. Fruth, H. Tschäpe, and H. Karch. 2003. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (6):2448-2453.

Friedrich, A. W., W. Zhang, M. Bielaszewska, A. Mellmann, R. Köck, A. Fruth, H. Tschäpe, and H. Karch. 2007. Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clinical Infectious Diseases*. 45 (1):39-45.

Fröhlicher, E., G. Krause, C. Zweifel, L. Beutin, and R. Stephan. 2008. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiology*. 8:144.

Fuller, C. A., C. A. Pellino, M. J. Flagler, J. E. Strasser, and A. A. Weiss. 2011. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infection and Immunity*. 79 (3):1329-1337.

## **G**

Galli, L., A. G. Torres, and M. Rivas. 2010. Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*. 308 (2):123-129.

Gao, X., X. Wang, T. H. Pham, L. A. Feuerbacher, M.-L. Lubos, M. Huang, R. Olsen, A. Mushegian, C. Slawson, and P. R. Hardwidge. 2013. NleB, a Bacterial Effector with Glycosyltransferase Activity, Targets GADPH Function to Inhibit NF-kappa B Activation. *Cell Host & Microbe*. 13 (1):87-99.

García-Aljaro, C., X. Bonjoch, and A. R. Blanch. 2005. Combined use of an immunomagnetic separation method and immunoblotting for the enumeration and isolation of *Escherichia coli* O157 in wastewaters. *Journal in Applied Microbiology*. 98 (3):589-597.

Garcia-Aljaro, C., E. Moreno, A. Andreu, G. Prats, and A. R. Blanch. 2009. Phylogroups, virulence determinants and antimicrobial resistance in *stx*(2) gene-carrying *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *Research in Microbiology*. 160 (8):585-591.

Garmendia, J., G. Frankel, and V. F. Crepin. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*. 73 (5):2573-2585.

Garrido, P., M. Blanco, M. Moreno-Paz, C. Briones, G. Dahbi, J. Blanco, and V. Parro. 2006. STEC-EPEC oligonucléotide microarray: un nouvel outil pour le typage des variantes génétiques de l'îlot de pathogénicité LEE des producteurs de shigatoxines *Escherichia coli* humaine et animale (STEC) et *E. coli* entéropathogènes (EPEC) souches. *Clinical Chemistry*. 52 (2):192-201.

Gill, A., and D. Oudit. 2015. Enumeration of *Escherichia coli* O157 in Outbreak-Associated Gouda Cheese Made with Raw Milk. *Journal of Food Protection*. 78 (9):1733-1737.

Girard, F., I. Batisson, G. M. Frankel, J. Harel, and J. M. Fairbrother. 2005. Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: Role of intimin and Tir in adherence. *Infection and Immunity*. 73 (9):6005-6016.

- Girardeau, J. P., A. Dalmasso, Y. Bertin, C. Ducrot, S. Bord, V. Livrelli, C. Vernozy-Rozand, and C. Martin. 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (12):6098-6107.
- Gophna, U., T. A. Oelschlaeger, J. Hacker, and E. Z. Ron. 2001. Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiology Letters*. 196 (1):57-60.
- Gordon, D. M., and A. Cowling. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*. 149 (12):3575-3586.
- Gordon, D. M., C. L. O'Brien, and P. Pavli. 2015. *Escherichia coli* diversity in the lower intestinal tract of humans. *Environmental Microbiology Reports*. 7 (4):642-648.
- Goto, D. K., and T. Yan. 2011. Effects of Land Uses on Fecal Indicator Bacteria in the Water and Soil of a Tropical Watershed. *Microbes and Environments*. 26 (3):254-260.
- Gourmelon, M., M. Montet, S. Lozach, C. Le Mennec, M. Pommepuy, L. Beutin, and C. Vernozy-Rozand. 2006. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *Journal of Applied Microbiology*. 100 (1):85-97.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, S. Mieszkin, R. Marti, N. Wéry, E. Jardé, M. Derrien, A. Jadas-Hécart, P. Y. Communal, A. Jaffrezic, and A. M. Pourcher. 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Research*. 44 (16):4812-4824.
- Gosling. 2015. How bivalves feed. in: *Marine Bivalve molluscs*, second edition. WILEY Blackwell Publishing ISBN 9780470674949, pp 99-144.
- Grau-Leal, F., P. Quirós, A. Martínez-Castillo, and M. Muniesa. 2015. Free Shiga toxin 1-encoding bacteriophages are less prevalent than Shiga toxin 2 phages in extraintestinal environments. *Environmental Microbiology*. 17 (11): 4790-4801.
- Grif, K., D. Orth, I. Lederer, C. Berghold, S. Roedl, C. J. Mache, M. P. Dierich, and R. Würzner. 2005. Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 24 (4):268-271.
- Gruenheid, S., I. Sekirov, N. A. Thomas, W. Y. Deng, P. O'Donnell, D. Goode, Y. L. Li, E. A. Frey, N. F. Brown, P. Metalnikov, T. Pawson, K. Ashman, and B. B. Finlay. 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Molecular Microbiology*. 51 (5):1233-1249.
- Grys, T. E., M. B. Siegel, W. W. Lathem, and R. A. Welch. 2005. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infection and Immunity*. 73 (3): 1295-1303.
- Guh, A., Q. Phan, R. Nelson, K. Purviance, E. Milardo, S. Kinney, P. Mshar, W. Kasacek, and M. Carter. 2010. Outbreak of *Escherichia coli* O157 Associated with Raw Milk, Connecticut, 2008. *Clinical Infectious Diseases*. 51 (12):1411-1417.



Guinée, P. A. M., W. H. Jansen, T. Wadström, and R. Sellwood. 1981. *Escherichia coli* Associated with Neonatal Diarrhoea in Piglets and Calves. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. 13:126-162.

Guyader (Le), F. S. L., H. Maalouf, and J. L. Pendu. 2013. Huître et norovirus : une affinité particulière? *Virologie*. 17 (4):253-263.

Guyon R., D. F., Collobert J. F., Foret J., Goubert C., Mariau V., Malas J. P. 2000. Detection of S toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). *Sciences des Aliments*. 20:457-466.

Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : An overview. *Journal of Animal Science*. 85 (13): 45-62.

## H

Hamilton, M. J., A. Z. Hadi, J. F. Griffith, S. Ishii, and M. J. Sadowsky. 2010. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water Research*. 44 (18): 5463-5473.

Harrington, S. M., E. G. Dudley, and J. P. Nataro. 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiology Letters*. 254:12-18.

Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP. 2009. The Pic Protease of Enteroaggregative *Escherichia coli* Promotes Intestinal Colonization and Growth in the Presence of Mucin. *Infection and Immunity*. 77:2465-2473.

Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori, and H. Shinagawa. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Research*. 8 (1):11-22.

Heimer, S. R., R. A. Welch, N. T. Perna, G. Posfai, P. S. Evans, J. B. Kaper, F. R. Blattner, and H. L. T. Mobley. 2002. Urease of enterohemorrhagic *Escherichia coli* : Evidence for regulation by Fur and a trans-acting factor. *Infection and Immunity*. 70 (2):1027-1031.

Herold, S., H. Karch, and H. Schmidt. 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages - genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology*. 294 (2-3):115-121.

Heuvelink, A. E., C. van Heerwaarden, J. T. Zwartkruis-Nahuis, R. van Oosterom, K. Edink, Y. T. van Duynhoven, and E. de Boer. 2002. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiology and Infection*. 129 (2):295-302.

Hodgson, A., E. M. Wier, K. Fu, X. Sun, H. Yu, W. Zheng, H. P. Sham, K. Johnson, S. Bailey, B. A. Vallance, and F. Wan. 2015. Metalloprotease NleC Suppresses Host NF-kappa B/Inflammatory Responses by Cleaving p65 and Interfering with the p65/RPS3 Interaction. *Plos Pathogens*. 11 (3).

Holden, N. J., F. Wright, K. MacKenzie, J. Marshall, S. Mitchell, A. Mahajan, R. Wheatley, and T. J. Daniell. 2014. Prevalence and diversity of *Escherichia coli* isolated from a barley trial supplemented with bulky organic soil amendments: green compost and bovine slurry. *Letters in Applied Microbiology*. 58 (3):205-212.

Holmes, A., C. S. L. Arlehamn, D. Wang, T. J. Mitchell, T. J. Evans, and A. J. Roe. 2012. Expression and Regulation of the *Escherichia coli* O157:H7 Effector Proteins NleH1 and NleH2. *Plos One*. 7 (3): e33408.

Hrudey, S. E., P. Payment, P. M. Huck, R. W. Gillham, and E. J. Hrudey. 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science and Technology*. 47 (3):7-14.

Huang, D. B., A. Mohanty, H. L. DuPont, P. C. Okhuysen, and T. Chiang. 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology* 55 (10):1303-1311.

## **I**

Ihekweazu, C., M. Barlow, S. Roberts, H. Christensen, B. Guttridge, D. Lewis, and S. Paynter. 2006. Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles ; European communicable disease bulletin*. 11 (4):128-130.

Imamovic, L., E. Ballesté, J. Jofre, and M. Muniesa. 2010a. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (17):5693-5701.

Imamovic, L., R. Tozzoli, V. Michelacci, F. Minelli, M. L. Marziano, A. Caprioli, and S. Morabito. 2010b. OI-57, a Genomic Island of *Escherichia coli* O157, Is Present in Other Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *E. coli* Associated with Severe Human Disease. *Infection and Immunity*. 78 (11):4697-4704.

Imamovic, L., and M. Muniesa. 2011. Quantification and evaluation of infectivity of Shiga toxin-encoding bacteriophages in beef and salad. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (10):3536-3540.

InVS Institut de Veille Sanitaire. 2013. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire.

Iritani, N., A. Kaida, N. Abe, H. Kubo, J.-I. Sekiguchi, S. P. Yamamoto, K. Goto, T. Tanaka, and M. Noda. 2014. Detection and Genetic Characterization of Human Enteric Viruses in Oyster-Associated Gastroenteritis Outbreaks Between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *Journal of Medical Virology*. 86 (12):2019-2025.

Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hicks, and M. J. Sadowsky. 2006. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (1):612-621.

Ishii, S., K. P. Meyer, and M. J. Sadowsky. 2007. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (18):5703-5710.

Ishii, S., and M. Sadowsky 2008. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes and Environment*. 23 (2):101-108.

ISO 7899-1:1998. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 1: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour les eaux de surface et résiduaires.

ISO 9308-3:1998. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 3: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour la recherche et le dénombrement des *E. coli* dans les eaux de surface et résiduaires.

ISO 7899-2:2000. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2: Méthode par filtration sur membrane.

ISO 16654:2001. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

ISO 6579:2002. Microbiologie des aliments -- Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella spp.*

ISO TS-16649-3:2005. Microbiologie des aliments -- Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* beta-glucuronidase positive -- Partie 3: Technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3 beta-D-glucuronate.

ISO 10272-1:2006. Microbiologie des aliments -- Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter spp.* - Partie 1: Méthode de recherche

ISO 8199 :2008. Qualité de l'eau - Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.

ISO 9308-2:2012. Qualité de l'eau - Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 2: Méthode du nombre le plus probable.

ISO TS-13136:2012. Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of SDhiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Iwamoto, M., T. Ayers, B. E. Mahon, and D. L. Swerdlow. 2010. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 23 (2):399-411.

