

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* :

IV) Souches nécrotoxigènes

Mainil J., Van Bost S.

Département des maladies infectieuses et parasitaires – Bactériologie
Faculté de Médecine vétérinaire – Université de Liège – Sart Tilman, Bât B43a – B4000 Liège

Correspondance : Professeur Jacques Mainil
Tél: 00-32-(0)4/366 40 50 – Fax: 00-32-(0)4/366 42 61 – Email : jg.mainil@ulg.ac.be

RESUME : L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'homme et diverses espèces animales sur base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques qui sont responsables de leur pouvoir de virulence. Ces souches pathogènes sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal (entérotoxigènes, entéropathogènes, entérohémorragiques, vérotoxigènes et entéro-invasives) et en souches à tropisme extra-intestinal (uropathogènes et invasives). Les souches invasives provoquent des septicémies et/ou des bactériémies avec localisations dans différents organes (infections systémiques). Si les propriétés et facteurs spécifiques de virulence des souches à tropisme intestinal sont relativement bien connus et caractérisés, ceux des souches à tropisme extra-intestinal le sont beaucoup moins, surtout chez les animaux.

Le but de cette série d'articles de revue est de présenter les connaissances sur les propriétés et facteurs spécifiques des souches à tropisme extra-intestinal. Les trois premiers articles ont présenté les connaissances sur les adhésines et facteurs de colonisation, le franchissement des muqueuses, la survie dans le sang et les organes internes et les propriétés toxiques. Après une introduction sur l'ensemble des souches invasives humaines et animales d'*E. coli*, les connaissances actuelles sur les souches nécrotoxigènes seront présentées. Cette série d'articles de revue sur les souches invasives d'*E. coli* se termine par une réflexion philosophique sur la signification biologique du pouvoir pathogène en général.

LES SOUCHES INVASIVES

Les premières distinctions entre les différentes souches pathogènes d'*Escherichia coli* étaient basées sur leur tropisme clinique, permettant de séparer les souches à tropisme intestinal de celles à tropisme extra-intestinal (Neter, 1965). Par la suite, ces dernières furent à leur tour subdivisées en souches uropathogènes, responsables d'infections du tractus urinaire (cystites, pyélonéphrites), en souches mammopathogènes, responsables d'infections de la mammelle (mammites), et en souches invasives, responsables d'infections générali-

sées, de type septicémique, bactériémique ou systémique, avec localisations dans les organes internes (encéphalite, arthrites, pneumonie...). Dans chacun de ces groupes de souches pathogènes, diverses subdivisions supplémentaires existent, basées, cette fois-ci, sur les pathotypes, c'est-à-dire les propriétés directement ou indirectement liées à la virulence et au pouvoir pathogène.

Rappelons que ces propriétés permettent aux souches invasives d'*E. coli* de réaliser les quatre étapes suivantes dans leur relation avec l'hôte afin de pouvoir véritablement exercer leur

pouvoir pathogène (Mainil, 2003a; 2003b; Van Bost et Mainil, 2003 :

- i) la colonisation des surfaces muqueuses;
- ii) le franchissement de ces muqueuses;
- iii) la résistance aux défenses internes de l'organisme ;
- iv) la production d'un effet toxique.

Cependant, toutes les souches invasives d'*E. coli* ne possèdent pas l'information génétique leur permettant de réaliser ces quatre étapes. Parfois, l'une des deux propriétés principales associées à la survie aux défenses internes (production d'un

sidérophore, résistance au pouvoir bactéricide du complément) de l'hôte sera même absente (tout au moins les résultats des tests sont-ils négatifs). Selon leur pathotype, ces souches invasives seront donc plus ou moins pathogènes, utiliseront l'une ou l'autre porte d'entrée dans la circulation sanguine (intestin, amygdales, voire trachée), persisteront dans le sang et/ou les organes internes (poumons, rate, foie, reins, cerveau, articulations...), auront une action toxique directe (exotoxines) ou indirecte via la réaction inflammatoire ou les réponses immunes (endotoxine, antigènes de surface, superantigènes).

Les souches invasives bovines et porcines

Si les souches invasives ont été décrites dans les espèces bovine et porcine depuis longtemps, leurs facteurs et propriétés de virulence restent mal caractérisés (Fairbrother, 1993; Mainil, 1993; Fairbrother et Ngeleka, 1994; Wray et Woodward, 1997). A côté de la production d'aérobactine et, surtout, de la résistance à l'activité bactéricide du complément, les souches bovines et porcines produisent des adhésines de type fimbriaire des familles P et S. Le facteur de colonisation le mieux caractérisé de ces souches est l'adhésine F165, qui est composé de deux fimbriae de type P (F165-1 du sérotype F11) et de type S (F165-2 apparenté aux fimbriae F1C). Bien que divers sérotypes aient été décrits, les fimbriae de la famille P appartiennent le plus fréquemment au sérotype F11 et sont porteurs de l'adhésine PrsG (Dozois *et al.*, 1997; Fairbrother, communication personnelle). Récemment, d'autres fimbriae de la famille P ont été décrits, parmi lesquels le Pap_{31A}, du sérotype F11 aussi, mais porteur d'un nouveau variant d'adhésine PapGrs (Bertin *et al.*, 2000; Girardeau *et al.*, 2003). Les variants Sfa et F1C de la famille S ont aussi été identifiés (Dozois *et al.*, 1997; Fairbrother, communication personnelle).

Les adhésines fimbriaires de la famille F17 (variants F17b et F17c) et afimbriaires de la famille Afa (variant Afa-VIII) peuvent aussi être produites par des souches invasives bovines et porcines, à l'inverse des variants F17a et F17d qui semblent limités aux souches intestinales, pathogènes ou non. Les autres variants de la famille

Afa ne sont pas produits par des souches animales, mais bien par des souches humaines à tropisme intestinal ou extra-intestinal (Le Bouguéneq et Bertin, 1999).

Sur le plan des toxines, les principales sont les facteurs cytotoxiques nécrosants (voir chapitre suivant) et l'hémolysine α .

Les souches invasives humaines

Les souches invasives humaines sont probablement celles qui ont été le plus étudiées et caractérisées. Parmi elles, les souches responsables de méningites (NMEC ou «*Neonate Meningitidis-associated E. coli*»), entre autres chez les très jeunes enfants, ont reçu une attention particulière (Nataro et Levine, 1994; MacLaren, 1997; Sussman, 1997; Kim, 2002).

Comme les souches bovines et porcines, les souches invasives humaines produisent des adhésines fimbriaires des familles P (différents sérogroupes F) et S (Sfa et F1C). Les fimbriae P sont porteurs des adhésines de type PapGII ou PrsG. Si l'existence de fimbriae de la famille F17 est très limitée, celle d'adhésines afimbriaires de la famille Afa est importante avec la production de différents variants, y compris le variant Afa-VIII.

Les souches NMEC se singularisent par la production de l'adhésine Sfall et de l'antigène capsulaire K1, à propriétés anti-phagocytaires. Les principales toxines sont aussi les facteurs cytotoxiques nécrosants (voir chapitre suivant) et l'hémolysine α .

Les souches invasives des autres mammifères domestiques

Si des souches invasives ont été décrites dans les espèces canine, féline et, dans une moindre mesure, équine, leur facteurs de virulence restent mal connus, car peu de souches ont été caractérisées (Broes, 1993; Peeters, 1994; Beutin, 1999).

A côté de la production d'un sidérophore et de la résistance à l'activité bactéricide du complément, les principales données sont la production d'adhésines fimbriaires des familles P (porteurs d'une adhésine PrsG) et S (Sfa et/ou F1C). La proportion de souches NTEC parmi les souches extra-intestinales est apparemment aussi importante que dans d'autres espèces animales (voir chapitre suivant).

