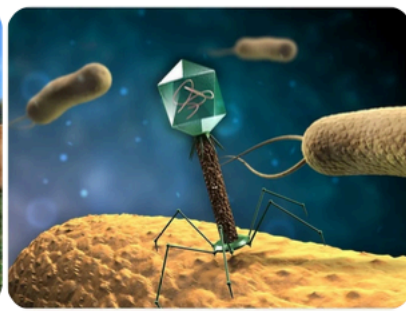




Université de Liège
Faculté de Médecine vétérinaire
Département des Maladies infectieuses et parasitaires
Service de Bactériologie vétérinaire et maladies bactériennes animales

Etude des virulotypes et des relations phylogénétiques
de souches d'*Escherichia coli* Shigatoxinogènes et
Entéropathogènes O80:H2 et transduction du gène
stx2d médiée par le bactériophage Stx



Virulotypes and phylogenetic relationships
study between O80:H2 Shigatoxigenic and
Enteropathogenic strains of *Escherichia coli* and
Stx bacteriophage mediated *stx2d* gene transduction

Audrey Habets

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2022-2023



ACADÉMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

DÉPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES

SERVICE DE BACTÉRIOLOGIE VÉTÉRINAIRE ET MALADIES BACTÉRIENNES ANIMALES

Etude des virulotypes et des relations phylogénétiques de souches d'*Escherichia coli* Shigatoxinogènes et Entéropathogènes O80:H2 et transduction du gène *stx2d* médiée par le bactériophage Stx

Virulotypes and phylogenetic relationships study between O80:H2 Shigatoxinogenic and Enteropathogenic strains of *Escherichia coli* and Stx bacteriophage mediated *stx2d* gene transduction

Habets Audrey

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

Docteur en Sciences vétérinaires

ANNÉE ACADÉMIQUE 2022-2023

Illustrations de couverture :

Photographie d'un bovin : Copyright, Agricultures et Territoires, Chambres d'agriculture Centre-Val de Loire

Photographie d'un bactériophage avec bactérie : Copyright, News medical life sciences, Andrea Dati, Shutterstock

À mes amis...

À ma famille...

Remerciements

Au terme de ce long, périlleux mais enrichissant parcours de vie, j'aimerais avant tout, sincèrement remercier le Professeur Jacques Mainil ainsi que le Professeur Damien Thiry ancien et nouveau chef du service de Bactériologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Liège. Merci de m'avoir si bien accueillie dans ce service. Je voudrais les remercier pour leur aide, leurs conseils ainsi que pour leur encadrement qui m'ont permis de réaliser ce travail et de progresser énormément au cours de ces quatre années. Je souhaite également les remercier de m'avoir orientée dans mes réflexions, mes expériences, et d'avoir pris le temps de répondre à mes questions.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité de thèse, notamment le Professeur Rob Lavigne de la KU Leuven ainsi que le Professeur Eric Cox de l'Université de Gand pour leurs précieux conseils.

A tous les membres du laboratoire de Bactériologie, particulièrement à Duprez J.-N. pour ses conseils techniques et pour la patience dont il a fait preuve. Sans oublier mes co-doctorants : Céline Antoine, Fanny Laforêt, Rie Ikeda, Salomé Desmecht, Cyrille Ngassam, Virginie Guérin, Caroline Léonard, Margaux Navez mais aussi Juliette Pozzi une secrétaire hors pair, sans qui je n'aurais pas eu l'occasion d'avoir autant d'échanges constructifs mais également de plaisir partagé.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble des membres de la « Faune sauvage », pour l'ambiance ainsi que pour les nombreuses discussions.

Pour la première partie de ce travail, merci au Docteur vétérinaire Saulmont Marc (ARSIA), pour la mise à disposition de nombreuses souches bactériennes, le matériel de base de ce travail. Mais également au laboratoire de l'ANSES de Pouflargan (France), pour le séquençage et la réalisation des contigs. Merci aussi au Professeur Atsushi Iguchi (Université de Myazaki, Japon) pour le sérogroupage de certaines souches. Pour la seconde partie de ce travail qui concerne les bactériophages, merci au centre de microscopie et d'imagerie moléculaire de Gosselies en particulier au Dr Marjorie Vermeersch pour les images en microscopie électronique à transmission. Merci aussi au laboratoire de technologie des gènes de l'Université de Louvain en particulier au Dr Jeroen Wagemans pour le séquençage du génome du phage et des souches transduites ainsi que l'aide pour l'analyse des séquences.

A ma famille et mes amis, qui m'ont soutenue et encouragée dans ce projet.

Ce projet de recherche est financé par le SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne Alimentaire et Environnement (Projet RT16/VTEFFECT) et par les Fonds Spéciaux de la Recherche ULiège (Project HYBRID_COLI_O80).

Abréviations

°C : Degré celcius

µL : Microlitres

A/E : Attachement/Effacement

AA : *Aggregative adherence*

AAF : Aéro-anaérobie facultatif

ADN : Acide désoxyribonucléique

AEEC : *Escherichia coli* attachant-effaçant

AE-STEC : *E. coli* entérohémorragique

Agga : Adhérence aggrégative

AgH : Antigène flagellaire H

AgK : Antigène capsulaire K

AgO : Antigène somatique O

AL : Adhérence localisée

APEC : *E. coli* pathogène aviaire (*Avian pathogenic Escherichia coli*)

AQP : Aquaporines

ARN : Acide ribonucléique

ARSIA : Association Régionale de Santé et d'Identification Animale

BFP : *Bundle Forming Pili*

BREX : *Bacteriophage exclusion*

CC : Complexe clonal

Ces : *Chaperone for E. coli secreted protein*

CFU : *Colony-forming unit*, unité formant colonie

cgMLST : Core genome MLST

CH : Colite hémorragique

CRISPR-Cas 9 : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated 9*

Ct : *Cycle treshold*

DA : *Diffuse-Adherence*

DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse

DEC : *E. coli* diarrhéogenic

DPI : *Days post-inoculation*

E. coli : *Escherichia coli*

Eae : Intimine

EAEC : *E. coli* entéro-aggrégatifs

EAF : *EPEC Adhesion Factor*

EDP : *Edema Disease Principle*

EF : Facteur d'élongation
EAggEC : *E. coli* entéroaggrégative
ehxA : Entérohémolysine A
EFSA : *European Food Safety Authority*, Autorité européenne de sécurité des aliments
EHEC : *E. coli* entérohémorragique
EIEC : *E. coli* entéroinvasif
EPEC : *E. coli* entéropathogène
tEPEC : EPEC typique
aEPEC : EPEC atypique
Esc : *E. coli secretion protein*
Esp : *E. coli secreted protein*
ETEC : *E. coli* entérotoxinogène
ExPEC : Pathogènes extra-intestinaux
FV : Facteurs de virulence
HC : Colite hémorragique
HCP : *Hemorrhagic coli pilus*
Iha : *IrgA homologue adhesin*
InPEC : Pathogènes intestinaux
IRTKS : *Insulin receptor tyrosine kinase substrate*
LAL : *Localized Adherence-like*
LB : Luria-Bertani
LEE : *Locus of Enterocyte Effacement*
Lpf : *Long polar fimbriae*
LPS : Lipopolysaccharides
LT : Entérotoxine thermolabile
Map : *Mitochondrial associated protein*
MAT : Microangiopathie thrombotique
MDR : Bactéries multirésistantes
MF : Matières fécales
mg : Milligrammes
min : Minutes
mL : Millilitres
ML : Maximum de vraisemblance
MLST : *MultiLocus Sequence Typing*
mM : Millimolaire
MTase : Méthylase