## ↓

Jaffrezic, A., E. Jardé, A. M. Pourcher, M. Gourmelon, M. P. Caprais, D. Heddadj, P. Cottinet, M. Bilal, M. Derrien, R. Marti, and S. Mieszkin. 2011. Microbial and chemical markers: runoff transfer in animal manure-amended soils. *Journal of Environmental Quality*. 40 (3):959-968.

Jaureguy F., L. Landraud, V. Passet, L. Diancourt, E. Frapy, G. Guigon, E. Carbonnelle, O. Lortholary, O. Clermont, E. Denamu, B. Picard, X. Nassif, and S. Brisse. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*. 9 (1).

Jenkins, C., N. T. Perry, T. Cheasty, D. J. Shaw, G. Frankel, G. Dougan, G. J. Gunn, H. R. Smith, A. W. Paton, and J. C. Paton. 2003. Distribution of the *saa* Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (4): 1775-1778

Jenkins, C., T. J. Dallman, N. Launders, C. Willis, L. Byrne, F. Jorgensen, M. Eppinger, G. K. Adak, H. Aird, N. Elviss, K. A. Grant, D. Morgan, and J. McLauchlin. 2015. Public Health Investigation of Two Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Associated with Consumption of Watercress. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (12):3946-3952.

Jensen, A. N., C. Storm, A. Forslund, D. L. Baggesen, and A. Dalsgaard. 2013. *Escherichia coli* Contamination of Lettuce Grown in Soils Amended with Animal Slurry. *Journal of Food Protection*. 76 (7):1137-1144.

Johannessen, G. S., R. B. Froseth, L. Solemdal, J. Jarp, Y. Wasteson, and L. M. Rorvik. 2004. Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic Iceberg lettuce. *Journal of Applied Microbiology*. 96 (4):787-794.

Johnson, T. J., and L. K. Nolan. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73 (4):750-774.

Jokinen C., T. Edge, S. Ho, W. Koning, C. Laing, W. Mauro, D. Medeiros, J. Miller, W. Robertson, E. Taboada, J.E. Thomas, E. Topp, K. Ziebell, V.P.J. Gannon. 2011. Molecular subtypes of *Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 isolated from faecal and surface water samples in the Oldman River watershed, Alberta, Canada. *Water Research*. 45 (3):1247-1257.

Joris, M.-A., K. Verstraete, K. De Reu, and L. De Zutter. 2013. Longitudinal Follow-Up of the Persistence and Dissemination of EHEC on Cattle Farms in Belgium. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10 (4):295-301.

Jozic, S., M. Solic, and N. Krstulovic. 2012. The accumulation of the indicator bacteria *Escherichia coli* in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*) under experimental conditions. *Acta Adriatica*. 53 (3):353-361.

Ju, W., J. Shen, M. Toro, S. Zhao, and J. Meng. 2013. Distribution of Pathogenicity Islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a High-Pathogenicity Island in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (11):3406-3412.

## K

Kalkanci, A., A. A. Fouad, M. Erdogan, A. Altay, Z. Aliyeva, G. Bozdayi, and K. Caglar. 2015. Using *Galleria mellonella* as an In Vivo Model to Study the Virulence of Some Bacterial and Fungal Agents. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 49 (3):366-376.

Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature. Reviews Microbiology*. 2 (2):123-140.

Karch, H., P. I. Tarr, and M. Bielaszewska. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. 295 (6-7):405-418.

Karmali, M. A., M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, and J. B. Kaper. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (11):4930-4940.

- Karmali, M. A., V. Gannon, and J. M. Sargeant. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*. 140 (3-4):360-370.
- Kasai, H., K. Kawana, M. Labaiden, K. Namba, and M. Yoshimizu. 2011. Elimination of *Escherichia coli* from oysters using electrolyzed seawater. *Aquaculture*. 319 (3-4):315-318.
- Kauffmann, F. 1947. The serology of the coli group. *Journal of Immunology*. 57 (1):71-100.
- Kaufmann, M., C. Zweifel, M. Blanco, J. E. Blanco, J. Blanco, L. Beutin, and R. Stephan. 2006. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *Journal of Food Protection*. 69 (2):260-266.
- Kern Benaibout M. 2006. *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme: Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'Homme par la contamination de l'environnement. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ó ENVT.
- Khan, A., S. Yamasaki, T. Sato, T. Ramamurthy, A. Pal, S. Datta, N. R. Chowdhury, S. C. Das, A. Sikdar, T. Tsukamoto, S. K. Bhattacharya, Y. Takeda, and G. B. Nair. 2002. Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 8 (1):54-62.
- Kim, J.-B., K.-H. Oh, M.-S. Park, and S.-H. Cho. 2013. Repression of Type-1 Fimbriae in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O91:H21 Isolated from Asymptomatic Human Carriers in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23 (5):731-737.
- King, L. A., A. Mailles, P. Mariani-Kurkdjian, C. Vernozy-Rozand, M. P. Montet, F. Grimont, N. Pihier, H. Devalk, F. Perret, E. Bingen, E. Espié, and V. Vaillant. 2009. Community-wide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with consumption of frozen beef burgers. *Epidemiology and Infection*. 137 (6):889-896.
- King, L. A., I. Filliol-Toutain, P. Mariani-Kurkidjian, V. Vaillant, C. Vernozy-Rozand, S. Ganet, N. Pihier, P. Niaudet, and H. de Valk. 2010. Family Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O123:H6, France, 2009. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 16(9): 1491-1493.
- King, L.A., V. Vaillant, S. Haeghebaert, Chaud, P., Mariani Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Weill, F.X., Bingen, E., Thevenot, D., Mace, M., Gouali, M., Pihier, N., Callon, H., de Valk, E. 2012. Épidémie d'infection à *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine O157:(H7) fermentant le sorbitol liée à la consommation de viande hachée de boeuf. France - Juin-juillet 2011. Rapport d'investigation de l'Institut de veille sanitaire. 48 pp. <http://www.invs.sante.fr>
- King, L. A., F. Nogareda, F. X. Weill, P. Mariani-Kurkdjian, E. Loukiadis, G. Gault, N. Jourdan-DaSilva, E. Bingen, M. Macé, D. Thevenot, N. Ong, C. Castor, H. Noël, D. Van Cauteren, M. Charron, V. Vaillant, B. Aldabe, V. Goulet, G. Delmas, E. Couturier, Y. Le Strat, C. Combe, Y. Delmas, F. Terrier, B. Vendrely, P. Rolland, and H. de Valk. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clinical Infectious Diseases*. 54 (11):1588-1594.
- King, L. A., E. Loukiadis, P. Mariani-Kurkdjian, S. Haeghebaert, F. X. Weill, C. Baliere, S. Ganet, M. Gouali, V. Vaillant, N. Pihier, H. Callon, R. Novo, O. Gaillot, D. Thevenot-Sergentet, E. Bingen, P. Chaud, and H. de Valk. 2014. Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli*

O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection*. 20 (12):O1136-1144.

Klein, M., L. Brown, N. J. Ashbolt, R. M. Stuetz, and D. J. Roser. 2011. Inactivation of indicators and pathogens in cattle feedlot manures and compost as determined by molecular and culture assays. *FEMS Microbiology Ecology*. 77 (1):200-210.

Kobayashi, H., J. Shimada, M. Nakazawa, T. Morozumi, T. Pohjanvirta, S. Pelkonen, and K. Yamamoto. 2001. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (1):484-489.

Kobayashi, N., K. Lee, A. Yamazaki, S. Saito, I. Furukawa, T. Kono, E. Maeda, J. Isobe, Y. Sugita-Konishi, and Y. Hara-Kudo. 2013. Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 51 (12):4022-4028.

Krueger, A., P. M. A. Lucchesi, and A. E. Parma. 2011. Verotoxins in Bovine and Meat Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Isolates: Type, Number of Variants, and Relationship to Cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (1):73-79.

Kumar, H. S., I. Karunasagar, T. Teizou, K. Shima, and S. Yamasaki. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. *FEMS Microbiology Letters*. 233 (1):173-178.

Kumar, A., N. Taneja, Y. Kumar, and M. Sharma. 2012. Detection of Shiga toxin variants among Shiga toxin-forming *Escherichia coli* isolates from animal stool, meat and human stool samples in India. *Journal of Applied Microbiology*. 113 (5):1208-1216.

Kumar, A., N. Taneja, B. Bharti, and M. Sharma. 2014. Characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhoea & haemolytic uremic syndrome in north India. *Indian Journal of Medical Research*. 140:778-784.

Kwon, D., C. Choi, T. Jung, H. K. Chung, J. P. Kim, S. S. Bae, W. S. Cho, J. Kim, and C. Chae. 2002. Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and STx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea. *Veterinary Record*. 150 (2):35-37.

## L

Lahti, E., M. Eklund, P. Ruutu, A. Siitonen, L. Rantala, P. Nuorti, and T. Honkanen-Buzalski. 2002. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 21 (3):189-195.

Lanier, W. A., J. M. Hall, R. K. Herlihy, R. T. Rolfs, J. M. Wagner, L. H. Smith, and E. K. Hyytiä-Trees. 2011. Outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Rodeo Attendance, Utah and Idaho, 2009. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8 (10).

LeJeune, J., J. Homan, G. Linz, D. L. Pearl. 2008. Role of the European Starling in the Transmission of *E. coli* O157 on Dairy Farms. Proc. 23rd Vertebr. Pest Conf. Published at Univ. of Calif., Davis. Pp. 31-34

- Leyton, D. L., J. Sloan, R. E. Hill, S. Doughty, and E. L. Hartland. 2003. Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* : Similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. *Infection and Immunity*. 71 (11):6307-6319.
- Li, L., N. Mendis, H. Trigui, J. D. Oliver, and S. P. Faucher. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 5 (258).
- Lienemann, T., T. Pitkänen, J. Antikainen, E. Mölsä, I. Miettinen, K. Haukka, M. Vaara, and A. Siitonen. 2011. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O100:H<sup>-</sup>: *stx2e* in drinking water contaminated by waste water in Finland. *Current Microbiology*. 62 (4):1239-1244.
- Long, T. M., S. Nisa, M. S. Donnenberg, and B. A. Hassel. 2014. Enteropathogenic *Escherichia coli* Inhibits Type I Interferon- and RNase L-Mediated Host Defense To Disrupt Intestinal Epithelial Cell Barrier Function. *Infection and Immunity*. 82 (7):2802-2814.
- Lorenz, S. C., I. Son, A. Maounounen-Laasri, A. Lin, M. Fischer, and J. A. Kase. 2013. Prevalence of hemolysin genes and comparison of *ehxA* subtype patterns in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and non-STEC strains from clinical, food, and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (20):6301-6311.
- Loukiadis, E., M. Kérouredan, L. Beutin, E. Oswald, and H. Brugère. 2006. Characterization of Shiga toxin gene (*stx*)-positive and intimin gene (*eae*)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (5):3245-3251.
- Loury, P., F. S. le Guyader, J. C. le Saux, K. Ambert-Balay, P. Parrot, and B. Hubert. 2015. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012. *Epidemiology and Infection*. 143 (12):2486-2493.
- Love, D. C., G. L. Lovelace, and M. D. Sobsey. 2010. Removal of *Escherichia coli* , *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercenaria mercenaria*) by depuration. *International Journal of Food Microbiology*. 143 (3):211-217.
- Lu, Y., S. Iyoda, H. Satou, H. Satou, K. Itoh, T. Saitoh, and H. Watanabe. 2006. A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli* . *Infection and Immunity*. 74 (10):5747-5755.
- Lueddeke, F., S. Hess, C. Gallert, J. Winter, H. Guede, and H. Loeffler. 2015. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research*. 69:243-251.
- Lukjancenko, O., T. M. Wassenaar, and D. W. Ussery. 2010. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial Ecology*. 60 (4):708-720.
- Luna, G. M., C. Vignaroli, C. Rinaldi, A. Pusceddu, L. Nicoletti, M. Gabellini, R. Danovaro, and F. Biavasco. 2010. Extraintestinal *Escherichia coli* carrying virulence genes in coastal marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (17):5659-5668.