Les souches invasives des oiseaux

Les souches invasives sont extrêmement importantes en élevage avicole. Mais, comme pour les souches des autres espèces animales, les facteurs et propriétés de virulence d'une faible proportion sont connus: adhésines fimbriaires de la famille P dans 20 à 25% des souches (sérotype F11) et, dans 5% des souches, des familles S (variant AC/I, proche de SfaII), F17 (variants F17a et F17c) et Afa/ou (variant Afa-VIII) (Dho-Moulin, 1993; Gross, 1994; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Stordeur et Mainil, 2002; Stordeur *et al.*, 2002; Vandekerckhove *et al.*, 2003).

La production d'une hémagglutinine sensible à la température (Tsh: *Temperature Sensitive Hemagglutinin*) a aussi été mise en évidence. Son rôle serait de stimuler la réponse inflammatoire avec le dépôt de fibrine et le développement de lésions à hauteur des sacs aériens. Mais cette hémagglutinine ne jouerait aucun rôle dans la dissémination de l'infection (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Stordeur et Mainil, 2002; Vandekerckhove *et al.*, 2003).

Par contre, la production d'une toxine, CNF ou autre, reste anecdotique (Janssen *et al.*, 2001; Oswald et Blanco, communications personnelles). *In fine*, les deux principales propriétés des souches colibacillaires aviaires invasives sont la production d'un sidérophore et la résistance à l'activité bactéricide du complément.

LES SOUCHES NECROTOXINOGENES (NTEC)

Bien que les souches invasives d'*E. coli* soient peu classifiées sur base de leurs propriétés de virulence, la littérature fait une large place aux souches dites nécrotoxigènes depuis un dizaine d'années. Il nous a donc semblé utile de faire le point des connaissances sur ces souches, tant sur le plan bactériologique que clinique. Les souches nécrotoxigènes d'*E. coli* (*Necrotogenic Escherichia coli* ou NTEC) sont définies sur base de la production d'un facteur cytotoxique nécrosant, ou toxine CNF (Blanco *et al.*, 1993b). L'histoire des souches NTEC est, bien sûr, parallèle à celle des toxines CNF (Van Bost et Mainil, 2003). Rappelons que la première toxine CNF (CNF1) fut identifiée par une équipe italienne à partir

de souches d'*E. coli* isolées d'enfants souffrant de diarrhée, tandis que la deuxième (CNF2) le fut à partir de souches d'*E. coli* isolées de matières fécales de veaux diarrhéiques (Caprioli *et al.*, 1983; De Rycke *et al.*, 1987). Mais en réalité ces toxines CNF, tout au moins la toxine CNF2, avaient déjà été décrites dans les années '70 en Grande-Bretagne sous le nom de toxine Vir (Smith, 1974; 1975). De plus, il est aujourd'hui évident que ces souches étaient importantes cliniquement bien avant leur description et que certaines expériences avaient même été conduites dans les années '50 et '60 avec des souches NTEC1 ou NTEC2 (Van Bost *et al.*, 2001a).

Ce chapitre tente de faire le point des données cliniques et bactériologiques sur les souches NTEC d'origine humaine et animale.

Pathologies associées

Les souches NTEC1 ont été décrites chez tous les mammifères domestiques et sauvages, pour peu qu'on les ait recherchées, mais beaucoup moins fréquemment chez les oiseaux, tandis que les souches NTEC2 sont plutôt confinées aux ruminants, même s'il est arrivé de les isoler d'autres sources. Chez ces hôtes, les souches NTEC1 et NTEC2 sont associées à diverses pathologies digestives, urinaires et systémiques (De Rycke *et al.*, 1999; Beutin, 1999; Mainil, 2000).

Chez les ruminants

Chez les ruminants, des souches NTEC1 et NTEC2 sont isolées fréquemment en association à des troubles cliniques. On considère que l'ensemble des souches NTEC représentent 10 à 50% des colibacilloses invasives et 5 à 20% des colibacilloses digestives chez les bovins (De Rycke *et al.*, 1999; Mainil, 2000). Chez les petits ruminants, des souches NTEC1 et NTEC2 ont aussi été associées à des troubles digestifs et septicémiques, mais les études publiées sont plus rares (Smith, 1974; 1978; Blanco *et al.*, 1996; Cid *et al.*, 1996).

Souches NTEC2

Le rôle des souches NTEC2 dans des infections septicémiques chez les veaux et les agneaux nouveau-nés est attesté depuis les travaux de H.W. Smith (Smith, 1974; 1975; 1978), mais elles sont aussi associées à ce

genre de problème clinique chez des animaux adultes (De Rycke *et al.*, 1999; Mainil, 2000). Si des données épidémiologiques rendent les souches NTEC2 également responsables de troubles diarrhéiques chez ces animaux (De Rycke *et al.*, 1987; 1999; Blanco *et al.*, 1996; Cid *et al.*, 1996; Orden *et al.*, 1999), leur prévalence fécale, qui peut atteindre 50% chez les individus sains, amène à s'interroger sur leur véritable rôle dans les pathologies digestives (Burns *et al.*, 1996; Pohl *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1998a; 1998b; De Rycke *et al.*, 1999; Osek, 2001). Signalons aussi la description de souches NTEC2 dans les multiples pathotypes de souches isolées de mammites chez les vaches (Burns *et al.*, 1996; Kaipainen *et al.*, 2002).

Suite à des expériences récentes, il est permis d'affirmer que les souches NTEC2 peuvent effectivement provoquer des infections systémiques avec localisation fréquente aux poumons, ainsi que de la diarrhée chez le veau (Van Bost et Mainil, 1999; Van Bost *et al.*, 2001b). De plus, certaines expériences anciennes de reproduction de septicémie chez les veaux (Schoenaers et Kaeckenbeeck, 1964) avaient été conduites avec des souches d'*E. coli*, qui sont positives pour le gène de la toxine CNF2 (Van Bost *et al.*, 2001a). Mais le pouvoir pathogène de ces souches reste lié à l'existence de circonstances favorisantes (absence de flore commensale, peu ou pas de colostrum...), ce qui ne réduit en rien leur rôle lorsque ces circonstances existent.

Souches NTEC1

Les données sur les souches NTEC1 chez les ruminants sont plus rares que celles sur les souches NTEC2 et ces souches paraissent moins répandues. Les souches NTEC1 sont associées à des infections septicémiques et systémiques chez des veaux nouveau-nés essentiellement, ainsi qu'à des problèmes d'entérite muqueuse ou hémorragique chez des veaux et à des mammites chez des vaches adultes (Wray *et al.*, 1992; Lipman *et al.*, 1995; Burns *et al.*, 1996; De Rycke *et al.*, 1999; Orden *et al.*, 1999; Van Bost *et al.*, 2001a; Kaipainen *et al.*, 2002). Elles sont aussi isolées d'animaux en bonne santé, mais moins fréquemment que les souches NTEC2 (Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998a; 1998b).

L'affirmation définitive de leur rôle ne pourra provenir que d'infections expérimentales qui n'ont pas encore été réalisées chez les ruminants. La seule expérience réalisée *in vivo* consiste en l'injection intraveineuse de toxine CNF1 à des agneaux avec, comme résultat, la production d'œdème et d'hémorragies dans le système nerveux central (De Rycke et Plassiart, 1990).

Chez les porcs

La première mention de souches NTEC chez le porc remonte à 1986 (Mc Laren et Wray, 1986). Les troubles cliniques associés aux souches NTEC1, les seules souches NTEC isolées du porc, sont des pathologies septicémiques, systémiques et intestinales. Les souches NTEC1 représentent 1 à 10% des colibacilloses chez les porcelets, mais le portage intestinal chez des animaux sains est élevé, posant à nouveau la question de leur rôle exact (Garabal *et al.*, 1995; Dozois *et al.*, 1997; De Rycke *et al.*, 1999). Des troubles digestifs avec des lésions d'entérites et des infections généralisées avec localisation fréquente aux poumons ont cependant été reproduits expérimentalement apportant une réponse positive, tout en démontrant aussi l'importance de circonstances favorisantes (Wray *et al.*, 1993; Clément, 1997; Fournut *et al.*, 2000).