NHE3 : Echangeur sodium-hydrogène
NMEC : *E. coli* responsable de méningites néonatales
Nle : *Non LEE-encoded effector*
NTEC : *E. coli* nécrotoxigéniques
OD : *Optical density*
OMV : Vésicules de la membrane externe
ORF : *Open Reading Frame*
Paa : *Porcine attaching and effacing associated*
PAI : *Pathogenicity Island*
Pb : Paire de base
PBS : *Phosphate buffered saline*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PEG : Polyéthylène glycol
pH : Potentiel Hydrogène
PPT : Purpura thrombotique thrombocytopénique
PSN : Polymorphisme d'un seul nucléotide
qPCR : Quantitative PCR
RAMS : *Recto-anal mucosal swabbing*
REase : Endonucléase
R-M : Restriction-modification
Rpm : Rotation par minute
Saa : *STEC autoagglutinating adhesine*
SePEC : *E. coli* septicémiques
SGLT : Transporteur sodium glucose
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique
ST : Entérotoxine thermostable
STEC : *E. coli* shigatoxinogène
Stx : Toxine de Shiga
T3SS : Système de sécrétion de type III
T4P : Pilus de type 4
Tir : *Tyrosine phosphorylated protein*
UE : Union Européenne
UFC : Unité Formant Colonie
ULiège : Université de Liège
UPEC : *E. coli* uropathogène
UV : Ultraviolet

VTEC : *E. coli* vérotoxinoène

Vtx : Vérocvtotoxine

VWR : Van Waters and Rogers

wgMLST : Whole genome MLST

WGS : *Whole genome sequencing*, séquençage du génome complet

“Les aptitudes sont ce que vous pouvez faire. La motivation détermine ce que vous faites. Votre attitude détermine votre degré de réussite”.

Karl Max

Table des matières

Résumé – Abstract	2
Préambule général	7
Introduction	11
1. <i>Escherichia coli</i>	11
1.1. Structure	11
1.2. <i>E. coli</i> commensal et pathogène : notion de classification.....	13
1.2.1. Classification selon le sérotype	13
1.2.2. Classification selon le phylogroupe	14
1.2.3. Classification selon le pathotype.....	14
1.2.4. Classification selon les types séquentiels ou <i>sequences types</i> (ST).....	17
1.3. <i>E. coli</i> en tant qu'agent pathogène chez les bovins	17
1.3.1. Infections par <i>E. coli</i> chez les veaux.....	17
2. <i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC) et <i>E. coli</i> productrices de toxines de Shiga (STEC)	19
2.1. Présentation des EPEC	19
2.2. Présentation des (AE)-STEC	20
2.2.1 Aspect zoonotique	24
2.2.2 Traitements.....	25
2.3. Facteurs de virulence.....	27
2.3.1. Adhérence initiale.....	27
2.3.2. <i>Locus of enterocyte effacement</i> (LEE).....	27
2.3.3. Le système de secretion de type III.....	29
2.3.4. Les Shigatoxines.....	31
2.3.5. Autres facteurs de virulence.....	34
2.4. O80:H2, un sérotype émergent.....	37
3. Les bactériophages.....	39
3.1. Historique.....	39
3.2. Structure et classification.....	41
3.2.1. Morphologie générale.....	41
3.2.2. Génôme viral.....	41
3.2.3. Diversité des capsides.....	42
3.3. Taxonomie.....	43
3.4. Les différents types de répliation.....	45

3.4.1. Le cycle lytique.....	46
3.4.2. Le cycle lysogénique.....	48
3.4.3. Les autres cycles.....	48
4. Les phages Stx.....	49
4.1. Morphologie des phages Stx.....	49
4.2. Système d'intégration spécifique du site.....	51
4.3. Les sites d'insertion des phages Stx.....	53
4.4. Induction des phages Stx.....	53
4.4.1. Systèmes d'induction des phages.....	53
4.4.2. Autre voie Rec-A indépendante.....	54
4.4.3. Induction spontanée.....	54
4.4.4. Facteurs déclenchants l'induction.....	54
5. Mécanismes de résistance aux bactériophages.....	56
5.1. Adaptations des récepteurs.....	56
5.2. Systèmes de défense de l'hôte.....	57
6. Modèle de <i>Galleria mellonella</i>.....	58
Objectifs	60
Section expérimentale	61
Etude 1 : Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> O80:H2 from diarrhoeic and septicaemic calves and relatedness to human Shigatoxigenic <i>E. coli</i> O80:H2.65	
Etude 2 : Identification of Shigatoxigenic and Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> serotypes in healthy young dairy calves in Belgium by recto-anal mucosal swabbing.....	77
Etude 3 : Phage-mediated Shiga-toxin (Stx2d) gene transduction from O80:H2 Shiga toxicogenic <i>Escherichia coli</i> (STEC) to non-STEC strains and <i>in vivo</i> virulence assessment.....	90
Discussion - Perspectives	115
Annexe	126
Etude 4 : Identification of five serotypes of enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> from diarrheic calves and healthy cattle in Belgium and comparative genomics with Shigatoxigenic <i>E. coli</i>	129
Bibliographie	146

Résumé - Summary

Résumé

Récemment, un pathotype d'*Escherichia coli* O80:H2 très virulent et peu commun, portant les gènes de la toxine de Shiga (*stx*), le sous-type rare de l'intimine *eae*ζ, et des gènes associés au plasmide pS88 des *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC) a été décrit en Europe. Celui-ci est impliqué dans le syndrome urémique et hémolytique (SHU) avec bactériémie chez l'homme et il est devenu le deuxième sérotype d'*E. coli* shigatoxinogènes (STEC) le plus fréquemment isolé en 2016 en France (Bruyand et al., 2019). Il est également le troisième sérotype d'*E. coli* entérohémorragiques (AE-STECS) le plus fréquemment isolé parmi les cas de SHU en Europe en 2019 chez l'homme (EFSA 2021). Des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) O80:H2 ont de plus été détectées chez des jeunes veaux diarrhéiques (Thiry et al., 2017) ; des AE-STECS O80:H2 ont également été détectées, bien que plus rarement chez des bovins adultes (Blanco et al., 2004 ; Cointe et al., 2018) ainsi que chez un veau diarrhéique en 1987 en Belgique (Thiry et al., 2017 ; De Rauw et al., 2019). L'objectif général de cette thèse a été de poursuivre l'identification du sérotype O80:H2 parmi des souches EPEC et AE-STECS isolées de veaux malades et sains en Belgique, d'étudier leur virulence et de mieux comprendre le rôle du phage Stx2d dans la pathogénicité et dans l'évolution de ces souches.

L'objectif de la première étude a été d'identifier le sérotype O80:H2 parmi des EPEC et AE-STECS isolées de veaux diarrhéiques et septicémiques et de comparer génétiquement ces AE-STECS bovines avec les AE-STECS O80:H2 humaines.

Dans cette étude, dix AE-STECS et 21 EPEC O80 ont été identifiées à partir de fèces, de contenus intestinaux et d'un rein de veaux diarrhéiques ou septicémiques. Leurs génomes ont été séquencés et comparés à 19 AE-STECS humaines. Elles appartenaient toutes au sérotype O80:H2 et au ST301, hébergeaient le gène *eae*ζ, et 23 des 29 AE-STECS contenaient le gène *stx2d*. D'un point de vue phylogénétique, elles étaient réparties en deux sous-lignées principales : l'une comprenait une majorité d'EPEC bovines tandis que la seconde comprenait une majorité d'AE-STECS bovines et humaines comprenant le gène *stx2d*.

Les AE-STECS, les EPEC et les STECS sont portées par les bovins adultes sains dans leur tractus intestinal, plus particulièrement dans le colon à la hauteur de la jonction recto-anale (Beutin et Fach, 2015).

L'objectif de la seconde étude a été d'évaluer la présence du sérotype O80:H2 dans des souches AE-STECS et EPEC isolées de veaux laitiers sains âgés de moins de 6 mois prélevés par écouvillonnage au niveau la muqueuse recto-anale (RAMS) dans trois exploitations.