## M

- Ma, J., A. M. Ibekwe, D. E. Crowley, and C.-H. Yang. 2014. Persistence of *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains in agricultural soils. *Science of the Total Environment*. 490:822-829.
- Makino, S., H. Asakura, T. Shirahata, T. Ikeda, K. Takeshi, K. Arai, M. Nagasawa, T. Abe, and T. Sadamoto. 1999. Molecular epidemiological study of a mass outbreak caused by enteropathogenic *Escherichia coli* O157 :H45. *Microbiology and Immunology*. 43 (4):381-384.
- Malik, A., I. Toth, L. Beutin, H. Schmidt, B. Taminiou, M. A. Dow, S. Morabito, E. Oswald, J. Mainild, and B. Nagy. 2006. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*(+) *Escherichia coli* from weaned pigs. *Veterinary Microbiology*.. 114 (1-2):82-93.
- Manna, S. K., R. Das, and C. Manna. 2008. Microbiological quality of finfish and shellfish with special reference to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Journal of Food Science*. 73 (6):M283-286.
- Marches, O., V. Covarelli, S. Dahan, C. Cougoule, P. Bhatta, G. Frankel, and E. Caron. 2008. EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cellular Microbiology*. 10 (5):1104-1115.
- Mariani-Kurkdjian, P., C. Lemaître, P. Bidet, D. Perez, L. Boggini, T. Kwon, and S. Bonacorsi. 2014. Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. *New Microbes New Infections*. 2 (4):127-131.
- Marin, I., P. Goni, A. M. Lasheras, and M. P. Ormad. 2015. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecological Engineering*. 74:28-32.
- Marino, A., L. Lombardo, C. Fiorentino, B. Orlandella, L. Monticelli, A. Nostro, and V. Alonzo. 2005. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal of Food Microbiology*. 99 (3):281-286.
- Marti, R., P. Dabert, C. Ziebal, and A.-M. Pourcher. 2010. Evaluation of *Lactobacillus sobrius*/*L. amylovorus* as a New Microbial Marker of Pig Manure. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (5):1456-1461.
- Martin, A., and L. Beutin. 2011. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*. 146 (1):99-104.
- Martinez-Castillo, A., P. Quirós, F. Navarro, E. Miró, and M. Muniesa. 2013. Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (16):4862-4868.
- Martins, F. H., B. E. Cabilio Guth, R. M. Piazza, S. C. Leao, A. Ludovico, M. S. Ludovico, G. Dahbi, J. Marzoa, A. Mora, J. Blanco, and J. S. Pelayo. 2015. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Parana State, southern Brazil. *Veterinary Microbiology*.. 175 (1):150-156.



- Martínez-Castillo, A., A. Allué-Guardia, G. Dahbi, J. Blanco, K. Creuzburg, H. Schmidt, and M. Muniesa. 2012. Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environmental Microbiology Reports*. 4 (1):147-155.
- Martínez-Castillo, A., and M. Muniesa. 2014. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4:46.
- Mathusa, E. C., Y. Chen, E. Enache, and L. Hontz. 2010. Non-O157 Shiga ToxinóProducing. *journal of food protection* 9 (16):1596-1773.
- Mauffret, A., S. Mieszkin, M. Morizur, Y. Alfiansah, S. Lozach, and M. Gourmelon. 2013. Recent innovation in microbial source tracking using bacterial real-time PCR markers in shellfish. *Marine Pollution Bulletin*. 68 (1-2):21-29.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 92. (5):1664-1668.
- Meng, Q., X. Bai, A. Zhao, R. Lan, H. Du, T. Wang, C. Shi, X. Yuan, X. Bai, S. Ji, D. Jin, B. Yu, Y. Wang, H. Sun, K. Liu, J. Xu, and Y. Xiong. 2014. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. *BMC Microbiology*. 14 (5).
- Mellmann, A., A. Fruth, A. W. Friedrich, L. H. Wieler, D. Harmsen, D. Werber, B. Middendorf, M. Bielaszewska, and H. Karch. 2009. Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emergence of Infectious Disease*. 15 (9):1474-1477.
- Mieszkin, S., J. P. Furet, G. Corthier, and M. Gourmelon. 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (10):3045-3054.
- Mieszkin, S., J. F. Yala, R. Joubrel, and M. Gourmelon. 2010. Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 108 (3):974-984.
- Mieszkin, S., M. P. Caprais, C. Le Mennec, M. Le Goff, T. A. Edge, and M. Gourmelon. 2013. Identification of the origin of faecal contamination in estuarine oysters using Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophage markers. *Journal of Applied Microbiology*. 115 (3):897-907.
- 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 (1):129-133.
- Mohlatlole, R. P., E. Madoroba, F. C. Muchadeyi, M. Chimonyo, A. T. Kanengoni, and E. F. Dzomba. 2013. Virulence profiles of enterotoxigenic, shiga toxin and enteroaggregative *Escherichia coli* in South African pigs. *Tropical Animal Health and Production*. 45 (6):1399-1405.
- Monaghan, A., B. Byrne, S. Fanning, T. Sweeney, D. McDowell, and D. J. Bolton. 2011. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (24):8662-8668.

- Monaghan A., B. Byrne, S. Fanning, T. Sweeney, D. McDowell, and D. J. Bolton. 2012. Serotypes and virulotypes of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) on bovine hides and carcasses. *Food Microbiology*. 32 (2):223-229.
- Mora, A., C. López, G. Dhabí, A. M. López-Beceiro, L. E. Fidalgo, E. A. Díaz, C. Martínez-Carrasco, R. Mamani, A. Herrera, J. E. Blanco, M. Blanco, and J. Blanco. 2012. Seropathotypes, Phylogroups, Stx Subtypes, and Intimin Types of Wildlife-Carried, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains with the Same Characteristics as Human-Pathogenic Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (8):2578-2585.
- Morabito, S., H. Karch, P. Mariani-Kurkdjian, H. Schmidt, F. Minelli, E. Bingen, and A. Caprioli. 1998. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (3):840-842.
- Morabito, S., G. Dell'Omo, U. Agrimi, H. Schmidt, H. Karch, T. Cheasty, and A. Caprioli. 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Veterinary Microbiology*. 82 (3):275-283.
- Moreira, C. N., M. A. Pereira, C. S. Brod, D. P. Rodrigues, J. B. Carvalhal, and J. A. G. Aleixo. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*. 93 (3):179-183.
- Morin, N., A. E. Santiago, R. K. Ernst, S. J. Guillot, and J. P. Nataro. 2013. Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 81 (1):122-132.
- Morrison, C. M., A. E. Armstrong, S. Evans, R. M. Mild, C. J. Langdon, and L. A. Joens. 2011. Survival of Salmonella Newport in oysters. *International Journal of Food Microbiology*. 148 (2):93-98.
- Mortensen, E. M., E. A. Halm, M. J. Pugh, L. A. Copeland, M. Metersky, M. J. Fine, C. S. Johnson, C. A. Alvarez, C. R. Frei, C. Good, M. I. Restrepo, J. R. Downs, and A. Anzueto. 2014. Association of Azithromycin With Mortality and Cardiovascular Events Among Older Patients Hospitalized With Pneumonia. *Journal of the American Medical Association*. 311 (21):2199-2208.
- Moura, R. A., M. P. Sircili, L. Leomil, M. H. Matté, L. R. Trabulsi, W. P. Elias, K. Irino, and A. F. Pestana de Castro. 2009. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (23):7399-7408.
- Moynihan, E. L., K. G. Richards, F. P. Brennan, S. F. Tyrrel, and K. Ritz. 2015. Enteropathogen survival in soil from different land-uses is predominantly regulated by microbial community composition. *Applied Soil Ecology*. 89:76-84.
- Muething, J., I. Meisen, W. Zhang, M. Bielaszewska, M. Mormann, R. Bauerfeind, M. A. Schmidt, A. W. Friedrich, and H. Karch. 2012. Promiscuous Shiga toxin 2e and its intimate relationship to Forssman. *Glycobiology*. 22 (6):849-862.
- Muniesa, M., L. Imamovic, and J. Jofre. 2011. Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microbial Biotechnology*. 4 (6):725-734.
- Müller, D., L. Greune, G. Heusipp, H. Karch, A. Fruth, H. Tschäpe, and M. A. Schmidt. 2007. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing

intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (10):3380-3390.

## N

Naganandhini, S., Z. J. Kennedy, M. Uyttendaele, and D. Balachandar. 2015. Persistence of Pathogenic and Non-Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Various Tropical Agricultural Soils of India. *Plos One* 10 (6).

Nagy, B., and P. Z., Fekete. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. 295 (Issues 667):4436454. Nash, J. H., A. Villegas, A. M. Kropinski, R. Aguilar-Valenzuela, P. Konczy, M. Mascarenhas, K. Ziebell, A. G. Torres, M. A. Karmali, and B. K. Coombes. 2010. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*. 11:667.

Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (1):142-201.

Naylor, S. W., D. L. Gally, and J. C. Low. 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. 295 (6-7):419-441.

NESP National Enteric Surveillance Program: <https://www.nml-lnm.gc.ca/NESP-PNSME/index-eng.htm>.

Nguyen, Y., and V. Sperandio. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2:90.

Nishikawa, Y., Z. Zhou, A. Hase, J. Ogasawara, T. Kitase, N. Abe, H. Nakamura, T. Wada, E. Ishii, and K. Haruki. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases*. 55 (6):183-190.

Nishio, M., N. Okada, T. Miki, T. Haneda, and H. Danbara. 2005. Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Microbiology Society Journals*. 151:863-873.

Nitschke, M., F. Sayk, C. Haertel, R. T. Roseland, S. Hauswaldt, J. Steinhoff, K. Fellermann, I. Derad, P. Wellhoener, J. Buening, B. Tiemer, A. Katalinic, J. Rupp, H. Lehnert, W. Solbach, and J. K. M. Knobloch. 2012. Association Between Azithromycin Therapy and Duration of Bacterial Shedding Among Patients With Shiga Toxin-Producing Enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *Journal of the American Medical Association*. 307 (10):1046-1052.

Nougayrede, J. P., F. Taieb, J. De Rycke, and E. Oswald. 2005. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends in Microbiology*. 13 (3):103-110.

Nyholm, O., J. Halkilahti, G. Wiklund, U. Okeke, L. Paulin, P. Auvinen, K. Haukka, and A. Siitonen. 2015. Comparative Genomics and Characterization of Hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains. *Plos One*. 10 (8):e0135936.