Chez les carnivores

Les chiens et chats domestiques sont aussi des hôtes de souches NTEC1 (Beutin, 1999; De Rycke *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2000) et de très rares souches NTEC2 (Blanco *et al.*, 1993a; Pohl *et al.*, 1993a; Mainil *et al.*, 1998; 2001). Ces souches sont associées à des troubles digestifs, urinaires, septicémiques et systémiques. Les souches NTEC1 ont aussi été isolées à partir de matières fécales de chiens et chats en bonne santé et jusqu'à 50% des chats peuvent en être porteurs (Blanco *et al.*, 1993a; Beutin, 1999; De Rycke *et al.*, 1999; Féria *et al.*, 2001).

Les infections du tractus urogénital sont des cystites, des pyélonéphrites, des prostatites, des métrites, éventuellement en association avec des avortements; les septicémies sont observées essentiellement chez les nouveau-nés et les jeunes animaux. Les troubles digestifs ne présentent aucune particularité, tant qu'il n'y a pas de présence d'autres pathogènes viraux ou bactéri-

riens. Aucune reproduction expérimentale n'a été tentée à ce jour.

Chez les autres mammifères domestiques

Des souches NTEC1 ont été isolées de problèmes d'entérites hémorragiques ou non, éventuellement mortelles, chez des chevaux et des lapins (Ansuini *et al.*, 1994). Une souche NTEC2 a aussi été isolée d'un cas de métrite chez une jument (Pohl *et al.*, 1993a).

Chez l'homme

Si les souches NTEC1 ont été décrites pour la première fois dans des matières fécales d'enfants souffrant de diarrhée et restent associées à des entérites et des diarrhées chez des bébés et de jeunes enfants de par le monde (Caprioli *et al.*, 1983; Nataro et Kaper, 1998; De Rycke *et al.*, 1999), elles sont plus connues comme agents d'infections du tractus urogénital: cystites, pyélonéphrites, prostatites; et d'infections systémiques (Donnenberg et Welch, 1996; Johnson, 1997; De Rycke *et al.*, 1999; Landraud *et al.*, 2000).

Faute de reproduction expérimentale, l'implication des souches NTEC1 dans une quelconque pathologie reste basée sur des données épidémiologiques: 40 à 50% des colibacilloses isolés d'infections du tractus urinaire, ainsi que d'autres types d'infections extra-intestinales sont des souches NTEC1.

Chez les oiseaux

Jusqu'à récemment (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999), les souches NTEC semblaient absentes chez les oiseaux. Quelques souches NTEC1 (< 1%) ont cependant été détectées dans des collections de souches isolées de cas de colibacilloses invasives chez la volaille (Janssen *et al.*, 2001; Oswald et Blanco, communications personnelles).

Propriétés générales et potentielles de virulence

S'il est aujourd'hui évident que les souches NTEC1 et NTEC2 sont responsables de divers types d'infections intestinales et extra-intestinales, le rôle exact des toxines CNF1 et CNF2 reste indéfini (Van Bost et Mainil, 2003). Il est donc logique de s'attendre à ce que les souches NTEC possèdent d'autres propriétés poten-

tielles de virulence: propriétés de colonisation des muqueuses, de survie dans le sang et les organes internes et même de production d'autres toxines.

Souches NTEC2

Si beaucoup de souches NTEC2 isolées de bovins appartiennent aux sérogroupes O1, O2, O3, O4, O15, O55, O78, O88 et O123, qui reprennent les principaux sérogroupes des *E. coli* septicémiques bovins (Sojka, 1965; Gay et Besser, 1994; Wray et Woodward, 1997), bien d'autres appartiennent à des sérogroupes somatiques différents (Oswald *et al.*, 1991; Blanco *et al.*, 1993b; 1996; 1998a; 1998b; De Rycke *et al.*, 1999; Mainil *et al.*, 1999).

Plus de la moitié des souches NTEC2 bovines et ovines possèdent des séquences génétiques qui codent pour la production d'une adhésine fimbriaire de la famille F17, leur permettant d'adhérer aux villosités intestinales de veaux *in vitro* (Morris *et al.*, 1982; Oswald *et al.*, 1991; Mainil *et al.*, 1997; 1999). Dans une moitié seulement de ces souches, l'adhésine F17-like est antigéniquement ou génétiquement identique aux variants F17b ou F17c (Oswald *et al.*, 1991; El Mazouari *et al.*, 1994; Bertin *et al.*, 1996a; 1996b; Mainil *et al.*, 2000). Les variants F17a et F17d sont absents, ou très rares, parmi les souches NTEC2 (Bertin *et al.*, 1996a; 1996b; Mainil *et al.*, 2000), ce qui signifie que la moitié des souches NTEC2 possède un variant F17 non identifié à ce jour.

D'autre part, un quart à 40% des souches NTEC2 bovines possèdent des séquences génétiques qui codent pour une adhésine afimbriaire de la famille Afa, le variant *afa-8*, en combinaison avec un variant F17 dans la moitié de ces souches (Mainil *et al.*, 1997; Lalioui *et al.*, 1999; Mainil *et al.*, 1999; Gérardin *et al.*, 2000). Les autres souches NTEC2 bovines ne produisent pas les adhésines F17 ou Afa-VIII, ni les adhésines F4, F5, F6 ou F41 des souches entérotoxigènes bovines et porcines, mais certaines sont positives pour la présence de séquences génétiques qui codent pour la production d'une adhésine fimbriaire des familles P ou S (Oswald *et al.*, 1991; Mainil *et al.*, 1997; 1999).

Si une grande majorité des souches NTEC2 résistent à l'action bactéricide du sérum ou sont positives phénotypiquement ou génétiquement pour la

toxine CDT-III, seulement une moitié produit une aérobactine (Smith, 1978; Woolcock, 1988; Oswald *et al.*, 1991; Hancock et Piers, 1994; Mainil *et al.*, 1999; 2003). Les productions de colicines ou d'hémolysines (α , β , ou Ent) sont encore moins fréquentes (un tiers des souches) (Oswald *et al.*, 1991; Mainil *et al.*, 1999).

Les gènes qui codent pour ces différentes propriétés peuvent être localisés sur le plasmide Vir, porteur du gène *cnf2* (Smith, 1974; Binns *et al.*, 1979; Williams, 1979; Morris *et al.*, 1982; Taylor, 1988; Oswald *et al.*, 1989; 1994a; Mainil *et al.*, 1997; De Rycke *et al.*, 1999; Gérardin *et al.*, 2000; Mainil *et al.*, 2000; Oswald, communication personnelle).

En conclusion, si certaines souches NTEC2 paraissent posséder tous les attributs de colibacilles invasifs, ces souches sont relativement hétérogènes. La localisation plasmidique de la plupart des gènes codant pour les propriétés potentielles de virulence de ces souches pourrait être à l'origine de cette hétérogénéité. Il est donc possible d'imaginer qu'il existe des souches NTEC2 aux pouvoirs pathogènes différents et même d'autres, non pathogènes.

Souches NTEC1

Même si les connaissances sont très inégales en fonction de l'hôte, les souches NTEC1 donnent, dans leur ensemble, une image plus homogène que les souches NTEC2, de souches à tropisme extra-intestinal, invasif et urinaire. Elles sont, en effet, majoritairement positives pour les adhésines fimbriaires P (PapGII ou PapGIII) et/ou S (Sfa et/ou FIC), pour une hémolysine (surtout α ou β) et pour la résistance à l'activité bactéricide du sérum. Les résultats sont plus variables pour la production d'une aérobactine. Cette relative homogénéité peut, en partie, s'expliquer par la localisation de la plupart des gènes respectifs sur le chromosome bactérien, notamment ceux qui codent pour la toxine CNF1, l'hémolysine α et l'adhésine fimbriaire de la famille P sur l'îlot de pathogénicité Pai-5 (Blum *et al.*, 1995; Nougayrède *et al.*, 1996; Dozois et Curtiss, 1999; Hacker et Kaper, 2000).