Dans cette étude, 233 RAMS ont été prélevés à trois occasions consécutives sur des veaux Holstein et ont été soumis à une PCR ciblant les gènes *eae*, *stx1* et *stx2*. Au total, 148 RAMS positifs ont été ensemencés sur quatre milieux gélosés (semi-)sélectifs ; sur les 2146 colonies testées, 294 provenant de

69 RAMS ont été confirmées par PCR comme étant des AE-STECC, EPEC ou STECC avec une majorité d'AE-STECC (73 %). Aucun isolat n'était positif pour le sérotype O80.

Les gènes de la toxine de Shiga (*stx*) ont été transférés à de nombreuses bactéries, dont l'une est *E. coli* O157:H7 (Wick et al., 2005). Le point crucial de la virulence des STECC réside dans le fait que les toxines de Shiga ne sont pas codées par un gène chromosomique d'*E. coli* mais que leurs gènes *stx* sont situés dans les génomes de bactériophages qui se trouvent dans leurs hôtes en tant que prophages (Los et al., 2011). Les études d'acquisition et de stabilité du phage Stx sont donc cruciales en termes de santé publique et animale.

Les objectifs de cette troisième étude ont été d'isoler et de caractériser le phage Stx2d d'une souche STECC O80:H2, d'étudier la transduction du gène médiée par ce phage vers des souches non-STECC et ensuite, d'évaluer la survie de larves de *Galleria mellonella* inoculées avec ces souches transduites.

Trois phages tempérés ont été induits et isolés de souches STECC bovine O80:H2 par rayonnement UV. Le gène *stx2d* d'un de ces phages a été transduit dans cinq souches non-STECC et son génome a été analysé. Trois souches : K12-MG1655, K12-DH5 α et O80:H26 ont été transduites avec succès. Ces transferts ont été confirmés par une PCR ciblant le gène *stx2d*. L'ADN génomique du phage a été extrait puis analysé. Le phage fait partie de la classe des *Caudoviricetes*, il est stable dans les nouvelles souches STECC après trois repiquages successifs et présente des résistances à température et à pH modérés. Son génome présente de nombreuses protéines impliquées dans le cycle lysogénique. Les expériences en modèle *Galleria mellonella* ont montré que les souches transduites provoquaient des taux de mortalité significativement plus élevés que les souches non transduites respectives.

En conclusion, non seulement les EPEC mais aussi les AE-STECC O80:H2 sont présentes chez les veaux diarrhéiques et septicémiques en Belgique et sont génétiquement apparentées aux AE-STECC humaines. Les jeunes veaux laitiers en bonne santé sont des porteurs sains d'AE-STECC et d'EPEC en Belgique ; le sérotype O80:H2 restant non identifié à ce jour dans cette catégorie d'animaux.

Ces résultats confirment la nécessité de comprendre l'évolution des AE-STECC bovines et humaines et des EPEC O80:H2. Pour cela, l'étude sur le transfert de gène de la toxine de Shiga médiée par le phage Stx2d a montré que celui-ci peut être transféré à des souches non-STECC et contribuer à leur virulence dans le modèle des larves de *Galleria mellonella*. La surveillance des souches (AE)-STECC O80:H2 est essentielle au vu de leur présence dans certaines catégories d'animaux et du risque potentiel représenté par la transduction du gène *stx*.

Summary

Recently, a highly virulent and uncommon *Escherichia coli* O80:H2 pathotype carrying the Shiga toxin genes (*stx*), the *eae*ζ intimin subtype, and pS88 associated genes plasmid of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) has been described in Europe. This pathotype is involved in uremic and hemolytic syndrome (HUS) with bacteremia in human and became the second most common Shigatoxinogenic *E. coli* (STEC) serotype isolated in 2016 in France (Bruyand et al., 2019). It also represents the third most frequently isolated enterohaemorrhagic *E. coli* (AE-STEC) serotype among human HUS cases in Europe in 2019 (EFSA 2021). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) O80:H2 have also been detected in young diarrheic calves (Thiry et al., 2017) ; AE-STEC O80:H2 were also detected in adult cattle (Blanco et al., 2004 ; Cointe et al., 2018) and in a diarrheic calf in 1987 in Belgium (Thiry et al., 2017 ; De Rauw et al., 2019) but much more rarely. The general objective of this thesis was to pursue the identification of the O80:H2 serotype among EPEC and AE-STEC isolated from diarrheic and healthy calves in Belgium, to study their virulence and to better understand the role of Stx2d phage in the evolution and pathogenicity of these strains.

The aim of the first study was to identify O80:H2 serotype among EPEC and AE-STEC isolated from diarrheic and septicemic calves and to genetically compare these bovine AE-STEC with human AE-STEC O80:H2. In this study, ten AE-STEC and 21 EPEC O80 were identified from faeces, intestinal contents, and a kidney of diarrheic or septicemic calves. Their genomes were sequenced and compared to 19 human AE-STEC. They all belonged to the O80:H2 serotype and ST301, harboured the *eae*ζ gene, and 23 of the 29 AE-STEC contained the *stx2d* gene. Phylogenetically, they were distributed in two major sub-lineages: one comprised a majority of bovine EPEC whereas the second one comprised a majority of *stx2d* bovine and human AE-STEC.

AE-STEC, EPEC and STEC are carried by healthy adult cattle in their intestinal tract, especially in the colon at the recto-anal junction (Beutin and Fach, 2015). The purpose of the second study was to evaluate the presence of O80:H2 serotype of AE-STEC and EPEC in healthy dairy calves aged under 6 months by swabbing their recto-anal mucosa (RAMS) in three farms. In this study, 233 RAMS were collected on three consecutive times from Holstein calves and submitted to PCR targeting *eae*, *stx1* and *stx2* genes. A total of 148 positive RAMS were streaked on four (semi-)selective agar media; of the 2146 colonies tested, 294 from 69 RAMS were PCR-confirmed as AE-STEC, EPEC or STEC with a majority of AE-STEC (73%). No isolate was positive for O80 serogroup.

Shiga toxin (*stx*) genes have been transferred to several bacteria, such as *E. coli* O157:H7 (Wick et al., 2005). A main point about virulence in STEC is that Shiga toxins are not encoded by a chromosomal gene but *stx* genes are located in the genomes of bacteriophages present as prophages in their hosts (Los

et al., 2011). Stx phage acquisition and stability studies are therefore crucial in terms of animal and public health. The aims of this third study were to isolate and characterize the Stx2d phage from a STEC O80:H2 strain, to study the transduction of the *stx* gene mediated by this phage to non-STECS strains and then to evaluate the survival of *Galleria mellonella* larvae inoculated with these newly transduced strains. Three temperate phages were induced and isolated from a bovine O80:H2 STEC strain by UV radiation. The *stx2d* gene of one of these phages was transduced into five non-STECS strains and its genome was analyzed. Three strains: K12-MG1655, K12-DH5 α and O80:H26 were successfully transduced. These transfers were confirmed by PCR targeting the *stx2d* gene. Phage DNA was extracted and analyzed. The phage belongs to the *Caudoviricetes* class, is stable in the new STEC strains after three successive subcultures and exhibits resistance to moderate temperature and pH. Its genome presents many proteins involved in the lysogenic cycle. *Galleria mellonella* model experiments showed that the transduced strains caused significantly higher mortality rates than the respective unconverted strains.

In conclusion, not only EPEC but also AE-STECS O80:H2 are present in diarrheic and septicemic calves in Belgium and are genetically related to human AE-STECS. Healthy young dairy calves are healthy carriers of AE-STECS and EPEC in Belgium; O80:H2 serotype remains unidentified to date in this animals category. These results confirm the need of understanding the evolution of bovine and human AE-STECS and EPEC O80:H2. The Shiga-toxin gene transfer mediated by the Stx2d phage suggested its contribution to the virulence of the non-STECS strains in the *Galleria mellonella* larvae model. The O80:H2 (AE)-STECS monitoring is essential due to its presence in specific animals categories and the potential risk represented by the *stx* gene transduction.