## O

O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*. 226 (4675):694-696.

Ochman, H., and R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural population. *Journal of Bacteriology*. 157 (2):690-693.

Ochoa, T. J., and C. A. Contreras. 2011. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 24 (5):478-483.

Oliveira, J., A. Cunha, F. Castilho, J. L. Romalde, and M. J. Pereira. 2011. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. *Food Control*. 22 (6):805-816.

Oloomi, M., and S. Bouzari. 2008. Molecular profile and genetic diversity of cytolethal distending toxin (CDT)-producing *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients. *Apmis*. 116 (2):125-132.

Orth, D., K. Grif, M. P. Dierich, and R. Wuerzner. 2007. Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. *Research in Microbiology*. 158 (2):105-111.

Oswald, E., H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marchès, and A. Caprioli. 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*. 68 (1):64-71.

Ottaviani, D., S. Chierichetti, E. Rocchegiani, S. Santarelli, and F. Leoni. 2015. Bioaccumulation of *Escherichia coli* O157:H7 in *Mytilus galloprovincialis* under experimental conditions. *Aquaculture Research*. 1-5.

Ouattara, N. K., J. Passerat, and P. Servais. 2011. Faecal contamination of water and sediment in the rivers of the Scheldt drainage network. *Environmental Monitoring and Assessment*. 183 (1-4):243-257.

## P

Pacheco, A. R., and V. Sperandio. 2012. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2 (81).

Parker, J. K., D. McIntyre, and R. T. Noble. 2010. Characterizing fecal contamination in stormwater runoff in coastal North Carolina, USA. *Water Research*. 44 (14):4186-4194.

Parreira, V. R., and C. L. Gyles. 2002. Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*. 87 (4):341-352.

Pasquali, F., A. Lucchi, S. Braggio, D. Giovanardi, A. Franchini, M. Stonfer, and G. Manfreda. 2015. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain. *Veterinary Microbiology*. 178 (3-4):230-237.

Paton, A. W., and J. C. Paton. 1998. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111, and *rfb* O157. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (2): 598-602.

- Paton, A. W., P. Srimanote, M. C. Woodrow, and J. C. Paton. 2001. Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. *Infection and Immunity*. 69 (11):6999-7009.
- Paton, A. W., P. Srimanote, U. M. Talbot, H. Wang, and J. C. Paton. 2004. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Medicine*. 200 (1):35-46.
- Perini, L., G. M. Quero, E. Serrano García, G.M. Luna. 2015. Distribution of *Escherichia coli* in a coastal lagoon (Venice, Italy): Temporal patterns, genetic diversity and the role of tidal forcing. *Water Research*. 87:1556165.
- Perna, N. T., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamouisis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. 409 (6819):529-533.
- Pfannes, K. R., K. M. W. Langenbach, G. Piloni, T. Stuhmann, K. Euringer, T. Lueders, T. R. Neu, J. A. Muller, M. Kastner, and R. U. Meckenstock. 2015. Selective elimination of bacterial faecal indicators in the Schmutzdecke of slow sand filtration columns. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99 (23):10323-10332.
- Phillips, A. D., and G. Frankel. 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with woman intestinal organ cultures. *Journal of Infectious Diseases*. 181 (4):1496-1500.
- Picozzi, C., G. Volponi, I. Vigentini, S. Grassi, and R. Foschino. 2012. Assessment of transduction of *Escherichia coli* Stx2-encoding phage in dairy process conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 153 (3):388-394.
- Polifroni, R., A. I. Etcheverria, G. H. Arroyo, and N. L. Padola. 2014. Survival of VTEC O157 and non-O157 in water troughs and bovine feces. *Revista Argentina De Microbiologia*. 46 (2):126-132.
- Pommepuy, M., M. Butin, A. Derrien, M. Gourmelon, R. R. Colwell, and M. Cormier. 1996. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (12):4621-4626.
- Pommepuy, M., Dumas, F., Caprais, M. P., Camus, P., Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Haugarreau, L., Sarrette, B., Vilagines, P., Pothier, P., Kholi, E., Le Guyader, F. 2004. Sewage impact on shellfish microbial contamination. *Water Science & Technology*. 50 (1):117-124.
- Power, M. L., J. Littlefield-Wyer, D. M. Gordon, D. A. Veal, and M. B. Slade. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environmental Microbiology*. 7 (5):631-640.
- Pradel, N., V. Livrelli, C. De Champs, J. B. Palcoux, A. Reynaud, F. Scheutz, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier. 2000. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (3):1023-1031.

Prager, R., A. Fruth, U. Busch, and E. Tietze. 2011. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin STIa encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Journal of Medical Microbiology*. 301 (3):181-191.

Pruimboom-Brees, I. M., T. W. Morgan, M. R. Ackermann, E. D. Nystrom, J. E. Samuel, N. A. Cornick, and H. W. Moon. 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 97. (19):10325-10329.

## **Q**

Qadri, F., A. M. Svennerholm, A. S. Faruque, and R. B. Sack. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. 18 (3):465-483.

Quilliam, R. S., R. M. Chalmers, A. P. Williams, H. Chart, G. A. Willshaw, S. M. Kench, G. Edwards-Jones, J. Evans, D. R. Thomas, R. L. Salmon, and D. L. Jones. 2012. Seroprevalence and Risk Factors Associated with *Escherichia coli* O157 in a Farming Population. *Zoonoses and Public Health*. 59 (2):83-88.

## **R**

Radhouani, H., P. Poeta, A. Goncalves, R. Pacheco, R. Sargo, and G. Igrejas. 2012. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and *enterococci* isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Medical Microbiology*. 61 (6):837-843.

Radhouani, H., G. Igrejas, A. Goncalves, R. Pacheco, R. Monteiro, R. Sargo, F. Brito, C. Torres, and P. Poeta. 2013. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and *enterococci* from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Anaerobe*. 23:82-86.

Rajkhowa, S., and D. K. Sarma. 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of porcine O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from India. *Tropical Animal Health and Production*. 46 (6):931-937.

Ramaiah, N., V. Kolhe, and A. Sadhasivan. 2005. Quantitative analyses of pollution-indicator and pathogenic bacteria in Mumbai waters from ballast water exchange perspective. *Environmental Monitoring and Assessment*. 104 (1-3):295-308.

Rampersad F. S., S. Laloo, A. La Borde, K. Maharaj, L. Sookhai, J. Teelucksingh, S. Reid, L. McDougall, and A. A. Adesiyun. 1999. Microbial quality of oysters sold in Western Trinidad and potential health risk to consumers. *Epidemiology and Infection*. 123 (02):241-250.

Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, G. S. Myers, E. F. Mongodin, W. F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebaihia, N. R. Thomson, R. Chaudhuri, I. R. Henderson, V. Sperandio, and J. Ravel. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*. 190 (20):6881-6893.

Reece, S., C. P. Simmons, R. J. Fitzhenry, S. Matthews, A. D. Phillips, G. Dougan, and G. Frankel. 2001. Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity. *Molecular Microbiology*. 40 (1):86-98.

Reid, S. D., C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander, and T. S. Whittam. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*. 406 (6791):64-67.

Rodrigues, J., I. C. Scaletsky, L. C. Campos, T. A. Gomes, T. S. Whittam, and L. R. Trabulsi. 1996. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infection and Immunity*. 64 (7):2680-2686.

Rooks, D. J., Y. Yan, J. E. McDonald, M. J. Woodward, A. J. McCarthy, and H. E. Allison. 2010. Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and other lambdoid bacteriophages. *Environmental Microbiology*. 12 (5):1194-1204.

Rozen, Y., and S. Belkin. 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews*. 25 (5):513-529.

Rugeles, C., L., J. Bai, A. J. Martinez, M. Consuelo Vanegas, and O. G. Gomez-Duarte. 2010. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*. 138 (3):282-286.

Rutherford, J. C. 2014. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *Plos Pathogens*. 10 (5).

## S

Saito, N., M. Kawano, T. Kobayashi, S. Watanabe, W. Yamada, J. Yatsu, K. Kawamukai, and K. Akiyama. 2005. An outbreak of food poisoning caused by an enteropathogenic *Escherichia coli* O115 : H19 in Miyagi Prefecture. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58 (3):189-190.

Samadpour, M., J. E. Ongerth, J. Liston, N. Tran, D. Nguyen, T. S. Whittam, R. A. Wilson, and P. I. Tarr. 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 (3): 1038-1040.

Sanath Kumar H., S. K., Otta, and I. Karunasagar. 2001. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 33 (5):334-338.

Sancak, A. A., H. C. Rutgers, C. A. Hart, and R. M. Batt. 2004. Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *Veterinary Record*. 154 (4):101-106.

Sanchez, S., A. Garcia-Sanchez, R. Martinez, J. Blanco, J. E. Blanco, M. Blanco, G. Dahbi, A. Mora, J. Hermoso de Mendoza, J. M. Alonso, and J. Rey. 2009. Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. *Veterinary Journal*. 180 (3):384-388.

Sanchez, S., R. Martinez, A. Garcia, D. Vidal, J. Blanco, M. Blanco, J. E. Blanco, A. Mora, S. Herrera-Leon, A. Echeita, J. M. Alonso, and J. Rey. 2010. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary Microbiology*. 143 (2-4):420-423.

Salomon, J. C., and M. Pommepuy. 1990. Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France). *Water Research*. 24 (8):983-994.

- Scaletsky, I. C. A., M. Z. Pedroso, C. A. G. Oliva, R. L. B. Carvalho, M. B. Morais, and U. Fagundes-Neto. 1999. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infection and Immunity*. 67 (7):3410-3415.
- Scheiring, J., S. P. Andreoli, and L. B. Zimmerhackl. 2008. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology*. 23 (10):1749-1760.
- Scheutz, F., L. D. Teel, L. Beutin, D. Piérard, G. Buvens, H. Karch, A. Mellmann, A. Caprioli, R. Tozzoli, S. Morabito, N. A. Strockbine, A. R. Melton-Celsa, M. Sanchez, S. Persson, and A. D. O'Brien. 2012. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (9):2951-2963.
- Scheutz, F. 2014. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*. 2 (4): EHEC-0019-201.
- Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler, and H. Karch. 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (3):1205-1208.
- Schmidt, H. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Research in Microbiology*. 152 (8):687-695.
- Schmidt, M. A. 2010. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular Microbiology*. 12 (11):1544-1552.
- Schroeder, G. N., and H. Hilbi. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical Microbiology Reviews*. 21 (1):134-156.
- Senerwa, D., L. N. Mutanda, J. M. Gathuma, and O. Olsvik. 1991. Antimicrobial resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a nosocomial outbreak in Kenya. *Apmis*. 99 (8):728-734.
- Servais, P., T. Garcia-Armisen, I. George, and G. Billen. 2007. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling. *Science of the Total Environment*. 375 (1-3):152-167.
- Servin, A. L. 2014. Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 27 (4):823-869.
- Seurinck, S., T. Defoirdt, W. Verstraete, and S. D. Siciliano. 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology*. 7 (2):249-259.
- Sham, H. P., S. R. Shames, M. A. Croxen, C. Ma, J. M. Chan, M. A. Khan, M. E. Wickham, W. Deng, B. B. Finlay, and B. A. Vallance. 2011. Attaching and Effacing Bacterial Effector NleC Suppresses Epithelial Inflammatory Responses by Inhibiting NF-kappa B and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Infection and Immunity*. 79 (9):3552-3562.