Chez l'homme

Les souches NTEC1 humaines appartiennent principalement aux sérogroupes O2, O4, O6, O75, O78 et O85

(De Rycke *et al.*, 1999; Mainil *et al.*, 1999).

Dès les premières descriptions des souches NTEC1, une association élevée (>80 %) avec la production de fimbriae de la famille P (Pap/Prs), porteurs surtout du variant PapGIII (PrsG) de l'adhésine, et d'une hémolysine (α , β ou Ent) a été observée. Cette association est la conséquence de la localisation des gènes codant pour la toxine CNF1, l'hémolysine α et le fimbriaire P sur l'îlot de pathogénicité, Pai-5 (Blum *et al.*, 1995; Donnenberg et Welch, 1996; Nougayrède *et al.*, 1996; Johnson, 1997; De Rycke *et al.*, 1999; Dozois et Curtiss, 1999; Mainil *et al.*, 1999; Hacker et Kaper, 2000; Landraud *et al.*, 2000).

Si une majorité de souches (>85 %) sont aussi positives phénotypiquement ou génétiquement pour des fimbriae de la famille S (Sfa ou FIC) et pour la résistance à l'activité bactéricide du complément, seulement une moitié l'est pour la production d'une aéro-bactine et un tiers pour celle d'une colicine (Blanco *et al.*, 1990; 1994; De Rycke *et al.*, 1999; Mainil *et al.*, 1999; Landraud *et al.*, 2000). Inversement, une minorité de souches NTEC1 humaines (<15 %) sont positives phénotypiquement ou génétiquement pour les adhésines F17 ou Afa et pour une toxine CDT (Mainil *et al.*, 1999; 2003; Toth *et al.*, 2003).

Chez les bovins

Les souches NTEC1 bovines étudiées appartiennent surtout aux sérogroupes O4, O6, O8, O78 et O153, mais divers autres sérogroupes ont aussi été détectés (Pohl *et al.*, 1992a; Blanco *et al.*, 1993b; Burns *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998a; 1998b; Mainil *et al.*, 1999). Comme pour les souches NTEC1 humaines, une majorité des souches NTEC1 bovines (75 à 95 %) sont positives phénotypiquement ou génétiquement pour une adhésine fimbriaire de la famille P (PapGII ou PapGIII) appartenant à différents variants antigéniques, une hémolysine (α , β ou Ent) et la résistance à l'action bactéricide du sérum, mais moins de la moitié le sont pour une adhésine fimbriaire de la famille S (Sfa et/ou FIC), un tiers, pour une colicine et une minorité (4 %), pour une toxine CDT. Par contre, elles sont beaucoup plus fréquemment (80 %) positives pour la production d'une aéro-bactine (Pohl *et al.*, 1992a; Mainil *et al.*, 1997; 1999; 2003; Toth *et al.*, 2003; Fairbrother,

communication personnelle).

Certaines autres adhésines, telles que F17, F6 ou CS31A, ont été décrites épisodiquement (Bertin *et al.*, 1998; Wray *et al.*, 1992; Mainil *et al.*, 1999; 2000; 2003). Par contre, les adhésines afimbriaires Afa-VIII sont plus fréquentes que dans les souches humaines (20 à 50 %) (Mainil *et al.*, 1997; 1999; Gérardin *et al.*, 2000).

Chez les porcs

Les souches NTEC1 porcines appartiennent à un nombre assez élevé de sérogroupes dont les plus fréquents sont: O2, O4, O8, O54, O78 et O85. Elles sont aussi très fréquemment (77 à 96 %) positives phénotypiquement ou génétiquement pour une adhésine fimbriaire des familles P (PapGII ou PapGIII), appartenant à différents variants antigéniques, et S (Sfa et/ou FIC), une hémolysine (α , β ou Ent) et pour la résistance au sérum. Deux tiers d'entre elles produisent une aéro-bactine et un tiers une colicine. Par contre, une minorité (7 à 12 %) est positive pour les adhésines F17, Afa-VIII et/ou une toxine CDT (Mc Laren et Wray, 1986; Pohl *et al.*, 1993a; Garabal *et al.*, 1995; 1996; Penrith *et al.*, 1995; Dozois *et al.*, 1997; Mainil *et al.*, 1999; 2000; 2003; Gérardin *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2003; Fairbrother, communication personnelle).

Chez les carnivores

Même si diverses enquêtes ont été publiées, les données sur les souches NTEC1 isolées de chiens et chats ne concernent que des petits nombres de souches, à une exception près. Les principaux sérogroupes sont O2, O4, O6 et O23, et les principales adhésines (>80 % des souches) appartiennent aux familles P (PapGIII) et S (Sfa et/ou FIC). La production d'une hémolysine (α , β ou Ent) est aussi très répandue (>90 % des souches), ainsi que la résistance à l'activité bactéricide du complément. Par contre, les résultats concernant la production d'aéro-bactine sont très variables d'une enquête à l'autre. Comme pour les souches NTEC1 de l'homme et des animaux de rente, une minorité (<25 %) de souches canines et félines sont phénotypiquement ou génétiquement positives pour une colicine, une toxine CDT ou les adhésines F17 et Afa-VIII (Prada *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992b; 1993a; Blanco *et al.*, 1993a; Mainil *et al.*, 1998; Yuri *et al.*, 1998; Beutin, 1999; Mainil *et al.*, 2001).

Spécificité d'hôte

Si les souches NTEC2 ont un spectre d'hôte limité, à de très rares exceptions près, aux ruminants, leur spécificité au sein de ce groupe d'animaux n'a pas été étudiée, à notre connaissance.

La question de la spécificité d'hôte des souches NTEC1 est totalement ouverte. En effet, les souches NTEC1 bovines, humaines, porcines, canines et félines partagent diverses propriétés. Mais aucune donnée épidémiologique, ni expérimentale n'est venue jusqu'à présent étayer la possibilité théorique d'infections croisées.

Approches diagnostiques

Le diagnostic des souches NTEC1 et NTEC2 est avant tout basé sur la mise en évidence de la production des toxines CNF1 ou CNF2 par des tests, à partir d'extraits bactériens, de cytotoxicité avec neutralisation spécifique (Caprioli *et al.*, 1983; De Rycke *et al.*, 1987; 1990), dermonécrotiques chez l'animal (De Rycke *et al.*, 1989; 1990), ou ELISA (Tabouret et De Rycke, 1990; Oswald *et al.*, 1994b).

Aucun autre test ne peut, à ce jour, remplacer la mise en évidence des toxines CNF1 et CNF2. Si, par exemple, la grande majorité des souches NTEC1 produit une hémolysine α , l'inverse n'est pas vrai et de nombreuses souches hémolytiques ne sont pas des souches NTEC1 (Pohl *et al.*, 1993b; Blanco *et al.*, 1997). Des résultats identiques ont été obtenus par une approche de biotypie, comme la fermentation du sorbose (Pohl *et al.*, 1993b; Mainil *et al.*, 1999; 2001). Quant au sérotypage, les résultats obtenus sur les souches NTEC1 et NTEC2 étaient trop hétérogènes (Oswald *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992a; Blanco *et al.*, 1993b; Mainil *et al.*, 1999; 2001).