Préambule général

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie présente dans le microbiote digestif de l'homme et de nombreuses espèces animales. Cependant, *E. coli* est aussi associée à des diarrhées (Lesage, 1897) ce qui, à l'époque, était contradictoire par rapport aux postulats de Koch (Koch R, 1876 ; Koch R, 1882). L'hypothèse que l'espèce *E. coli* est hétérogène et comprend des souches pathogènes à côté de souches commensales a été émise par un vétérinaire danois, Carl O. Jensen (Jensen, 1893). Mais aucune méthode ne permettait de les identifier.

En 1947, une première méthode d'identification des *E. coli* diarrhéiques a été développée par Kauffman qui décrit un schéma de sérotypage des souches d'*E. coli* basé sur les antigènes somatiques (O), flagellaires (H) et capsulaires (K) (Kauffman, 1947). Le terme *Escherichia coli* « entéropathogène » (EPEC) a été introduit pour la première fois en 1955 pour qualifier l'ensemble des souches d'*E. coli* impliquées dans les diarrhées infantiles dans les années 1940 et 1950 (Neter et al., 1955). La définition de ce terme a cependant changé avec le temps en fonction de la découverte des divers mécanismes de pathogénèse de ces souches. A la fin des années 1960 et au début des années 1970, deux types d'*E. coli* « entéropathogènes » ont été décrits : (i) les souches démontrant une invasion de type *Shigella* qui ont été appelées *E. coli* entéro-invasif (EIEC) (**Figure 1**) ; (ii) les souches produisant des entérotoxines thermostables (ST) et/ou une thermolabile (LT) qui ont été appelées *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) (**Figure 1**). La définition du terme « entéropathogènes » (EPEC) devenait plus restreinte et qualifiait dès lors « des *E. coli* diarrhéiques appartenant à des sérogroupes épidémiologiquement incriminés comme pathogènes, mais dont il n'a pas été prouvé que les mécanismes pathogènes soient liés soit aux entérotoxines thermolabiles (LT) ou thermostables (ST) ou à l'envahissement de type *Shigella* » (Edelman et Levine, 1983 ; WHO, 1980). La confirmation que ces souches EPEC sont pathogènes est venue grâce à des études réalisées sur des volontaires humains (Levine et al., 1987). Aujourd'hui, l'ensemble des souches associées à des diarrhées sont regroupées sous le terme « diarrhéogènes » et sous l'acronyme DEC.

En 1979, la première caractéristique phénotypique autre que le sérotypage associée aux EPEC a été l'observation de Cravioto (Cravioto et al., 1979) selon laquelle 80% des souches EPEC adhèrent aux cellules HEp-2 en culture, alors que la majorité des souches non EPEC n'y adhèrent pas. Par la suite, des différences dans les schémas d'adhérence ont été observés (Scaletsky et al., 1984 ; Nataro et al., 1987) : une adhérence localisée en microcolonies (LA), une adhérence diffuse (DA) sur l'ensemble de la surface cellulaire et une adhérence aggrégative (AggA) en « tas de briques ». Les schémas DA et AggA sont aujourd'hui associés à deux nouvelles catégories d'*E. coli* diarrhéogènes : *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et *E. coli* entéro-aggrégatifs (EAEC) (**Figure 1**) (Mainil et Fairbrother, 2014). Baldini et ses collaborateurs (Baldini et al., 1983) ont ensuite montré que l'adhérence LA de la souche EPEC E2348/69 (O127:H6) est associée à la présence d'un plasmide de haut poids moléculaire appelé plasmide

« du facteur d'adhérence EPEC » (EAF). Ce plasmide EAF est hautement conservé dans les souches EPEC présentant le schéma LA (Nataro et al., 1985a,b).

Une dernière étape fut franchie en 1983, quand Moon et son équipe ont proposé le terme « attachement et effacement » (A/E) pour décrire une lésion observée à hauteur des entérocytes dans des anses intestinales ligaturées de porcs et de lapins inoculées avec des souches EPEC : perte de microvillosités des entérocytes, attachement intime de la bactérie à la surface dénudée de l'entérocyte et formation de piédestaux au niveau du site de fixation des bactéries (Moon et al., 1983). Ils ont aussi proposé le terme « *E. coli* attachantes et effaçantes » (AEEC) pour les désigner, mais ce terme n'est plus fréquemment utilisé aujourd'hui. Cette lésion A/E est codée par un ensemble de gènes regroupés dans un îlot de pathogénicité présent sur le chromosome et appelé « Locus of Enterocyte Effacement » ou LEE (Knutton et al., 1987).

Initialement définis par le sérotype et par l'absence des propriétés des EIEC et des ETEC, les EPEC sont aujourd'hui définis comme des souches associées à des diarrhées, produisant la lésion A/E sur l'épithélium intestinal, renfermant l'îlot de pathogénicité LEE mais ne produisant pas les toxines de Shiga. Ces souches EPEC (**Figure 1**) sont subdivisées en souches « EPEC typiques » (tEPEC) présentes chez l'homme et caractérisées par un schéma d'adhérence LA et la présence du plasmide EAF et en souches « EPEC atypiques » (aEPEC) présentes chez l'homme et de nombreuses espèces animales et caractérisées par un schéma d'adhérence LA-like et l'absence du plasmide EAF (Kaper, 1996).

Parallèlement à ces différents travaux, deux épidémies de colites hémorragiques (HC) sévères, nécessitant une hospitalisation de 70% des malades, apparurent aux Etats-Unis au début des années 1980 après la consommation de hamburgers insuffisamment cuits. Ces épidémies étaient associées à une souche d'*E. coli* d'un sérotype particulier, O157:H7 (Pai et al., 1983). Par la suite, d'autres sérotypes ont été décrits associés à ce syndrome. Ils ont en commun la production de cytotoxines apparentées à la toxine de Shiga (Stx) de *Shigella dysenteriae* qui sont codées par des gènes majoritairement présents sur des bactériophages lambdaïdes intégrés sur le chromosome (Sekizaki et al., 1987) : ces souches sont appelées *E. coli* Shigatoxinogènes (STEC). Ces toxines Stx d'*E. coli* sont identiques à d'autres toxines découvertes quelques années plus tôt au cours d'une étude menée sur les selles d'enfants atteints du syndrome hémolytique et urémique (SHU) et mises en évidence sur des cultures de cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique), d'où le nom « Verocytotoxine » (Vtx) (Konowalchuk et al., 1977) qui est peu utilisé aujourd'hui. Cependant, les souches STEC sont hétérogènes (Piérard et al., 2012) : certaines présentes chez l'homme produisent différents facteurs d'adhérence, tandis que d'autres présentes chez l'homme et les ruminants produisent à la fois les toxines Stx et la lésion AE. Ces dernières sont fréquemment associées aux HC et SHU chez l'homme et sont appelées *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) en médecine humaine (**Figure 1**). Dans ce manuscrit, ces souches seront appelées AE-STEC pour refléter leurs principales caractéristiques microbiologiques. Pour être complet, ajoutons que des

souches STEC sont aussi présentes chez le porc. Elles appartiennent à des sérotypes particuliers, produisent des adhésines spécifique du porcelet et sont responsables du syndrome « maladie de l'œdème » chez des porcelets récemment sevrés. Dès 1950, l'hypothèse de l'intervention d'une toxine est émise qui fut aussi appelée « *Edema Disease Principle* » ou EDP (Timoney, 1950 ; Dobrescu, 1983). Cette toxine EDP fut identifiée à une toxine de Shiga en 1986 (Marques et al., 1986).