- Shen, J. L., L. Rump, W. T. Ju, J. D. Shao, S. H. Zhao, E. Brown, and J. H. Meng. 2015. Virulence characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from food, humans and animals. *Food Microbiology*. 50:20-27.
- Shepherd, M. W., P. Liang, X. Jiang, M. P. Doyle, and M. C. Erickson. 2010. Microbiological analysis of composts produced on South Carolina poultry farms. *Journal of Applied Microbiology*. 108 (6):2067-2076.
- Shetty, V. A., S. H. Kumar, A. K. Shetty, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 2012. Prevalence and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. *Journal of Laboratory Physicians*. 4 (1):24-29.
- Shieh, Y. C., R. S. Baric, J. W. Woods, and K. R. Calci. 2003. Molecular surveillance of enterovirus and Norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (12):7130-7136.
- Shringi, S., A. Garcia, K. K. Lahmers, K. A. Potter, S. Muthupalani, A. G. Swennes, C. J. Hovde, D. R. Call, J. G. Fox, and T. E. Besser. 2012. Differential Virulence of Clinical and Bovine-Biased Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Genotypes in Piglet and Dutch Belted Rabbit Models. *Infection and Immunity*. 80 (1):369-380.
- Silva, L. E. P., T. B. Souza, N. P. Silva, and I. C. A. Scaletsky. 2014. Detection and genetic analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (EAST1) gene in clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains. *BMC Microbiology*. 14 (135).
- Simovitch, M., H. Sason, S. Cohen, E. E. Zahavi, N. Melamed-Book, A. Weiss, B. Aroeti, and I. Rosenshine. 2010. EspM inhibits pedestal formation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* and disrupts the architecture of a polarized epithelial monolayer. *Cellular Microbiology*. 12 (4):489-505.
- Slanec, T., A. Fruth, K. Creuzburg, and H. Schmidt. 2009. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (19):6187-6197.
- Slayton, R. B., G. Turabelidze, S. D. Bennett, C. A. Schwensohn, A. Q. Yaffee, F. Khan, C. Butler, E. Trees, T. L. Ayers, M. L. Davis, A. S. Laufer, S. Gladbach, I. Williams, and L. B. Gieraltowski. 2013. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 associated with romaine lettuce consumption, 2011. *Plos One*. 8 (2):e55300.
- Smati, M., O. Clermont, F. Le Gal, O. Schichmanoff, F. Jauréguy, A. Eddi, E. Denamur, B. Picard, and C. Group. 2013. Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (16):5005-5012.
- Smati, M., O. Clermont, A. Bleibtreu, F. Fourreau, A. David, A.-S. Daubie, C. Hignard, O. Loison, B. Picard, and E. Denamur. 2015. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiologyOpen*. 4 (4):604-615.
- Sohel, I., J. L. Puente, W. J. Murray, J. Vuopiovarkila, and G. K. Schoolnik. 1993. Cloning and characterization of the *bundle-forming pilin* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Molecular Microbiology*. 7 (4):563-575.

Solecki, O., L. Jeanneau, E. Jarde, M. Gourmelon, C. Marin, and A. M. Pourcher. 2011. Persistence of microbial and chemical pig manure markers as compared to faecal indicator bacteria survival in freshwater and seawater microcosms. *Water Research*. 45 (15):4623-4633.

Sonntag, A. K., M. Bielaszewska, A. Mellmann, N. Dierksen, P. Schierack, L. H. Wieler, M. A. Schmidt, and H. Karch. 2005. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (12):8855-8863.

Staats, J. J., M. M. Chengappa, M. C. DeBey, B. Fickbohm, and R. D. Oberst. 2003. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (estA and elt) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. *Veterinary Microbiology*. 94 (4):303-312.

Staples, M., A. V. Jennison, R. M. A. Graham, and H. V. Smith. 2012. Evaluation of the Meridian Premier EHEC assay as an indicator of Shiga toxin presence in direct faecal specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 73 (4):322-325.

Steyert, S. R., and J. B. Kaper. 2012. Contribution of urease to colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 80 (8): 2589-2600.

Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infection and Immunity*. 53 (1):135-140.

Surendraraj, A., N. Thampuran, and T. C. Joseph. 2010. Molecular screening, isolation, and characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from retail shrimp. *Journal of Food Protection*. 73 (1):97-103.

Swennes, A. G., E. M. Buckley, N. M. A. Parry, C. M. Madden, A. Garcia, P. B. Morgan, K. M. Astrofsky, and J. G. Fox. 2012. Enzootic Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection in Laboratory Rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (7):2353-2358.

## **T**

Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, and T. E. Besser. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity*. 68 (3):1400-1407.

Tarr, P. I., C. A. Gordon, and W. L. Chandler. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*. 365 (9464):1073-1086.

Tatsuno, I., M. Horie, H. Abe, T. Miki, K. Makino, H. Shinagawa, H. Taguchi, S. Kamiya, T. Hayashi, and C. Sasakawa. 2001. toxB gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infection and Immunity*. 69 (11):6660-6669.

Tatsuno, I., R. Mundy, G. Frankel, Y. Chong, A. D. Phillips, A. G. Torres, and J. B. Kaper. 2006. The *lpf* Gene Cluster for Long Polar Fimbriae Is Not Involved in Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* or Virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infection and Immunity*. 74 (1):265-272.

Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (3):207-217.

- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 33 (9):2233-2239.
- Thanabalasuriar, A., A. Koutsouris, A. Weflen, M. Mimee, G. Hecht, and S. Gruenheid. 2010. The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 12 (1):31-41.
- Tondera, K., K. Klaer, J. Gebhardt, J. Wingender, C. Koch, M. Horstkott, M. Strathmann, L. Jurzik, I. A. Hamza, and J. Pinnekamp. 2015. Reducing pathogens in combined sewer overflows using ozonation or UV irradiation. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 218 (8):731-741.
- Trabulsi, L. R., R. Keller, and T. A. T. Gomes. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 8 (5):508-513.
- Trotz-Williams, L. A., N. J. Mercer, J. M. Walters, A. M. Maki, and R. P. Johnson. 2012. Pork Implicated in a Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak in Ontario, Canada. *Canadian Journal of Public Health*. 103 (5): 322-326.
- Tseng, M., P. M. Fratamico, L. Bagi, S. Delannoy, P. Fach, S. D. Manning, and J. A. Funk. 2014a. Diverse Virulence Gene Content of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Finishing Swine. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (20):6395-6402.
- Tseng, M., P. M. Fratamico, S. D. Manning, and J. A. Funk. 2014b. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. *Animal Health Research Reviews*. 15 (1):63-75.
- Turkyilmaz, S., S. Eskiizmirli, S. Tunaligil, and B. Bozdogan. 2013. Identification, characterization and molecular epidemiology of *Escherichia coli* isolated from lamb and goat kids with diarrhoea. *Acta Veterinaria Brno*. 82 (4):357-362.
- Tuyet, D. T. N., S. Yassibanda, P. L. N. Thi, M. R. Koyenede, M. Gouali, C. Bekondi, J. Mazzi, and Y. Germani. 2006. Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 in Bangui and N'Goila, Central African Republic: A brief report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75 (3):513-515.
- Tymensen, L. D., F. Pyrdok, D. Coles, W. Koning, T. A. McAllister, C. C. Jokinen, S. E. Dowd, and N. F. Neumann. 2015. Comparative accessory gene fingerprinting of surface water *Escherichia coli* reveals genetically diverse naturalized population. *Journal of Applied Microbiology*. 119 (1):263-277.

## U

- USDA United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. 2014. MLG 5B.05: Detection and Isolation of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.
- USDA/FSIS United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/home>.

## Y

Vaillant V., N. Jourdan-Da Silva, M.-L. Quilici, E. Couturier, S. Le Guyader, G. Delmas, J.-C. Le Saux. 2012. Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire Hors-série-InVS*. p34-37.

van den Beld, M. J., and F. A. Reubsæet. 2012. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 31 (6):899-904.

van Duynhoven, Y. T. H. P., I. H. M. Friesema, T. Schuurman, A. Roovers, A. A. van Zwet, L. J. M. Sabbe, W. K. van der Zwaluw, D. W. Notermans, B. Mulder, E. J. van Hannen, F. G. C. Heilmann, A. Buiting, R. Jansen, and A. M. D. Kooistra-Smid. 2008. Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection*. 14 (5):437-445.

van Elsas, J. D., A. V. Semenov, R. Costa, and J. T. Trevors. 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The Isme Journal*. 5 (2):173-183.

Varela, G., L. Batthyány, M. N. Bianco, W. Pérez, L. Pardo, G. Algorta, L. Robino, R. Suárez, A. Navarro, M. C. Pérez, and F. Schelotto. 2015. Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in Uruguay. *International Journal of Microbiology*. 2015:ID592953.

Vernozy-Rozand, C., M. P. Montet, F. Lequerrec, E. Serillon, B. Tilly, C. Bavai, S. Ray-Gueniot, J. Bouvet, C. Mazuy-Cruchaudet, and Y. Richard. 2002. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *Journal of Applied Microbiology*. 93 (3):473-478.

Vidotto, M. C., E. C. T. Florian, and M. A. Ono. 2013. Prevalence of the paa gene (porcine attaching and effacing associated) in porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (PEPEC) associated with postweaning diarrhea in south Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44 (2):515-517.

Vlisidou, I., O. Marches, F. Dziva, R. Mundy, G. Frankel, and M. P. Stevens. 2006. Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *FEMS Microbiology Letters*. 263 (1):32-40.

Vossenkaemper, A., O. Marches, P. D. Fairclough, G. Warnes, A. J. Stagg, J. O. Lindsay, P. C. Evans, L. A. Luong, N. M. Croft, S. Naik, G. Frankel, and T. T. MacDonald. 2010. Inhibition of NF-kappa B Signaling in Human Dendritic Cells by the Enteropathogenic *Escherichia coli* Effector Protein NleE. *Journal of Immunology*. 185 (7):4118-4127.

Vu-Khac, H., and N. A. Cornick. 2008. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Veterinary Microbiology*. 131 (1-2):212-213.

## W

Walk, S. T., E. W. Alm, L. M. Calhoun, J. M. Mladonicky, and T. S. Whittam. 2007. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental Microbiology*. 9 (9): 2274-2288.