Des tests génétiques au moyen de sondes ou de PCR ont également été développés après le clonage et le séquençage des gènes respectifs (voir listes dans Mainil, 2003a; 2003b; Van Bost et Mainil, 2003). Les réactions PCR pour les gènes *cnf*, *cdt*, *hly*, *pap/prs*, *sfal/foc*, *f17*, *afa*, *iut*, *iss*, *traT*, *ompA*, peuvent être accomplies, séparément ou en multiplexes pour la caractérisation complète des souches NTEC. D'autres tests PCR permettant de typer les variants des propriétés mises en évidence peuvent être utilisés dans une seconde étape (Le

Bouguéneq *et al.*, 1992; Johnson et Brown, 1996; Paton et Paton, 1998; Le Bouguéneq et Bertin, 1999; Johnson et Stell, 2000; Pfaff-Mc Donough *et al.*, 2000; Féria *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2001; Kaipainen *et al.*, 2002; Girardeau *et al.*, 2003; Van Bost *et al.*, 2003).

DISCUSSION GENERALE

Ces travaux amènent inévitablement à s'interroger sur la signification du pouvoir pathogène des bactéries invasives.

Avantage du pouvoir pathogène

Si personne n'a de difficultés à comprendre les facultés d'adaptation et d'évolution des bactéries face à des pressions de sélection négative, comme la présence d'antibiotiques, peu de monde saisit que les mêmes bactéries peuvent s'adapter et évoluer, d'une manière tout à fait parallèle, dans le domaine du pouvoir pathogène. Une des raisons est probablement que ce pouvoir pathogène est néfaste pour l'hôte. Et pourtant, ces deux schémas évolutifs procèdent de la même manière : ils bénéficient tous deux de la plasticité du génome bactérien, tout particulièrement de celui des entérobactéries, dont *E. coli* (Hartl et Sawyer, 1988; Lupski et Feigin, 1988; Mazodier et Davies, 1991). Différents éléments du génome bactérien (plasmides, transposons, îlots de pathogénicité...) qui sont, en fait, autant d'outils d'ingénierie génétique, au moins aussi performants que ceux construits par l'homme au laboratoire, ont joué, et jouent encore, un grand rôle dans l'évolution des bactéries, existent certainement depuis des milliards d'années (Cornélis, 1982; Bergthorsson et Ochman, 1998; Couturier *et al.*, 1988; Snyder et Champness, 1997a; 1997b; 1997c; Dozois et Curtiss, 1999; Hacker et Kaper, 2000; Saunders, 2000; Toth, 2000).

Prenons, comme point de départ, un colibacille non pathogène. Il vit au contact d'êtres pluricellulaires, dans une des cavités de son hôte. Il effectue nombre d'échanges génétiques avec d'autres procaryotes, ainsi qu'avec les cellules eucaryotes de son hôte. Cette évolution semble s'être accomplie dans certaines lignées (clones ?) seulement de l'espèce *E. coli*, dans lesquelles ces séquences d'origine étrangère ont pu se maintenir, au contraire

d'autres lignées. Ces lignées auront, par la suite, divergé (Johnson, 2002). Le hasard permet à ce colibacille d'acquérir une propriété lui conférant un avantage pour persister chez l'hôte. Le voilà capable de s'accrocher aux cellules intestinales, puis de franchir les muqueuses. Quelques milliers de générations plus tard, le colibacille se sera aussi adapté aux défenses internes de l'hôte et pourra résister au complément, hydrolyser des immunoglobulines, s'approvisionner en fer... Finalement, l'acquisition de certains gènes a pour conséquence la production de molécules à effet toxique direct sur les cellules de l'hôte.

Ce dernier point est très intrigant. En effet, si l'on comprend l'avantage sélectif que tire une bactérie des possibilités de survivre dans une des cavités de l'hôte, pourquoi l'intoxiquer, pourquoi le détruire ? En réalité, la question de l'avantage du pouvoir pathogène ne se pose que de notre point de vue. Les signes cliniques (diarrhée, jetage, toux, pollakiurie, avortement, fistulisation...) sont des moyens de dissémination de la bactérie pathogène à l'extérieur de l'organisme et de rencontre avec un nouvel hôte. Même la mort de l'hôte présente un double avantage : il a fini de se débattre, de se défendre, tout en gardant ses propriétés nutritives. Puis, suite à la décomposition du cadavre, les bactéries emprisonnées dans le sang et les organes internes sont libérées à leur tour et peuvent se propager à d'autres hôtes (charognards, pica...).

Le pouvoir pathogène des souches invasives

Pour revenir aux souches NTEC, il est fascinant de constater que l'on peut dégager des images relativement homogènes des souches à tropisme intestinal, alors que l'image des souches invasives reste encore et toujours imprécise.

Une explication pourrait être que les souches à tropisme intestinal représentent des souches au pouvoir pathogène ciblé sur un organe, un type de tissu et un type cellulaire, à l'opposé des souches invasives, dont le pouvoir pathogène s'étend sur un « territoire » plus grand et varié. Certaines propriétés (figure 1) doivent, bien sûr, être présentes pour rendre ces souches pathogènes (résistance au sérum et approvisionnement en fer), mais d'autres modulent ce pouvoir pathogène et l'adaptent aux circonstances extérieures : niveau d'immunité systémique, intégrité des muqueuses, perturbation ou absence de flore résidente, existence de plaies (ombilic)... De telle sorte que les tableaux cliniques varieraient en fonction des associations de propriétés bactériennes (septicémie, bactériémie, méningite, arthrites, pyélonéphrites, cystites), ainsi que les voies d'entrée (amygdales, intestins, poumons, reins, plaie ombilicale, plaies accidentelles). La conjonction de ces propriétés de base et des circonstances extérieures devrait atteindre un « seuil critique » pour qu'une pathologie se déclenche.

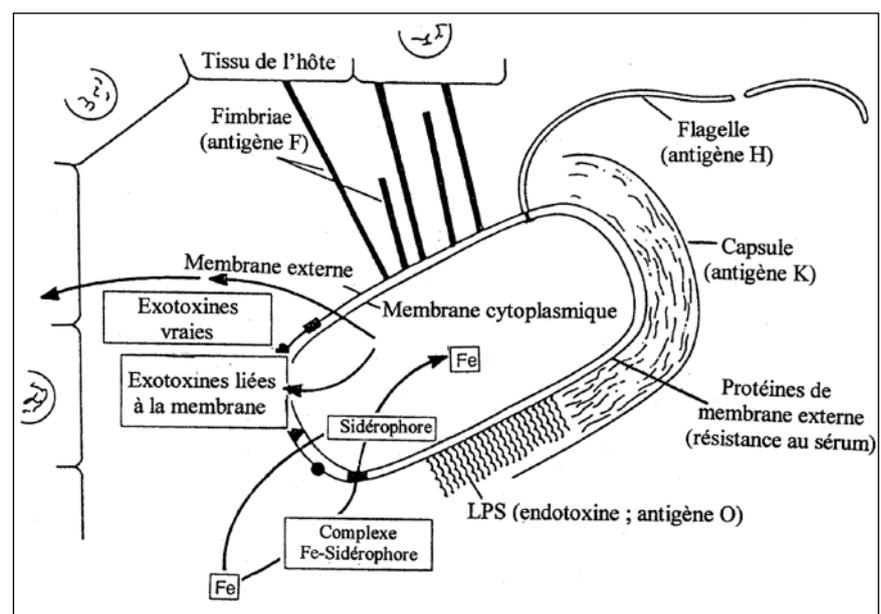


Figure 1. Résumé schématique des propriétés potentielles de virulence des souches invasives d'*Escherichia coli* (adapté de Johnson, 1991).