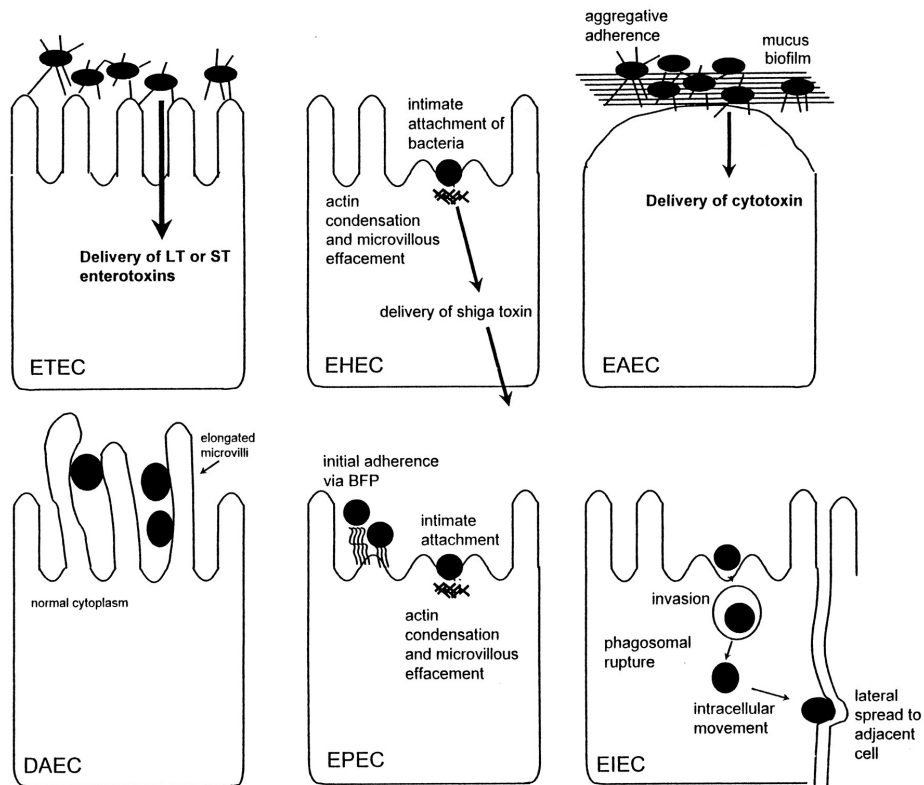


Figure 1 : Schémas pathogéniques des *E. coli* diarrhéiques (Nataro et Kaper., 1998).

Introduction

1. *Escherichia coli*

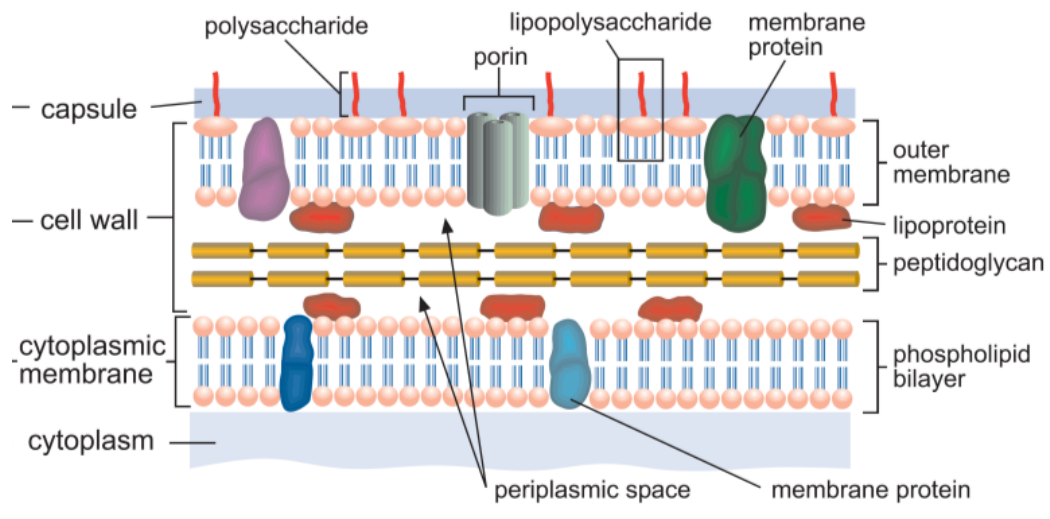
Le genre *Escherichia* a été dénommé d'après le médecin pédiatre allemand Theodor Escherich (1857-1911), qui, en 1885, a découvert dans des selles de nourrisson une bactérie en forme de bâtonnet. Ce dernier lui donna le nom de *Bacterium coli commune*, soit bacille commun du côlon (Escherich, 1885). Ce n'est qu'en 1958 que le nom de *Escherichia coli* (*E. coli*) lui a été attribué en mémoire de ce pédiatre (Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature, 1958).

E. coli est une bactérie appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un bacille à coloration Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase mais dépourvue d'oxydase. *E. coli* est une bactérie non sporulée, immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche. Sa température optimale de croissance est de 37°C et elle se réplique rapidement (toutes les 20 minutes) par division cellulaire ou scissiparité (Quinn et al., 2016). Ces caractéristiques sont utilisées pour sa recherche et son isolement dans l'environnement et l'alimentation. L'espèce *E. coli* est commensale du tube digestif des vertébrés, mais peut également être présente dans l'environnement par contamination fécale. Elle représente plus de 90% des bactéries aérobies du microbiote humain et se retrouve en proportions variables chez les différentes espèces animales (Tenailon et al., 2010). La niche écologique de cette bactérie se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du colon.

1.1 Structure

Sa structure est caractéristique des bactéries Gram négatives. La structure externe d'*E. coli* est composée d'une bi-couche phospholipidique qu'est la membrane interne, d'un espace périplasmique où se retrouve la structure du peptidoglycane et d'une bi-couche hétérogène externe. Le feuillet externe de la membrane contient une majorité de molécules de lipopolysaccharides (LPS). (**Figure 2a**). Sur ces membranes s'ancrent des *fimbriae*, des pili et des flagelles, bien que ces derniers ne soient pas toujours présents. Ces structures possèdent des rôles d'attachement aux muqueuses intestinales, de conjugaison plasmidique et de mobilité. La membrane cytoplasmique protège le cytoplasme contenant un chromosome unique d'ADN le plus souvent circulaire ainsi qu'un ou plusieurs plasmides (**Figure 2b**). Ce chromosome peut lui-même être porteur de bactériophages, transposons et de séquences d'insertion. Certaines *E. coli* expriment également une capsule polysaccharidique (Quinn et al., 2016).