- Walters, S. P., A. L. Thebo, and A. B. Boehm. 2011. Impact of urbanization and agriculture on the occurrence of bacterial pathogens and stx genes in coastal waterbodies of central California. *Water Research*. 45 (4):1752-1762.
- Wang, G. D., T. Zhao, and M. P. Doyle. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (7):2567-2570.
- Wang, L., M. Wakushima, T. Aota, Y. Yoshida, T. Kita, T. Maehara, J. Ogasawara, C. Choi, Y. Kamata, Y. Hara-Kudo, and Y. Nishikawa. 2013. Specific Properties of Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Diarrheal Patients and Comparison to Strains from Foods and Fecal Specimens from Cattle, Swine, and Healthy Carriers in Osaka City, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (4):1232-1240.
- Wang, Z., Y. Zhang, W. Liu, G. Gu, H. Li, and Y. Liu. 2014. Prevalence and Antibiotic Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Children Younger than 5 Years with Acute Gastroenteritis in Southeastern China. *Latin American Journal of Pharmacy*. 33 (8):1351-1356.
- Wani, S. A., M. A. Bhat, I. Samanta, Y. Nishikawa, and A. S. Buchh. 2003. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India. *Letters in Applied Microbiology*. 37 (2):121-126.
- Wani, S. A., M. A. Bhat, I. Samanta, Y. Nishikawa, and A. S. Buchh. 2005. *Escherichia coli* O4 :NM associated with an outbreak of calf diarrhoea. *Veterinary Journal*. 169 (2):300-302.
- Wani, S. A., I. Hussain, A. Nabi, I. Fayaz, and Y. Nishikawa. 2007. Variants of eae and stx genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from calves. *Letter in Applied Microbiology*. 45 (6):610-615.
- Watterworth, L., B. Rosa, H. Schraft, E. Topp, and K. T. Leung. 2006. Survival of various ERIC-genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in well water. *Water Air and Soil Pollution*. 177 (1-4):367-382.
- Wedley, A. L., H. M. Elajnef, and J. N. Fletcher. 2012. Characterization of a novel EAST-negative enteropathogenic *E. coli* strain implicated in a food-borne outbreak of diarrhoea in adults. *Apmis*. 121 (6):494-502.
- Wells, T. J., O. Sherlock, L. Rivas, A. Mahajan, S. A. Beatson, M. Torpdahl, R. I. Webb, L. P. Allsopp, K. S. Gobius, D. L. Gally, and M. A. Schembri. 2008. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environmental Microbiology*. 10 (3):589-604.
- Wery, N., C. Lhoutellier, F. Ducray, J.-P. Delgenes, and J.-J. Godon. 2008. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research*. 42 (1-2):53-62.
- Westrell T., D. V., Ethelberg S., Harris J., Hjertqvist M., Jourdan-da Silva N., Koller A., Lenglet A., Lisby M., Vold L. 2010. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *EuroSurveillance*. 15 (12).
- Whitman, R. L., V. J. Harwood, T. A. Edge, M. B. Nevers, M. Byappanahalli, K. Vijayavel, J. Brandao, M. J. Sadowsky, E. W. Alm, A. Crowe, D. Ferguson, Z. Ge, E. Halliday, J. Kinzelman, G.

Kleinheinz, K. Przybyla-Kelly, C. Staley, Z. Staley, and H. M. Solo-Gabriele. 2014. Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*. 13 (3):329-368.

Whitman, R. L., and M. B. Nevers. 2003. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (9):5555-5562.

Wickham, M. E., C. Lupp, M. Mascarenhas, A. Vazquez, B. K. Coombes, N. F. Brown, B. A. Coburn, W. Deng, J. L. Puente, M. A. Karmali, and B. B. Finlay. 2006. Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *Journal of Infectious Diseases*. 194 (6):819-827.

Widgren, S., R. Soderlund, E. Eriksson, C. Fasth, A. Aspan, U. Emanuelson, S. Alenius, and A. Lindberg. 2015. Longitudinal observational study over 38 months of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 status in 126 cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 121 (3-4):343-352.

Widmer, K., H. Nguyen Thi Van, S. Vinitnantharat, S. Sthiannopkao, S. Wangsaatmaja, M. A. N. Prasetiati, T. Nguyen Cong, K. Thepnoo, A. D. Sutadian, T. Huynh Thi Thanh, D. Fapyane, V. San, P. Vital, and H.-G. Hur. 2013. Prevalence of *Escherichia coli* in surface waters of Southeast Asian cities. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 29 (11):2115-2124.

Wight, J. P., P. Rhodes, P. A. Chapman, S. M. Lee, and P. Finner. 1997. Outbreaks of food poisoning in adults due to *Escherichia coli* O111 and campylobacter associated with coach trips to northern France. *Epidemiology and Infection*. 119 (1):9-14.

Williams A.P., A., L. M., Killham K., Jones, D.L. 2007. Persistence, dissipation, and activity of *Escherichia coli* O157:H7 within sand and seawater environments. *FEMS Microbiology Ecology*. 60 (1):24-32.

Williams, A. P., R. S. Quilliam, C. E. Thorn, D. Cooper, B. Reynolds, and D. L. Jones. 2012. Influence of Land Use and Nutrient Flux on Metabolic Activity of *E. coli* O157 in River Water. *Water Air and Soil Pollution*. 223 (6):3077-3083.

Wilson I.G., and J. E. Moore. 1996. Presence of *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* in shellfish. *Epidemiology and Infection*. 116 (2):147-153.

Wu, B., T. Skarina, A. Yee, M.-C. Jobin, R. Dileo, A. Semesi, C. Fares, A. Lemak, B. K. Coombes, C. H. Arrowsmith, A. U. Singer, and A. Savchenko. 2010. NleG Type 3 Effectors from Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Are U-Box E3 Ubiquitin Ligases. *Plos Pathogens*. 6 (6).

## Y

Yamasaki, E., M. Watahiki, J. Isobe, T. Sata, G. B. Nair, and H. Kurazono. 2015. Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan-Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC outbreak. *Toxins*. 7 (10):4381-4389.

Yan, Y., Y. Shi, D. Cao, X. Meng, L. Xia, and J. Sun. 2011. Prevalence of Stx Phages in Environments of a Pig Farm and Lysogenic Infection of the Field *E. coli* O157 Isolates with a Recombinant Converting Phage. *Current Microbiology*. 62 (2):458-464.

Yang, J., T. W. Russell, D. M. Hocking, J. K. Bender, Y. N. Srikhanta, M. Tauschek, and R. M. Robins-Browne. 2015. Control of Acid Resistance Pathways of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strain EDL933 by PsrB, a Prophage-Encoded AraC-Like Regulator. *Infection and Immunity*. 83 (1):346-353.

Yang, K., E. Pagaling, and T. Yan. 2014. Estimating the Prevalence of Potential Enteropathogenic *Escherichia coli* and Intimin Gene Diversity in a Human Community by Monitoring Sanitary Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (1):119-127.

Yatsuyanagi, J., S. Saito, Y. Miyajima, K. Amano, and K. Enomoto. 2003. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains Harboring the astA gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (5):2033-2039.

Yoon, J. W., J. Y. Lim, Y. H. Park, and C. J. Hovde. 2005. Involvement of the *Escherichia coli* O157 : H7(pO157) ecf operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infection and Immunity*. 73 (4):2367-2378.

Younger, A. D., and R. A. Reese. 2013. Comparison of *Escherichia coli* levels between bivalves mollusk species across harvesting sites in England and Wales. *Journal of Shellfish Research*. 32 (2):527-532.

## **Z**

Zhang, Q., and T. Van. 2012. Correlation of Intracellular Trehalose Concentration with Desiccation Resistance of Soil *Escherichia coli* Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (20):7407-7413.

Zhang, W. L., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch. 2002a. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx(1c)*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (4):1441-1446.

Zhang, W. L., B. Köhler, E. Oswald, L. Beutin, H. Karch, S. Morabito, A. Caprioli, S. Suerbaum, and H. Schmidt. 2002b. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (12):4486-4492.

Zhao, L., X. Chen, X. Xu, G. Song, and X. Liu. 2009. Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *Veterinary Journal*. 180 (1):124-129.

Zschock, M., H. P. Hamann, B. Kloppert, and W. Wolter. 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Letters in Applied Microbiology*. 31 (3):203-208.

Zweifel, C., J. E. Blanco, M. Blanco, J. Blanco, and R. Stephan. 2004. Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*. 95 (1):19-27.

Zweifel, C., N. Cernela, and R. Stephan. 2013. Detection of the emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11/H- sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. *Applied in Environmental Microbiology*. 79 (17):5411-5413.





# ANNEXES

---



**Annexe I** : Sélection de gènes de virulence identifiés chez *E. coli*

<b>Gènes (position chromosomique EDL933)</b>	<b>Support génétique</b>	<b>Description/Rôle</b>	<b>Références</b>
<b>LEE</b>			
<i>eae</i> (Z5110)	LEE	Intimine : protéine d'adhésion	Garrido <i>et al.</i> , 2006
<i>espB</i> (Z5105)	LEE	protéine EspB intervenant dans la formation de la seringue moléculaire	Garrido <i>et al.</i> , 2006
<i>espD</i> (Z5106)	LEE	protéine EspD intervenant dans la formation de la seringue moléculaire	Garrido <i>et al.</i> , 2006
<i>espA</i> (Z5107)	LEE	protéine EspA intervenant dans la formation de la seringue moléculaire	Garrido <i>et al.</i> , 2006
<i>tir</i> (Z5112)	LEE	<i>tyrosine phosphorylated protein</i> : récepteur de l'intimine	Garrido <i>et al.</i> , 2006
<i>espZ</i> (Z5122)	LEE	régule la translocation de protéines effectrices codées par le LEE	Berger <i>et al.</i> , 2012
<i>escC</i> (Z5126)	LEE	protéine de structure et de la machinerie du SSTT	Garmendia <i>et al.</i> , 2005
<i>escD</i> (Z5109)	LEE	protéine de structure et de la machinerie du SSTT	Garmendia <i>et al.</i> , 2005
<i>escN</i> (Z5119)	LEE	protéine de structure et de la machinerie du SSTT	Garmendia <i>et al.</i> , 2005
<i>escV</i> (Z5120)	LEE	protéine de structure et de la machinerie du SSTT	Garmendia <i>et al.</i> , 2005
<i>escJ</i> (Z5124)	LEE	protéine de structure et de la machinerie du SSTT	Garmendia <i>et al.</i> , 2005
<i>espG</i>	LEE	EspG déstabilise la formation de microtubules en agissant sur l'appareil de Golgi	Clements <i>et al.</i> , 2011
<i>espJ</i>	OI-79	Inhibe l'action des macrophages	Marches <i>et al.</i> , 2008
<i>espM2</i> (Z3918)	OI-108	EspM régule la formation du piédestal et agit sur les jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales	Simovitch <i>et al.</i> , 2010
<i>espV</i> (Z1387)	OI-44	EspV altère la morphologie des cellules eucaryotes	Arbeloa <i>et al.</i> , 2011
<i>espM1</i> (Z2565)	OI-71	EspM régule la formation du piédestal et agit sur les jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales	Simovitch <i>et al.</i> , 2010
<b>Adhésines fimbriales</b>			
<i>bfpA</i>	plamide	<i>bundle-forming pilus</i> : Sous-unité structurale majeure pour la formation du	Sohel <i>et al.</i> , 1993