Si cette hypothèse s'avérait fondée, il serait dès lors inutile d'espérer déceler une image commune à toutes ces souches extra-intestinales isolées à partir du sang ou d'un organe interne et les résultats des tests ne feraient que confirmer l'hétérogénéité des propriétés de ces souches sans apporter d'autres éléments. Des données compatibles avec cette hypothèse ont été obtenues pour des souches bovines de colibacilles isolées d'hémocultures (Fecteau *et al.*, 2001) et pour les souches pathogènes aviaires d'*E. coli* (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Janssen *et al.*, 2001; Stordeur *et al.*, 2002). Effectuer ces tests sur des souches invasives paraît donc peu intéressant tant qu'une classification plus détaillée des souches invasives n'aura pas été réalisée sur des collections prélevées dans des conditions répondant aux critères d'un échantillonnage statistiquement valable.

De plus, l'étude *in vivo* de chacune de ces propriétés s'avèrerait une impossibilité expérimentale, puisque leur rôle respectif ne serait décelable que lorsque des circonstances bien particulières (que nous ne connaissons pas souvent!) leur permettant d'exprimer pleinement leur virulence seraient présentes.

REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés sur les souches NTEC2 ont bénéficié de l'appui financier de la Commission Européenne (Action à frais partagés FAIR3-CT96-1335) de 1997 à 1999 et de la DGVI du Ministère fédéral de l'Agriculture (Convention de Recherches 5936) en 2000/2001.

Virulence factors and specific properties of invasive *Escherichia coli* :

IV) Necrotoxigenic strains

SUMMARY

Escherichia coli bacterial species is subdivided into several pathogen strains in man and animals, on the basis of their specific properties and factors which are responsible for their virulence. The pathogenic strains are classically subdivided into strains with intestinal tropism (enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohaemorrhagic, verotoxigenic and enteroinvasive) and with extraintestinal tro-

pism (uropathogenic and invasive). Invasive strains cause septicemia and/or bacteraemia with localisations in different internal organs (systemic infections). If specific virulence properties and factors of strains with intestinal tropism are quite well known and described, those of strains with extraintestinal tropism are much less characterised, especially in animals.

The purpose of this series of review articles is to present the current knowledge on specific properties and factors of extraintestinal strains. The first three manuscripts reviewed the characteristics of adhesins and colonisation factors, transmucosal transfer, survival in blood and internal organs, and toxicity. After the presentation of the animal and human invasive *E. coli*, this fourth manuscript reviews the current knowledge on the necrotoxigenic strains and finishes with a discussion on the meaning of the bacterial virulence in general.

BIBLIOGRAPHIE

- ANSUINI A., CANDOTTI P., VECCHI G., FALBO V., MINELLI F., CAPRIOLI A. Necrotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits and horses. *Vet. Rec.*, 1994, **134**, 608.
- BERGTHORSSON U., OCHMAN H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.*, 1998, **15**, 6-16.
- BERTIN Y., GIRARDEAU J.P., DARFEUILLE-MICHAUD A., CONTREPOIS M. Characterization of 20K, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infect. Immun.*, 1996a, **64**, 332-342.
- BERTIN Y., MARTIN C., OSWALD E., GIRARDEAU J.P. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1996b, **34**, 2921-2928.
- BERTIN Y., MARTIN C., GIRARDEAU J.P., POHL P., CONTREPOIS M. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol. Letters*, 1998, **162**, 235-239.
- BERTIN Y., GIRARDEAU J.P., DARFEUILLE-MICHAUD A., MARTIN C. Epidemiological study of *pap* genes among diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of P_{31A} fimbriae. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 1502-1509.
- BEUTIN L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 285-298.
- BINNS M.M., DAVIS D.L., HARDY K.G. Cloned fragments of the plasmid Col V, I - K94. *Nature*, 1979, **279**, 778-781.
- BLANCO J., ALONSO M.P., GONZALEZ E.A., BLANCO M., GARABAL J.I. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor (CNF) by P-fimbriated strains. *J. Med. Microbiol.*, 1990, **31**, 175-183.
- BLANCO J., BLANCO M., WONG I., BLANCO J.E. Haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy cats produce cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Vet. Microbiol.*, 1993a, **38**, 157-165.

- BLANCO J., CID D., BLANCO J.E., BLANCO M., RUIZ SANTA QUITEIRA J.A., DE LA FUENTE R. Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain. *Vet. Microbiol.*, 1996, **49**, 209-217.
- BLANCO J.E., BLANCO J., BLANCO M., ALONSO M.P., JANSEN W.H. Serotypes of CNF1-producing *Escherichia coli* strains that cause extraintestinal infections in humans. *Eur. J. Epidemiol.*, 1994, **10**, 707-711.
- BLANCO M., BLANCO J., BLANCO J.E., RAMOS J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.*, 1993b, **54**, 1446-1451.
- BLANCO M., BLANCO J.E., ALONSO M.P., MORA A., BALSALLOBRE C., MUNOA F., JUAREZ A., BLANCO J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res. Microbiol.*, 1997, **148**, 745-755.
- BLANCO M., BLANCO J., MORA A., BLANCO J.E. Distribution and characterization of faecal necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ isolated from healthy cows and calves. *Vet. Microbiol.*, 1998a, **59**, 183-192.
- BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A., BLANCO J. Prevalence and characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ in healthy cattle. *Res. Microbiol.*, 1998b, **149**, 47-53.
- BLUM G., FALBO V., CAPRIOLI A., MACKER J. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs fimbriae and alpha-haemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* J96. *FEMS Microbiol. Letters*, 1995, **126**, 189-196.
- BROES A. Les *Escherichia coli* pathogènes du chien et du chat. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 377-384.
- BURNS A.L., BALL H.J., FINLAY D.A. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. *Vet. Microbiol.*, 1996, **49**, 235-241.
- CAPRIOLI A., FALBO V., RODA L.G., RUGGERI F.M., ZONA C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.*, 1983, **39**, 1300-1306.
- CID D., BLANCO M., BLANCO J.E., RUIZ SANTA QUITEIRA J.A., DE LA FUENTE R., BLANCO J. Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic goats in Spain. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 349-354.
- CLEMENT S. Etude de pathogénèse d'une souche d'*Escherichia coli* produisant CNF1 par l'infection expérimentale de porcelets. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (MSc) en Sciences vétérinaires, Option Microbiologie. Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, St Hyacinthe, Québec, Canada, Octobre 1997, 65 pages.
- CORNELIS G. Les transposons et séquences d'insertion. *Bull. Inst. Pasteur*, 1982, **80**, 3-59.
- COUTURIER M., BEX F., BERGQUIST P.L., MAAS W.K. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.*, 1988, **52**, 375-395.
- DE RYCKE J., GUILLOT J.F., BOIVIN R. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Vet. Microbiol.*, 1987, **15**, 137-150.
- DE RYCKE J., OSWALD E., BOIVIN R. An *in vivo* assay for the detection of cytotoxic strains of *Escherichia coli*. *Ann. Rech. Vét.*, 1989, **20**, 39-46.
- DE RYCKE J., PLASSIART G. Toxic effects for lambs of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*. *Res. Vet. Sci.*, 1990, **49**, 349-354.
- DE RYCKE J., GONZALEZ E.A., BLANCO J., OSWALD E., BLANCO M., BOIVIN R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 694-699.
- DE RYCKE J., MILON A., OSWALD E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 221-233.
- DHO-MOULIN M. Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 353-360.
- DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 1999, **30**, 299-316.
- DONNENBERG M.S., WELCH R.A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: Mobley H.L.T., Warren J.W. (Eds), *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press : Washington, 1996, 135-174.
- DOZOIS C.M., CURTISS R. III. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of «exotic» islands in the gene stream. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 157-180.
- DOZOIS C.M., CLEMENT S., DESAUTELS C., OSWALD E., FAIRBROTHER J.M. Expression of P, S, and FIC adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic piglets. *FEMS Microbiol. Letters*, 1997, **152**, 307-312.
- EL MAZOUARI K., OSWALD E., HERNALSTEENS J.P., LINTERMANS P., DE GREVE H. F17-like fimbriae from an invasive *Escherichia coli* strain producing CNF2. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 2633-2638.
- FAIRBROTHER J.M. Les colibacillooses du porc. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 369-375.
- FAIRBROTHER J.M., NGELEKA M. Extraintestinal *Escherichia coli* infection in pigs. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 221-236.
- PECTEAU G., FAIRBROTHER J.M., HIGGINS R., VAN METRE D.C., PARE J., SMITH B.P., HOLMBERG C.A., JANG S. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Vet. Microbiol.*, 2001, **78**, 241-249.
- FERIA C., MACHADO J., CORREIA J.D., GONCALVES J., GAASTRA W. Virulence genes and P fimbriae PapA

- subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, 2001, **82**, 81-89.
- FOURNOUT S., DOZOIS C.M., ODIN M., DESAUTELS C., PERES S., HERAULT F., DAIGLE F., SEGAFREDO C., LAFFITE J., OSWALD E., FAIRBROTHER J.M., OSWALD I.P. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 839-847.
- GARABAL J.I., GONZALEZ E.A., VAZQUEZ F., BLANCO J., BLANCO M. Toxigenic *Escherichia coli* in Spanish piggeries from 1986 to 1991. *Vet. Microbiol.*, 1995, **47**, 17-25.
- GARABAL J.I., GONZALEZ E.A., VAZQUEZ F., BLANCO J., BLANCO M., BLANCO J.E. Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Vet. Microbiol.*, 1996, **48**, 113-123.
- GAY C.C., BESSER T.E. *Escherichia coli* septicaemia in calves. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 75-90.
- GERARDIN J., LALIOUI L., JACQUEMIN E., LE BOUGUENEC C., MAINIL J. The *afa*-related gene cluster in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa-8* variant. *Vet. Microbiol.*, 2000, **76**, 175-184.
- GIRARDEAU J.P., LALIOUI L., OU SAID A.M., DE CHAMPS C., LE BOUGUENEC C. Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: Evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 218-226.
- GROSS W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 237-260.
- HACKER J., KAPER J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, **54**, 641-679.
- HANCOCK R.E.W., PIERS K. Outer membrane proteins. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 495-532.
- HARTL D.L., SAWYER S.A. Why do unrelated insertion sequences occur together in the genome of *Escherichia coli*? *Genetics*, 1988, **118**, 537-541.
- JANSSEN T., SCHWARZ C., PREIKSCHAT P., VOSS M., PHILIPP H-C., WIELER L. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2001, **291**, 371-378.
- JOHNSON J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, **4**, 80-128.
- JOHNSON J.R., BROWN J.I. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for the identification of variant *papG* genes encoding the Gal-(α 1-4) Gal-binding Pap G adhesins of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1996, **173**, 920-926.
- JOHNSON J.R. Urinary tract infection. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* - Mechanisms of Virulence. Cambridge University Press: Cambridge, 1997, 495-549.
- JOHNSON J.R., STELL A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.*, 2000, **181**, 261-272.
- JOHNSON J.R. Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg M.S. (Ed), *Escherichia coli*, virulence mechanisms of a versatile pathogen. Academic Press: New-York, 2002, 55-77.
- KAIPAINEN T., POHJANVIRTA T., SHPIGEL N.Y., SHWIMMER A., PYORALA S., PELKONEN S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.*, 2002, **85**, 37-46.
- KIM K.S. Meningitis-associated *Escherichia coli*. In: Donnenberg M.S. (Ed.), *Escherichia coli*, virulence mechanisms of a versatile pathogen. Academic Press: New-York, 2002, 269-289.
- LALIOUI L., JOUVE M., GOUNON P., LE BOUGUENEC C. Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 5048-5059.
- LANDRAUD L., GAUTHIER M., FOSSE T., BOQUET P. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2000, **30**, 213-216.
- LE BOUGUENEC C., ARCHAMBAUD M., LABIGNE A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 1189-1193.
- LE BOUGUENEC C., BERTIN Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 317-342.
- LIPMAN L.J.A., DE NIJS A., GAASTRA W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. *Vet. Microbiol.*, 1995, **47**, 1-7.
- LUPSKI J.R., FEIGIN R.D. Molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1988, **157**, 1120-1123.
- MacLAREN D.M. Soft tissue infection and septicaemia. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli*: Mechanisms of Virulence. Cambridge University Press: Cambridge, 1997, 469-494.
- MAINIL J. Les colibacillooses dans l'espèce bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 343-350.
- MAINIL J., JACQUEMIN E., HERAULT F., OSWALD E. Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res.*, 1997, **61**, 193-199.

- MAINIL J., BEZ S., JACQUEMIN E., KAECKENBEECK A. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et chats. I) Détection des souches entérotoxino-gènes (ETEC), entérotoxigènes (EPEC), vérotoxino-gènes (VTEC), entérohémorragiques (EHEC) et nécro-toxinogènes (NTEC). *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 39-46.
- MAINIL J., JACQUEMIN E., POHL P., FAIRBROTHER J.M., ANSUINI A., LE BOUGUENEC C., BALL H.J., DE RYCKE J., OSWALD E. Comparison of necrotoxi-genic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 123-135.
- MAINIL J. Le point des connaissances sur les entérites à *Escherichia coli* chez le veau. *Ann. Méd. Vét.*, 2000, **144**, 121-136.
- MAINIL J., GERARDIN J., JACQUEMIN E. Identifi-cation of the F17 fimbrial subunit- and adhesion-enco-ding (*f17A* and *f17G*) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet. Microbiol.*, 2000, **73**, 327-335.
- MAINIL J., WILBAUX M., JACQUEMIN E., OSWALD E., IMBERECHTS H., VAN BOST S. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et chats. III) Données bactériologiques et cliniques sur les souches nécrotoxigènes et sur celles positives our des adhésines. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 343-354.
- MAINIL J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*. I) Les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann. Méd. Vét.*, 2003a, **147**, 105-126.
- MAINIL J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*. II) Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Méd. Vét.*, 2003b, **147**, 159-171.
- MAINIL J., JACQUEMIN E., OSWALD E. Prevalence and identity of *cdt*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, 2003, **94**, 159-165.
- MAZODIER P., DAVIES J. Gene transfer between dis-tantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 1991, **25**, 141-171.
- Mc LAREN I., WRAY C. Another animal *Escherichia coli* cytopathic factor. *Vet. Rec.*, 1986, **119**, 576-577.
- MORRIS J.A., THORNS C.J., SCOTT A.C., SOJKA W.J. Adhesive properties associated with the Vir plasmid: a transmissible pathogenic characteristics associated with strains of invasive *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 1982, **128**, 2097-2103.
- NAGY B., TOTH I., MAINIL J.G., OSWALD E. Nekrotoxikus *Escherichia coli* (NTEC) törzsek Magyarországi elofordulása es jellemzése (Occurence and characteristics of necrotoxic *Escherichia coli* strains in Hungary). *Magyar Allatorosvok Lapja*, 2000, **122**, 751-758.
- NATARO J.P., KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 142-201.
- NATARO J.P., LEVINE M.M. *Escherichia coli* diseases in humans. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 285-333.
- NETER E. Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am. J. Dig. Dis.*, 1965, **10**, 883-886.
- NOUGAYREDE J.P., HERAULT F., JACQUEMIN E., DE RYCKE J., MAINIL J., OSWALD E. Pathogenicity islands of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). In : Proceedings of the ASM General Meeting, New-Orleans, Louisiana, USA. ASM Press: Washington, 1996, Abstract B77.
- ORDEN J.A., RUIZ SANTA QUITEIRA J.A., CID D., GARCIA S., DE LA FUENTE R. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Vet. Microbiol.*, 1999, **66**, 265-273.
- OSEK J. Characterization of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from healthy calves in Poland. *J. Vet. Med. B*, 2001, **48**, 641-646.
- OSWALD E., DE RYCKE J., GUILLOT J.F., BOIVIN R. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cultures associated with the presence of Vir plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Letters*, 1989, **58**, 95-100.
- OSWALD E., DE RYCKE J., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., MAINIL J., DAUBE G., POHL P. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type 2 in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 2522-2527.
- OSWALD E., SUGAI M., LABIGNE A., WU H.C., FIO-RENTINI C., BOQUET P., O'BRIEN A.D. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994a, **91**, 3814-3818.
- OSWALD E., TABOURET M., BOIVIN R., DE RYCKE J. Detection of *Escherichia coli* strains producing the cyto-toxic necrotizing factor type two (CNF2) by enzyme-lin-ked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.*, 1994b, **40**, 209-218.
- PATON J.C., PATON A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 450-479.
- PEETERS J.E. *Escherichia coli* infections in rabbits, cats, dogs, goats and horses. In: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Wallingford, 1994, 261-284.
- PENRITH M.L., HANTON M.M., CLAY C.G. CNF1 toxin-producing strains of *Escherichia coli* isolated from weaner pigs with necrotic enteritis in South Africa. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 493-494.
- PFAFF-Mc DONOUGH S.J., HORNE S.M., GIDDINGS C.W., EBERT J.O., DOETKOTT C., SMITH M.H., NOLAN L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.*, 2000, **44**, 23-33.
- POHL P., DAUBE G., MAINIL J., LINTERMANS P., KAECKENBEECK A., OSWALD E. Facteurs de viru-lence et phénotypes de soixante et une souches