2a



2b

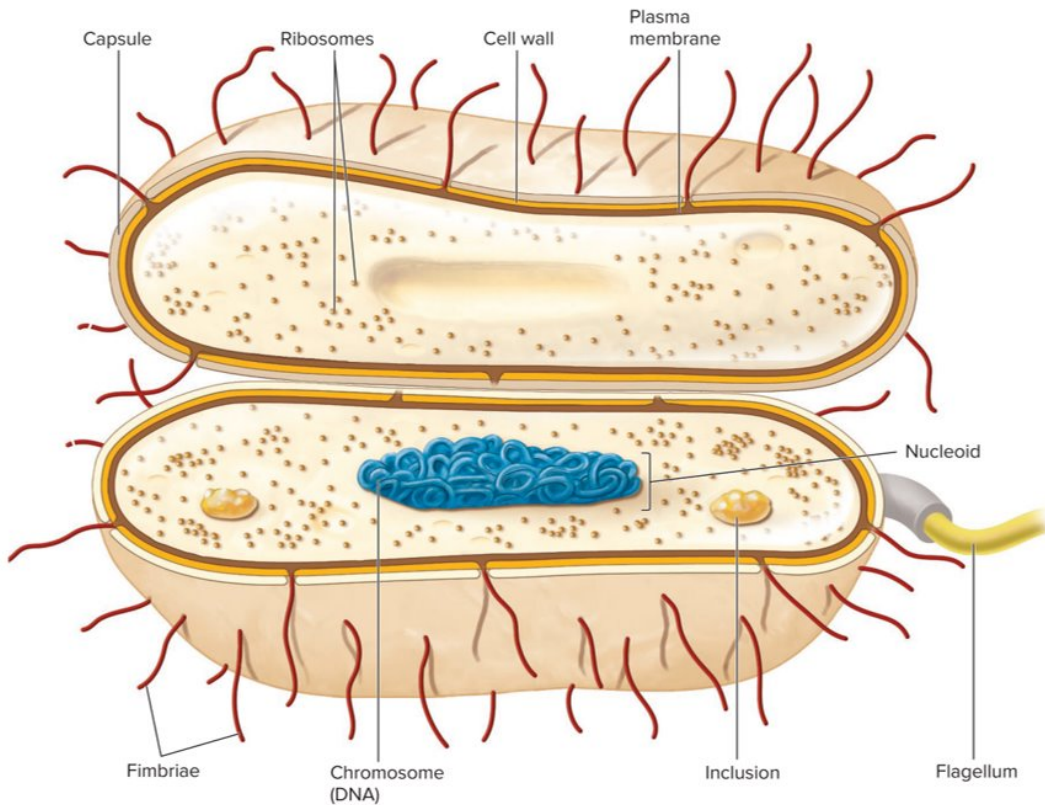


Figure 2 : Structure de la paroi d'une bactérie Gram négative (2a) (Concise Review Vet Microbiol, 2nd Edition) et structure générale d'une bactérie (2a) (adaptée de Vet Microb and Microbial Diseases, 2nd edition et Prescott's Microbiology, 11th Edition).

1.2 *E. coli* commensal et pathogène : notions de classification

Durant les années 1920 et 1930, plusieurs chercheurs essayèrent d'identifier les types spécifiques d'*E. coli* responsables des entéropathies. Cependant, aucun progrès significatif ne fut réalisé jusqu'à la mise au point par Kauffmann, dans les années 1940, d'un schéma de sérotypage inspiré de celui des salmonelles, permettant une classification des souches de l'espèce *E. coli* basée sur les combinaisons de certains antigènes de surface (Kauffmann, 1947 ; Who, 1980). Ainsi, à partir des années 1950, de nombreuses souches d'*E. coli* appartenant à des sérotypes particuliers ont été répertoriées, chez l'homme comme chez l'animal, comme étant des souches pathogènes responsables de pathologies diverses, allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères, parfois mortelles telles que septicémies, cystites, pyélonéphrites, méningites, arthrites, ... (Kaper et al., 2004).

Les nombreuses variations dues aux phénomènes d'acquisition et de délétion de gènes ont eu pour conséquence une grande diversité des génomes. Plusieurs approches génétiques ont permis, depuis plusieurs années, l'élaboration de classifications de l'espèce *E. coli*, indépendantes des notions de commensalité et de pathogénicité. Plusieurs classifications ont ainsi été proposées, se basant sur des caractéristiques différentes.

1.2.1 Classification selon le sérotype

Comme toutes les autres entérobactéries, *E. coli* possède trois antigènes majeurs de surface. L'antigène somatique O (AgO) qui signifie « Ohne Kapsul » est un composant du lipopolysaccharide qui entre dans la composition de la membrane externe des bacilles Gram négatifs. Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des AgO sont regroupés dans le cluster de gènes *rfb*. L'antigène flagellaire H (AgH) qui signifie « Hauch » est de nature protéique et représente le flagelle permettant la mobilité de la bactérie. Certaines souches peuvent perdre leur mobilité par perte d'expression du flagelle : elles sont alors classées comme non mobiles (NM ou H-). L'antigène capsulaire K (AgK) qui signifie Kauffmann ou « Kapsul » est un polysaccharide de surface. Il est présent de façon inconstante, mais bloque la reconnaissance de l'antigène O par des anticorps et donc le sérogroupage quand il est présent. Les capsules sont divisées en quatre groupes selon leur composition et biosynthèse (Whitfield et al., 1999). L'identification des antigènes O:K:H a permis de différencier des souches pathogènes entre elles et des souches commensales. En effet, certains sérotypes O:K:H ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment (Beutin, 1999). La détection par génétique moléculaire des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'AgO (*wzx*, *wzy*, *wzm* et *wzt*) et des gènes *fliC*, *flkA*, *fliA*, *flmA* et *fliN* pour l'AgH est un moyen d'identifier le sérotype des souches (Wang et al., 2003). Il existe un nombre considérable de combinaisons puisqu'il y a près de 188 antigènes O, environ 74 antigènes K, 56 antigènes H (Joensen et al., 2015 ; Mainil et Fairbrother, 2014 ; Furevi et al., 2020).

1.2.2 Classification selon les phylogroupes

Cette classification est basée sur le génome d'*E. coli*, il existe 8 phylogroupes principaux : A, B1, B2, C, D, E, F et G (Clermont et al., 2019). Ces phylogroupes correspondent à des lignages phylogénétiques majeurs et peuvent être identifiés par PCR multiplex ou *in silico* sur base des séquences génomiques (Beghain et al., 2018 ; Clermont et al., 2013). En 1984, les travaux d'Ochman et Selander ont permis de répartir les souches d'*E. coli* en quatre grands groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D 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). Cette classification n'a cessé de s'affiner avec l'apparition de nouveaux phylogroupes C, E, F et G (Clermont et al., 2019). Les phylogroupes A et B1 sont les plus répandus car ils se retrouvent chez tous les vertébrés et parfois dans l'environnement (Touchon et al., 2020). Cette classification est très utile d'un point de vue épidémiologique, puisque la prévalence des phylogroupes varie selon l'espèce considérée. Ainsi, chez l'être humain, le groupe A est prédominant (40,5%), suivi par le groupe B2 (25,5%), tandis que chez les autres mammifères, c'est le groupe B1 qui domine (41%), suivi par les groupes A (22%) et B2 (21%) (Beghain et al., 2018). De plus, dans l'espèce humaine, les groupe B2 et D sont associés aux *E. coli* pathogènes extra-intestinales, tandis que les phylogroupes A et B1 sont plutôt commensaux (Touchon et al., 2020 ; Duriez et al., 2001).

1.2.3 Classification selon le pathotype

La classification des *E. coli* en pathovars (ou pathotypes) est liée à la capacité des *E. coli* pathogènes à posséder plusieurs stratégies de virulence entraînant des troubles pathologiques. Il existe actuellement dix pathovars d'*E. coli* pathogènes qui peuvent être classés en deux groupes, les *E. coli* intestinaux ou « diarrhéogènes » (DEC) et les *E. coli* extra-intestinaux (ExPEC). Les DEC comprennent sept pathovars responsables des troubles intestinaux : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* productrices de toxines de Shiga (STEC, y compris les *E. coli* entérohémorragiques ou AE-STEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC ou EAaggEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) et le dernier pathovar, identifié plus récemment, les *E. coli* nécrotoxigéniques (NTEC). Le second groupe (ExPEC) est constitué de trois pathovars principaux, les *E. coli* septicémiques (SePEC), les *E. coli* aviaires (APEC) et les *E. coli* uropathogènes (UPEC) (**Tableau 1**).

Il existe donc une très grande et complexe diversité d'*E. coli* responsables de troubles intestinaux avec des mécanismes d'adhésion et d'action très différents selon les pathovars. Cette diversité est due aux échanges d'ADN entre bactéries permis par les différents systèmes de transfert horizontaux tels que la conjugaison, la transformation et la transduction.