		faisceau de <i>pili</i> , entéroadhésion (spécifique aux EPEC)	
<i>F6/987P (fasA)pig</i>	plasmide	adhésine fimbriale 987P : Adhérence aux cellules de l'intestin grêle du porc nouveau-né (spécifique au ETEC responsable de l'œdème chez le porc)	Kwon <i>et al.</i> , 2002
<i>F18, F107 (fedA)pig</i>	plasmide	adhésine fimbriale F18 : Adhérence aux cellules de l'intestin grêle du porc nouveau-né (spécifique au ETEC responsable de l'œdème chez le porc)	Kwon <i>et al.</i> , 2002
<i>F41 (fimF41a)pig</i>	chromosome	adhésine fimbriale F41 : Adhérence aux cellules de l'intestin grêle du porc nouveau-né (spécifique au ETEC responsable de l'œdème chez le porc)	Kwon <i>et al.</i> , 2002
<i>lpfAO157</i>	OI-141-154 (chromosome)	<i>long polar fimbrial protein</i> : adhésion des EHEC <i>in vitro</i> aux patches Peyer; formation de micro-colonies	Doughty <i>et al.</i> , 2002
<i>lpfAO26</i>	chromosome	<i>long polar fimbrial protein</i> : adhésion des EHEC <i>in vitro</i> aux patches Peyer; formation de micro-colonies	Doughty <i>et al.</i> , 2002
<i>lpfAO113</i>	OI-154 (chromosome)	<i>long polar fimbrial protein</i> : observé chez les STEC LEE-négatifs (non-O157), produite par les STEC O113:H21	Doughty <i>et al.</i> , 2002
<b>Adhésines non-fimbriales</b>			
<i>toxB</i>	plasmide O157	Proche de la toxine B de <i>Clostridium difficile</i> : potentielle protéine d'adhésion et régulateur post-transcriptionnel du SSTT, potentiel effet toxique	Tatsuno <i>et al.</i> , 2001
<i>efa1/LifA</i>	OI-122 (chromosome)	<i>EHEC factor for adherence</i> (efa) (EHEC) et <i>lymphocyte inhibitory factor</i> (lifA) (EPEC) : rôle dans la colonisation du tube digestif des bovins (homologue de ToxB) et inhibe l'action des lymphocytes	Badea <i>et al.</i> , 2003
<i>iha</i>	OI-43-48 (chromosome)	<i>IrgA homologue adhesin</i> : Protéine homologue de <i>IrgA</i> ( <i>Iron-regulated gene homologue</i> ) de <i>Vibrio cholerae</i> impliquée dans l'adhésion	Tarr <i>et al.</i> , 2000
<i>eibG</i>	plasmide O113	<i>E. coli immunoglobulin-binding</i> : protéine de liaison aux immunoglobulines	Lu <i>et al.</i> , 2006
<i>saa</i>	plasmide O113	<i>STEC autoagglutinating adhesin</i> : Adhésion par autoagglutination observée chez les STEC LEE-négatifs	Paton <i>et al.</i> , 2001
<i>orfA/orfB</i>	Plasmide	<i>open reading frames A and B (adhesin involved in diffuse adhesion AIDA)</i> : adhésion diffuse observée dans les cas d'œdème chez le porc	Zhao <i>et al.</i> , 2009

<i>paa</i>	plasmide ou chromosome	<i>porcine attaching- and effacing-associated factor</i> : impliqué dans l'attachement intime des bactéries aux entérocytes et induits des lésions A/E typiques au niveau l'iléon chez le porc	Vidotto <i>et al.</i> , 2013
<i>stcE</i>	plasmide O157	métalloprotéase et mucinase: protéase contribuant à l'adhésion intime des EHEC O157: H7 à des cellules hôtes par clivage de glycoprotéine de surface	Grys <i>et al.</i> , 2005
<i>sab</i>	plasmide O113	<i>STEC contributing to biofilm formation</i> : autotransporteur contribuant à la formation de biofilm, adhésion observée chez les EHEC LEE-négatifs	Buven et Pierard 2012
<i>espP</i>	plasmide O157	<i>E. coli secreted protein</i> : Sérine protéase autotransporteur, responsable de l'adhésion aux cellules rectales primaires bovines et de la colonisation des intestins de bovins et effet cytoléthale	Dziva <i>et al.</i> , 2007
<i>epeA</i>	plasmide O113	<i>serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae</i> (SPATE) : autotransporteur observé chez les EHEC LEE-négatifs	Leyton <i>et al.</i> , 2003
<i>ehaA</i>	OI-15	<i>Enterohemorrhagic E coli Autotransporter</i> : favorise l'attachement aux surfaces biotiques type cellule épithéliale primaire et abiotique, associé à un système de sécrétion de type V	Wells <i>et al.</i> , 2008
<b>Toxines</b>			
<i>subA</i>	plasmide O113	Cytotoxine subtilase capable d'induire l'arrêt de la synthèse protéique	Paton <i>et al.</i> , 2004
<i>ehxA</i>	plasmide O157	<i>Enterohemolysin A</i> : cytotoxine capable de lyser les érythrocytes, induit la libération de cytokines inflammatoires	Lorenz <i>et al.</i> , 2013
<i>cdt-I</i>	chromosome ou plasmide	<i>cytolethal distending toxin</i> ou cyclomoduline: bloque le cycle cellulaire des cellules eucaryotes en phase G2/M	Nougayrede <i>et al.</i> , 2005
<i>cdt-III</i>	chromosome ou plasmide	<i>cytolethal distending toxin</i> ou cyclomoduline: bloque le cycle cellulaire des cellules eucaryotes en phase G2/M	Nougayrede <i>et al.</i> , 2005
<i>cdt-V</i>	chromosome ou plasmide	<i>cytolethal distending toxin</i> ou cyclomoduline: bloque le cycle cellulaire des cellules eucaryotes en phase G2/M	Nougayrede <i>et al.</i> , 2005
<i>STa (estla)</i>	plasmide	<i>Heat-stable toxin a</i> : entérotoxine responsable de l'hyper excréation de H <sub>2</sub> O,	Nagy 2005

		Na <sup>+</sup> et Cl <sup>-</sup> favorisant la déshydratation et l'acidose	
<i>LT (elt)</i>	plasmide	<i>Heat-labile toxin</i> : entérotoxine responsable de l'hyper excrétion de H <sub>2</sub> O, Na <sup>+</sup> et Cl <sup>-</sup> favorisant la déshydratation et l'acidose	Nagy 2005
<i>astA</i>	plasmide ou chromosome	<i>EAEC heat-stable enterotoxin (EASTI)</i> : entérotoxine associée aux EAEC, responsable de diarrhées aqueuses	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>hlyA</i>	plasmide	<i>alpha-hemolysin</i> : capable de lyser les lymphocytes et les érythrocytes	Lorenz <i>et al.</i> , 2013
<i>cnf1</i>	plasmide	<i>cytotoxic necrotizing factor</i> : lié aux cdt	Oloomi et Bouzari 2008
<i>cnf2</i>	plasmide	<i>cytotoxic necrotizing factor</i> : lié aux cdt	Oloomi et Bouzari 2008
<b>Effecteur non-LEE</b>			
<i>nleB (Z4328)</i>	OI-122	interfère avec la réponse immunitaire inflammatoire de l'hôte	Gao <i>et al.</i> , 2013
<i>nleE (Z4329)</i>	OI-122	inhibe la voie NF-Kappa-B	Vossenkaemper <i>et al.</i> , 2010
<i>nleF (Z6020)</i>	OI-71	colonisation du tube digestion des porcelets	Echtenkamp <i>et al.</i> , 2008
<i>nleG (Z6010)</i>	OI-71	activité ubiquitine ligase similaire à des enzymes eucaryotes	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>nleH1-2(Z6021)</i>	OI-71	protéine NleH kinase sérine-thréonine agit contre la réponse immunitaire innée de l'hôte	Holmes <i>et al.</i> , 2012
<i>nleA(Z6024)</i>	OI-71	perturbe la fonction de la barrière intestinale	Thanabalasuriar <i>et al.</i> , 2010
<i>nleC (Z0986)</i>	OI-36	supprime la réponse immunitaire inflammatoire de l'hôte	Sham <i>et al.</i> , 2011
<i>nleD(Z0990)</i>	OI-36	perturbe la fonction de la barrière intestinale	Long <i>et al.</i> , 2014
<i>nleG2 (Z2149/Z2339)</i>	OI-57	activité ubiquitine ligase similaire à des enzymes eucaryotes	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>nleG5-1</i>	OI-57	activité ubiquitine ligase similaire à des enzymes eucaryotes	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>nleG5-2 (Z2151)</i>	OI-57	activité ubiquitine ligase similaire à des enzymes eucaryotes	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>nleG6-2 (Z2150)</i>	OI-57	activité ubiquitine ligase similaire à des enzymes eucaryotes	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>nleH1-1(Z0989)</i>	OI-36	kinase sérine-thréonine agit contre la réponse immunitaire innée de l'hôte	Holmes <i>et al.</i> , 2012
<b>Résistance/ Persistence</b>			
<i>frerfkatP</i>	chromosome	catalase/péroxydase: protège contre les dommages oxydatifs	Heimer <i>et al.</i> , 2002

<i>pagC</i> (Z4321)	OI-122 (chromosome)	<i>pagC-like membrane protein /phoP-activated gene C</i> (PagC) : permet la survie dans les macrophages de <i>Salmonella enterica</i> responsable d'infection systémique chez le porc et l'Homme. <i>pagC</i> (Z4321) est la protéine homologue retrouvée chez les STEC	Nishio <i>et al.</i> , 2005
<i>ecfI</i>	plasmide O157	hydrolase présente sur un opéron qui améliore la structure de la membrane bactérienne par la biosynthèse de polysaccharide et impliquée dans l'invasion, spécifique aux STEC LEE-positifs	Yoon <i>et al.</i> , 2005
<i>terE</i> (Z1176)	OI-43-48 (chromosome)	enzyme impliquée dans la dégradation des tellurites	Orth <i>et al.</i> , 2007
<i>ureD</i> (Z1142)	OI-43-48 (chromosome)	uréase impliquée dans la dégradation de l'urée	Steyert et Kaper 2012
<i>espK</i> (Z1829)	prophage	<i>E. coli secreted protein</i> : intervenant dans la formation du piédestal chez O157	Vlisidou <i>et al.</i> , 2006
<i>espN</i>	prophage	<i>E. coli secreted protein</i> : impliquée dans la persistance des O157 au niveau de l'intestin chez les veaux	Vlisidou <i>et al.</i> , 2006
<i>aggR</i>	plasmide	régulateur de la transcription de nombreux gènes de virulence chez les EAEC	Morin <i>et al.</i> , 2013
<i>pic</i>	chromosome	sérine protéase impliquée dans la colonisation chez les EAEC	Harrington <i>et al.</i> , 2009
<i>irp2</i>	HPI ( <i>hight pathogenicity island</i> )	<i>iron responsible protein 2</i> : code une protéine ayant un rôle dans l'absorption du fer chez <i>Yersinia</i>	Gophna <i>et al.</i> , 2001
<i>fyuA</i>	HPI ( <i>hight pathogenicity island</i> )	<i>ferric yersiniabactin uptake A</i> : pour une protéine ayant un rôle dans l'absorption du fer chez <i>Yersinia</i>	Gophna <i>et al.</i> , 2001
<i>etpD</i>	plasmide O157	effecteur du système de sécrétion de type II en lien avec la sécrétion de StcE	Tseng <i>et al.</i> , 2014





## ***LISTE DES PUBLICATIONS***

Dans le cadre de cette thèse :

- **Balière C.**, A. Rincé, S. Delannoy, P. Fach, and M. Gourmelon, Molecular profiling of STEC and EPEC strains isolated from French coastal environments, (soumis à AEM).
- **Balière C.**, A. Rincé, J. Blanco, G. Dahbi, J. Harel, P. Vogeleer, J-C. Giard, P. Mariani-Kurdjian and M. Gourmelon, 2015, Prevalence and characterization of Shiga Toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds, *Front. Microbiol* 6, 1356.
- **Balière C.**, A. Rincé, D. Thevenot, and M. Gourmelon, 2015, Successful detection of pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish, environmental waters and sediment using the ISO/TS-13136 method, *Lett Appl Microbiol* 60, 315-320.