- d'*Escherichia coli* d'origine bovine, productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF1). *Ann. Rech. Vét.*, 1992a, **23**, 83-91.
- POHL P., MAINIL J., DEVRIESE L.A., HAESEBROUCK F., BROES A., LINTERMANS P., OSWALD E. *Escherichia coli* productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF1) isolées à partir de processus pathologiques chez des chats et des chiens. *Ann. Méd. Vét.*, 1992b, **136**, 21-25.
- POHL P., OSWALD E., VAN MUYLEM K., JACQUEMIN E., LINTERMANS P., MAINIL J. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.*, 1993a, **24**, 311-315.
- POHL P., OSWALD E., VAN ROBAEYS G., STOCKMANS F., LINTERMANS P., MAINIL J. Tests simples pour le diagnostic présumé des *Escherichia coli* isolées principalement chez les bovins et productrices des cytotoxines nécrosantes (CNF). *Ann. Méd. Vét.*, 1993b, **137**, 503-505.
- POHL P., IMBERECHTS H., MARIN M., SCHLICHER C., STOCKMANS F. Prévalence des gènes codant pour les cytotoxines nécrosantes (CNF1 & CNF2) chez des *Escherichia coli* isolées de bovins malades ou asymptomatiques. *Ann. Méd. Vét.*, 1997, **141**, 161-164.
- PRADA J., BALJER G., DE RYCKE J., STEINWICK H., ZIMMERMANN S., STEPHAN R., BEUTIN L. Characteristics of alpha-haemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. *Vet. Microbiol.*, 1991, **29**, 59-73.
- SAUNDERS J.R. Bacterial plasmids and their association with virulence. In: Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., Mc Dowell D.A. (Eds), Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe. Proceedings of the Third of the Concerted Action CT98-3935: Pathogenicity and Virulence, Liège. The National Food Centre Teagasc, Dublin, 2000, 118-125.
- SCHOENAERS F., KAECKENBEECK A. Etudes sur la colibacillose du veau: V. immunoprophylaxie expérimentale. *Ann. Méd. Vét.*, 1964, **108**, 3-11.
- SMITH H.W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with Colicin V. *J. Gen. Microbiol.*, 1974, **83**, 95-111.
- SMITH H.W. Observations on *Escherichia coli* infection in calves. In: Rutter J.M. (Ed.), Proceedings of the First Seminar on «Pathology», in the CEC Programme of Coordination of Research in Beef Production. Perinatal Ill-Health in Calves, Bruxelles. European Economic Community Press: Bruxelles, 1975, 47-59.
- SMITH H.W. Transmissible pathogenic characteristics of invasive strains of *Escherichia coli*. *JAVMA*, 1978, **173**, 601-607.
- SNYDER L., CHAMPNESS W. Molecular genetics of bacteria. Chapitre 4: Plasmids. ASM Press: Washington, 1997a, 105-128
- SNYDER L., CHAMPNESS W. Molecular genetics of bacteria. Chapitre 7: Bacteriophages. ASM Press: Washington, 1997b, 161-193.
- SNYDER L., CHAMPNESS W. Molecular genetics of bacteria. Chapitre 8: Transposition and non-homologous recombination. ASM Press: Washington, 1997c, 195-214.
- SOJKA W.J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agricultural Bureaux: Farnham Royal, 1965, 265 pages.
- STORDEUR P., MAINIL J. La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 11-18.
- STORDEUR P., MARLIER D., BLANCO J., OSWALD E., BIET F., DHO-MOULIN M., MAINIL J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microbiol.*, 2002, **84**, 231-241.
- SUSSMAN M. *Escherichia coli* and human disease. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli*: Mechanisms of Virulence. Cambridge University Press: Cambridge, 1997, 3-48.
- TABOURET M., DE RYCKE J. Detection of cytotoxic necrotising factor (CNF) in extracts of *Escherichia coli* strains by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Microbiol.*, 1990, **32**, 73-81.
- TAYLOR P.W. Bacterial resistance to complement. In: Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press: Washington, 1988, 107-120.
- TOTH I. Phages and their role in virulence of bacteria. In: Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., Mc Dowell D.A. (Eds), Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe. Proceedings of the Third of the Concerted Action CT98-3935: Pathogenicity and Virulence, Liège. The National Food Centre Teagasc, Dublin, 2000, 1-10.
- TOTH I., HERAULT F., BEUTIN L., OSWALD E. Production of cytolethal distending toxins by human and animal pathogenic *Escherichia coli* strains: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 4285-4291.
- VAN BOST S., MAINIL J. Reproduction of lesions and clinical signs with a CNF2-producing *Escherichia coli* in neonatal calves. *Adv. Exp. Med.*, 1999, **473**, 125-128.
- VAN BOST S., BABE M-H., JACQUEMIN E., MAINIL J. Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Vet. Microbiol.*, 2001a, **82**, 311-320.
- VAN BOST S., ROELS S., MAINIL J. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.*, 2001b, **81**, 315-329.
- VAN BOST S., MAINIL J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*. III) Production de toxines. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 327-342.
- VAN BOST S., JACQUEMIN E., OSWALD E., MAINIL J. Multiplex PCRs for identification of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 4480-4482.

- VANDEKERCKHOVE D., DE HERDT P., LAEVENS H., PASMANS F. Colibacillose bij de kip. *Vl. Diergskd. Tijdschr.*, 2003, **72**, 180-190.
- WILLIAMS P.H. Novel iron uptake system specified by Col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1979, **26**, 925-932.
- WOOLCOCK J.B. Bacterial resistance to humoral defense mechanisms: an overview. In: Roth J.A. (Ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM Press: Washington, 1988, 73-93.
- WRAY C., WOODWARD M.J. *Escherichia coli* infections in farm animals. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: Mechanisms of Virulence*. Cambridge University Press: Cambridge, 1997, 49-84.
- WRAY C., PIERCY D.W.T., CARROLL P.J., COOLEY W.A. Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Res. Vet. Science*, 1993, **54**, 290-298.
- WRAY C., PIERCY D.W.T., CARROLL P.J., JOHNSON C.T., HIGGINS R. Bovine haemorrhagic colitis associated with CNF+ and F6+ (987P) *Escherichia coli*. *Vet. Res.*, 1992, **131**, 220.
- YURI K., NAKATA K., KATAE H., YAMAMOTO S., HASEGAWA A. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.*, 1998, **60**, 287-290.