Tableau 1 : Pathotypes d'*Escherichia coli* et facteurs de virulence associés pouvant être détectés chez les bovins ou chez l'homme, adapté de Mainil et Fairbrother, 2014

Classification	Name (acronym)	Primary hosts	Secondary hosts	Clinical signs and diseases	Most relevant virulence properties
Diarrhoeagenic <i>E. coli</i> (DEC)	Enterotoxigenic (ETEC)	Ruminants, pigs, dogs, humans	/	Healthy carriers Watery diarrhoea in newborn (ruminants, piglets, pups, babies); travellers' diarrhoea	Fimbrial adhesins (F2 to F6, F17a, F18, F41); afimbrial adhesin (AIDA); heatstable (STa, STb) and heat-labile (LT1, LT2) enterotoxins; α -haemolysin (α -Hly)
	Enteropathogenic (EPEC)	All mammals, including humans	/	Healthy carriers Undifferentiated diarrhoea	Attaching and effacing (A/E) lesion; type 4 BFP fimbriae of human typical (t)EPEC
	Necrotoxigenic (NTEC)	NTEC1: all mammals, including humans; NTEC2: ruminants	/	Diarrhoea and extra-intestinal infections (urinary tract infections, septicaemia)	Cytotoxic Necrotising Factors (CNF) 1/2; Cytolethal Distending Toxin III (CDT-III); α -Hly; fimbrial (Pap/Prs, Sfa/F1C and F17b/c) and afimbrial adhesins (AFA family)
	Diffusely Adherent (DAEC)	Animals, humans	/	Diarrhoea & extra-intestinal infections (urinary tract infections, septicaemia)	Afimbrial adhesins: AFA family and AIDA
	Enteroinvasive (EIEC)	Humans, primates	/	Dysentery	Invasion of and multiplication in the enterocytes
	EnteroAggregative (EAaggEC ou EAEC)	Humans	/	Diarrhoea	Fimbrial adhesins (AAF/Hda); toxins (Pet, EAST, ShET1); transcriptional activator gene (<i>aggR</i>)

	Attaching / Effacing VeroToxigenic (AE-STE/C)	Young ruminants, especially calves Humans	Dogs	Healthy carriers Undifferentiated acute or chronic diarrhoea Diarrhoea, haemorrhagic colitis (HC), haemolytic uremic syndrome (HUS)	A/E lesion; Verotoxins (VTx) play no role in ruminants A/E lesion; Verotoxins (Vtx) 1/2
	VeroToxigenic (VTEC ou STEC)	Pigs, humans	Ruminants = healthy carriers of human VTEC	Oedema disease (ED) in piglets; HUS in humans	Vtx 1/2; fimbrial (F18 of porcine VTEC) and afimbrial (Saa of human) adhesins
Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> (ExPEC)	SePticaemic (SePEC)	Ruminants	Other mammals	Septicaemia, bacteraemia, multi-systemic infection, endotoxaemia	Pap/Prs, Sfa/F1C, F17b/c, AFA-VIII, CS31A adhesins; CNF 1/2, CDT-III/IV and α -Hly toxins; endotoxin; blood vessel barrier crossing (IbeA); antiphagocytosis (O and K antigens); resistance to complement (Iss, TraT); iron-scavenging systems (aerobactin, yersiniabactin, salmochelin);
	UroPathogenic (UPEC)	Humans, dogs, cats	Other mammals	Cystitis, pyelonephritis (bacteraemia, septicaemia)	
	Avian Pathogenic (APEC)	Chickens, turkeys, ducks	Other poultry	Septicaemia, multi-systemic infection	

1.2.4 Classification selon les types séquentiels ou *sequence types* (ST)

Cette classification est effectuée sur base du MLST pour *multilocus-sequence-typing*. Cette technique de typage cible pour *E. coli* 7 gènes « de ménage », *housekeeping genes*, et les différences observées dans les séquences de ces gènes cibles permettent de classer les bactéries. Ces gènes sont identifiés par des réactions de polymérase en chaîne (PCR pour *polymerase chain reaction*) suivies de séquençage Sanger. À l'heure actuelle, suite au développement du séquençage complet du génome, les analyses sont également faites sur le *core genome* (cgMLST) ou le génome complet (wgMLST) et en fonction des propriétés des gènes, un type séquentiel (ST) et un complexe clonal (CC) sont attribués à la souche étudiée (Quainoo et al., 2017).

1.3 *E. coli* en tant qu'agent pathogène chez les bovins

E. coli est une bactérie résidente du microbiote digestif, mais elle peut être impliquée dans de nombreuses pathologies tant chez l'homme que les animaux. Chez les bovins elle est surtout associée aux diarrhées et septicémies néonatales. Elle se retrouve aussi dans des infections extra-intestinales chez l'adulte, souvent dues à une infection opportuniste, au niveau des glandes mammaires, de l'utérus ou du tractus urinaire (Quinn et al., 2016).

Les nouveau-nés sont plus sensibles aux infections pour plusieurs raisons. Leur immunité n'est pas développée dans les premières semaines de vie, et ils dépendent de l'immunité passive, transmise par le colostrum, pour lutter contre les infections. Cette immunité passive peut être déficiente, soit par un manque d'absorption du colostrum, soit par une mauvaise qualité de ce dernier. Avant la première semaine de vie, la flore commensale n'est pas encore totalement établie, et la colonisation par des bactéries pathogènes est alors plus facile, d'autant plus que certains récepteurs ciblés par les adhésines des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) ne sont présents que durant cette première semaine de vie (Markey et al., 2013). Des facteurs supplémentaires, tels qu'un élevage intensif ou le manque d'hygiène, augmentent également le risque d'infection par des *E. coli* pathogènes, via une transmission plus rapide et/ou un plus grand nombre de bactéries transmises, qui peuvent dès lors surpasser l'immunité colostrale (Markey et al., 2013).

1.3.1 Infections par *E. coli* chez les veaux

La contamination des veaux peut se faire via la voie féco-orale, après excrétion des *E. coli* pathogènes par les bovins adultes dans leurs matières fécales. Ensuite, les veaux malades présentant de la diarrhée vont accroître la contamination de l'environnement, via leurs excréments fécaux. Parmi les DEC responsables de la mortalité néonatale, les isolats les plus représentés sont d'abord les STEC suivi par les EPEC, les ETEC et enfin les AE-STEC (**Tableau 1**). L'apparition des STEC est plus fréquente chez

les veaux non diarrhéiques, alors que celle des ETEC est davantage observée chez les veaux diarrhéiques. La présence d'EPEC a été observée chez les veaux diarrhéiques et non diarrhéiques (Khawaskar et al., 2022).

Les bovins sont infectés par les STEC à l'âge du veau par des doses d'infections très faibles (<300 CFU) (Besser et al., 2001). Après une réplification initiale dans l'iléon, le caecum, et le côlon, une infection persistante est établie et est suivie d'une excrétion prolongée de la bactérie pendant plusieurs mois (Grauke et al., 2019). Pendant les périodes de faible exposition (au pâturage), les taux d'excrétion peuvent temporairement tomber sous le seuil de détection de la bactérie (Jonsson et al., 2001), mais le même clone de STEC peut se maintenir dans un même troupeau pendant des mois et des années (Liebana et al., 2005). Bien que les veaux excrètent des STEC plus longtemps que les bovins adultes (Cray et Moon., 1995) et que ces derniers soient porteurs d'anticorps spécifiques de Stx (Pirro et al., 1995), une infection antérieure par les souches STEC ne protège pas contre une réinfection par la même souche (Hoffman et al., 2006).

Les agents pathogènes majeurs associés aux diarrhées des veaux sont les cryptosporidies, les rotavirus et coronavirus, ainsi que les ETEC et les salmonelles. Les EPEC, les STEC et les AEEC peuvent également être impliquées dans les diarrhées, mais leur importance réelle est inconnue à cause du manque de test approprié pour le diagnostic de routine, mais également à cause de la prévalence des STEC chez les animaux sains, ce qui complique l'interprétation de la détection des *E. coli* dans les matières fécales (MF) des animaux malades (Smith et al., 2019).