Antérieur à ces travaux :

- King, L. A., E. Loukiadis, P. Mariani-Kurkdjian, S. Haeghebaert, F-X. Weill, **C. Balière**, S. Ganet, M. Gouali, V. Vaillant, N. Pihier, H. Callon, R. Novo, O. Gaillot, D. Thevenot-Sergentet, E. Bingen, P. Chaud, and H. de Valk, 2014, Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011, *Clin Microbiol Infect* 20, O1136-1144.
- Monecke, S., P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen, F-X. Weill, **C. Balière**, P. Slickers, and R. Ehricht, 2011, Presence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* ST678/O104:H4 in France prior to 2011, *Appl Environ Microbiol* 77, 8784-8786.
- Monot, M., N. Honoré, **C. Balière**, B. Ji, S. Sow, P. J. Brennan, and S. T. Cole, 2008, Are variable-number tandem repeats appropriate for genotyping *Mycobacterium leprae* ?, *J Clin Microbiol* 46, 2291-2297.

## ***LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES***

- **Balière, C.**, Mariani-Kurkdjian, P., Thevenot, D., Rincé, A., Gourmelon, M. Evaluation of the presence of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and in coastal areas. SfAM-MVNA, Summer Conference, Zoonoses. 30 juin au 3 juillet 2014, Brighton, Angleterre.
- **Balière, C.**, Balière, Cl., Courroux, C., Mariani-Kurkdjian, P., Thevenot, D., Fach, P., Delannoy, S., Blanco, J., Dahbi, G., Rincé, A., Gourmelon, M. Prevalence and characterization of STEC in shellfish-harvesting areas and their upstream catchments during a two-year study in France. VTEC 2015 Satellite Symposia ó Food Safety from Farm and Field to Plate. 13 sept. 2015, Boston, Etat-Unis.
- M. Gourmelon, **C.Balière**, M.P.Caprais, J.Cozien, P.Garry, D.Hervio Heath, C.Hubert, J.C.Le Saux, S.Le Guyader, S.Lozach, S.Parnaudeau, E.Quenot, S.Strubia, A.Veron, Cl.Baliere, Q.Bruey, J.C.Giard, I.Rince, E.Jarde, L.Harrault., L.Jeanneau, P.Petitjean, J.Cheve, A.Rincé (2015). Recherche de bactéries potentiellement pathogènes et de norovirus dans de zones conchylicoles de Bretagne et Normandie et leurs bassins versants. Identification des sources de contamination fécale. Colloque Qualité et Sécurité des Produits Aquatiques QSPA, Boulogne-sur-Mer.
- M. Gourmelon, **C.Balière**, E.Quenot, J.Cozien, S.Lozach, M.P.Caprais, D.Hervio-Heath., J.C.Le Saux, S.Parnaudeau, S.Strubbia, S.Le Guyader, Cl.Balière, Q.Bruey, J.C.Giard, I. Rincé, E.Jardé, A. Rincé (2015). Occurrence of bacterial and viral enteric pathogens and marine bacteria and discrimination of faecal sources in shellfish-harvesting areas and their catchments in France. Congrès ICMSS2015, Chili.
- M. Gourmelon, **C.Balière**, E.Quenot, J.Cozien, S.Lozach, M.P.Caprais, D.Hervio-Heath., J.C.Le Saux Cl.Balière, Q.Bruey, J.C.Giard, I.Rincé, E.Jardé, S.LeHello, and A.Rincé (2014). Occurrence of bacterial enteric pathogens and discrimination of faecal sources in shellfish-harvesting areas and their catchments in France. Colloque Temp, Lisbonne.

## ***LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES***

- **Balière, C.**, Mariani-Kurkdjian, P., Thevenot, D., Rincé, A., Gourmelon, M. Evaluation de la présence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines dans des zones conchylicoles françaises et les bassins versants en amont. 6<sup>ème</sup> Colloque international francophone de microbiologie animale. 15&16 mai 2014, Toulouse, France.
- **Balière, C.**, Balière, Cl., Courroux, C., Mariani-Kurkdjian, P., Thevenot, D., Fach, P., Delannoy, S., Blanco, J., Dahbi, G., Rincé, A., Gourmelon, M. Prevalence and characterization of STEC in shellfish-harvesting areas and their upstream catchments during a two-year study in France. VTEC 2015 Satellite Symposia ó Food Safety from Farm and Field to Plate. 13 sept. 2015, Boston, Etat-Unis.

## ***Abstract***

The contamination of coastal areas by potentially pathogenic enteric bacteria is of concern for the sustainability of some uses, such as shellfish farming, recreational shellfish harvesting and bathing. The contamination of these environments may occur through the land-spreading of livestock wastes, animal feces deposited on pastures, wastewaters from slaughterhouses or from municipal wastewater treatment plants. The presence of these bacteria in coastal environment may present a potential risk to human health. In fact, shellfish-borne outbreaks or human infections may occur by the consumption of shellfish from contaminated areas or the ingestion of water during bathing in contaminated waters, respectively. To date, few studies focusing on the presence and the diversity of enteric bacteria, such as pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) in coastal environments and shellfish have been reported.

The PhD project aimed to (i) evaluate the presence of pathogenic *E. coli*, more precisely, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) in shellfish-harvesting areas and their upstream catchments, (ii) characterize the diversity of isolated STEC and EPEC, (iii) estimate the molecular risk assessment by screening 75 *E. coli* virulence-associated gene targets and then (iv) evaluate the contamination and depuration of oysters in contact with STEC.

For this purpose, during a 2-year study (February 2013 to January 2015), shellfish batches (n=238), freshwater (n=216), seawater (n=12), and surface sediment (n=39) samples from three selected shellfish-harvesting areas and their upstream catchments, were monthly analyzed to evaluate the presence of STEC and EPEC strains. Five percent of samples were positive for the isolation of at least one STEC and 14% for the isolation of at least one EPEC. Twenty-eight STEC and 89 EPEC strains were isolated representing 1% of the total *E. coli* (n=12 016). The isolated STEC and EPEC strains belonged to a high diversity with 75 different serotypes, 79 distinguishable PFGE patterns and 46 distinguishable sequence types. STEC and EPEC strains were distributed into 15 and 55 virulence profiles, respectively. One STEC strain isolated from a mussel batch, belonging to the serotype O26:H11 *stx1<sup>+</sup>eae<sup>+</sup>* displayed 45 additional virulence genes among the 75 investigated genes. Seventy-five percent of EPEC strains displayed between one and 19 virulence genes associated with pathogenicity islands specific to pathogenic *E. coli* involved in human infections.

No difference in the kinetics of the contamination and depuration of oysters by STEC and non-STEC *E. coli* was found.

To our knowledge, this study is the first to focus on the diversity of STEC and EPEC strains isolated from coastal environments. This study highlights the weak presence of STECs and EPECs in the French shellfish-harvesting areas studied and a potential pathogenicity of some strains. The low prevalence of STEC and EPEC strains in shellfish from B- and C-categories (depuration of shellfish before commercialization), as well as the decontamination of shellfish by STEC, fast and similar to that of non-pathogenic *E. coli*, is rather in favor of a limited risk of contamination of shellfish by STEC in the studied areas. The results obtained during this study are important to better understand the health risk associated with STEC and EPEC in coastal areas.

**Keywords :** STEC, EPEC, shellfish, diversity, virulence, persistence

## Résumé

La contamination des zones littorales par des bactéries entériques potentiellement pathogènes pour l'Homme constitue un problème majeur pour la pérennité de certains usages tels que la conchyliculture, la pêche à pied ou la baignade. Ces bactéries provenant de rejets urbains ou agricoles peuvent atteindre les zones conchylicoles ou de baignade et être impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) lors de la consommation de coquillages contaminés ou dans des infections par contact avec l'eau de baignade contaminée. Actuellement, très peu de données sont disponibles sur la présence et la diversité des bactéries entériques telles que les *Escherichia coli* (*E. coli*) pathogènes dans les coquillages en France.

Ce sujet de thèse a donc eu pour objectifs : i) d'évaluer la présence de *E. coli* pathogènes de type *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) et de *E. coli* entéropathogènes (EPEC) en zone littorale et plus précisément dans des zones conchylicoles et leurs bassins versants en amont, ii) de caractériser la diversité des souches STEC et de EPEC isolées, iii) d'estimer le risque pathogène de ces souches par la recherche de gènes de virulence et enfin iv) d'évaluer le comportement des souches STEC dans les coquillages par rapport à l'indicateur *E. coli*, vis-à-vis de la cinétique de contamination de décontamination des coquillages.

La présence des *E. coli* pathogènes a été recherchée sur une période de deux ans (Février 2013 à Janvier 2015) dans les coquillages (n=238) de trois zones conchylicoles situées en Bretagne et en Normandie ainsi que dans les eaux aux exutoires des bassins versants (n=216), dans le sédiment (n=39) et l'eau de mer (n=12). Cinq pourcents des échantillons ont permis l'isolement d'au moins une souche STEC et 14 % l'isolement d'au moins une souche EPEC. Un total de 28 souches STEC et 89 souches EPEC différentes ont été isolées dans ces échantillons, représentant 1 % de la totalité des souches *E. coli* isolées (n = 12 016).

Les souches STEC et EPEC isolées présentaient une grande diversité avec 75 sérotypes identifiés, 79 profils phylogénétiques différents et 46 profils ST (Sequence Type). Les souches STEC et EPEC isolées étaient réparties respectivement au sein de 15 et 55 profils de virulence différents. Une souche STEC de sérotype O26 :H11 *stxI*<sup>+</sup>*ee*<sup>+</sup> présentant 45 gènes de virulence sur les 75 gènes recherchés, a été isolée dans un lot de moule. Soixante-quinze pourcents des souches EPEC présentaient entre 1 et 19 gènes de virulence associés à des îlots de pathogénicités caractéristiques de souches *E. coli* pathogènes responsables d'infection grave chez l'Homme, révélant le potentiel pouvoir pathogène de certaines souches.

Enfin, l'étude de la cinétique de contamination de décontamination d'huîtres au contact de souches STEC isolées au cours de cette étude, n'a pas montré de différence de comportement comparé à un *E. coli* non STEC.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont à notre connaissance les premiers de ce genre. Ils ont permis de mettre en évidence la faible présence de STEC et de EPEC au niveau de zones conchylicoles françaises ainsi que le potentiel pouvoir pathogène de certaines souches. La faible prévalence de souches STEC et EPEC dans les coquillages issus des sites conchylicoles suivis de catégorie B ou C (purification des coquillages avant commercialisation) ainsi que la décontamination des coquillages par les STEC, rapide et similaire à celle des *E. coli* non pathogènes, est plutôt en faveur d'un risque faible de contamination par les STEC des coquillages dans les zones étudiées. Les résultats acquis au cours de cette thèse sont des éléments importants pour mieux appréhender le risque sanitaire lié aux STEC et aux EPEC en zone littorale.

**Mots clés :** STEC, EPEC, coquillages, diversité, virulence, persistance