En Belgique, la mortalité liée aux troubles digestifs est fortement présente chez les veaux de moins de six mois, puisqu'ils représentent 83% des cas de mortalité liée aux troubles digestifs identifiés en autopsie. Les *E. coli* sont fréquemment isolées : chez les veaux de moins d'un mois elles se retrouvent dans 41% des prélèvements contre près de 25% chez les veaux d'un à six mois (ARSIA, 2020).

Les septicémies sont l'une des causes majeures de mortalité chez les veaux, après les pathologies respiratoires. Les cultures sanguines montrent une prévalence de 80% de bactéries à Gram négative, où les *E. coli* sont majoritaires, et isolées dans plus de 50% des cas de septicémies (Smith et al., 2019). En Belgique, la majorité des cas de septicémie concerne les veaux de moins de 30 jours, et *E. coli* est isolée dans 80% des cas (ARSIA, 2020).

2. *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et *E. coli* productrices de toxines de Shiga (STEC)

2.1 Présentation des EPEC

Les EPEC sont définies par la formation de la lésion d'attachement et d'effacement (A/E) caractérisée par l'effacement des microvillosités intestinales par une adhésion intime spécifique entre la cellule bactérienne et la surface de l'entérocyte. Avec d'autres souches productrices de la lésion A/E (par exemple les souches AE-STEC), elles sont regroupées sous le terme d'AEEC pour *Attaching and Effacing E. coli*, quels que soient les signes cliniques associés et les autres facteurs de virulence (Nataro et Kaper., 1998).

Au sein des EPEC, il existe deux sous-groupes ; d'une part, les EPEC typiques (tEPEC) produisant des *fimbriae* BFP (*Bundle Forming Pili*) de type IV permettant l'adhérence initiale aux entérocytes. Les gènes *bfpA* codant ces *pili* sont situés sur le plasmide EAF (*EPC adhesion factor* ; pEAF). D'autre part, les EPEC atypiques (aEPEC) ne possédant pas ce plasmide EAF.

Les tEPEC et les aEPEC appartiennent à des sérotypes O:H spécifiques (**Tableau 2**). Cependant, certains sérotypes ne sont pas aussi facilement classifiés, principalement ceux qui incluent des souches productrices de Stx comme O26:H11 et O111ac:H8 (Nataro et al., 1998). Certaines souches d'aEPEC (par exemple O55:H7) sont plus étroitement apparentées aux STEC (par exemple STEC O157:H7) dans leurs caractéristiques génétiques et leurs propriétés de virulence.

Les tEPEC sont rarement trouvées chez les animaux et les humains sont le principal réservoir (Trabulsi et al., 2002). Les infections aux tEPEC sont caractérisées par une transmission possible entre humains par voie féco-orale et sont nombreuses dans les pays en voie de développement. Les aEPEC ont été isolées d'une large gamme d'animaux diarrhéiques ou non comme le veau et le bovin (Tozzoli et al., 2014), le lapin, le singe et peuvent être transmises à l'homme par des aliments contaminés d'origine animale (Hernandes et al., 2009). Dans ce manuscrit, les aEPEC seront dénommées simplement EPEC.

Chez l'homme, les EPEC sont responsables de la majeure partie des diarrhées infantiles et sont rarement incriminées 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 dans les pays en développement (Varela et al., 2015). Chez les animaux, elles sont responsables de diarrhées non sanglante chez les bovins dont les jeunes veaux de moins de 3 mois (Kobayashi et al., 2001), les ovins (de la Fuente et al., 2002), les porcs (Malik et al., 2006) et elles sont également responsables d'épidémies chez la volaille (Farooq et al., 2009 ; Dutta et al., 2011). Les signes cliniques peuvent varier d'une simple diarrhée, à une diarrhée aqueuse abondante mucoïde ou sanglante, accompagnée d'anorexie, de déshydratation et de léthargie (Swennes et al., 2012).

La lésion A/E se caractérise par l'effacement des microvillosités intestinales et l'attachement intime des bactéries à la surface épithéliale de l'hôte (Nataro et Kaper, 1998). Après avoir pénétré dans le tractus gastro-intestinal, les EPEC adhèrent à la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin et au moins trois étapes de pathogenèse ont été décrites (Ochoa et al., 2008). L'étape initiale comprend l'adhérence à la membrane des entérocytes. Après fixation, le système de sécrétion de type III (T3SS) est utilisé pour injecter des facteurs de virulence dans la cellule hôte. Enfin, un attachement bactérien intime et la formation d'un piédestal sont observés dû à l'accumulation d'actine polymérisée (**Figure 3**). L'apparition de ce phénotype est due à l'expression des gènes du locus d'effacement des entérocytes (LEE), et en particulier le gène *eae* (*E. coli attaching effacing*) (Bugarel et al., 2011).

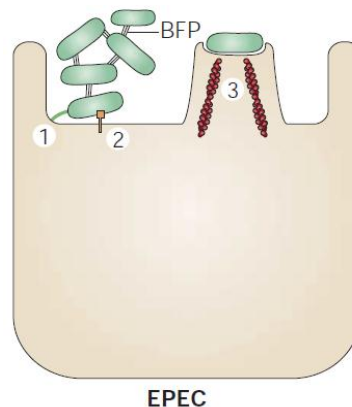


Figure 3 : Adhérence des EPEC aux entérocytes caractérisée par le développement de lésions d'attachement et d'effacement 1) Adhérence initiale 2) Translocation protéique par le T3SS 3) Formation du piédestal par la polymérisation de filaments d'actine (d'après Kaper et al., 2004).

Les EPEC peuvent appartenir à des sérotypes spécifiques à l'hôte (tels que O127 chez l'homme ou O15 chez le lapin) ou à des sérotypes non spécifiques à l'hôte, y compris le "gang-of-seven" des AE-STECC humains (O26:H11, O103:H2, O111:H-, O121:H19, O145:H-, O157:H7, et O165:H25) et/ou aux sérotypes classiques des AE-STECC des veaux diarrhéiques (O5:H-, O26:H11, O111:H-, O118:H16). Cependant, les sérotypes de la majorité des EPEC bovines restent non identifiés. Les EPEC sont également présentes chez les bovins sains (Moxley et Smith., 2010 ; Thiry et al., 2017 ; Thiry et al., 2018).

2.2 Présentation des (AE)-STECC

Les *E. coli* productrices de Shiga-toxines (STECC) sont principalement définies par leur capacité à produire des toxines apparentées à la toxine de Shiga (Stx) de *Shigella dysenteriae* type 1 capable d'induire des lésions au niveau de l'endothélium vasculaire intestinal, rénal et cérébral de l'homme, sous l'action de ces toxines. D'autre part, une partie des STECC sont capable de produire des lésions A/E lorsque l'îlot de pathogénicité LEE est présent (**Figure 4**) et sont appelées AE-STECC.

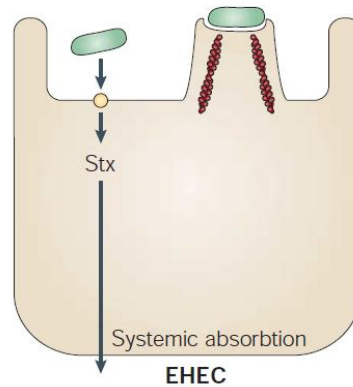


Figure 4 : Adhérence des AE-STEC aux entérocytes caractérisée par le développement des lésions d’attachement et d’effacement, puis d’un piédestal et la production de toxines de Shiga (Stx) (d’après Kaper et al., 2004).

Les AE-STEC représentent un risque important pour la santé publique dans les pays développés tels que les USA, Canada, Europe de l’Ouest ou encore le Japon.

L’Organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé que l’infection aux AE-STEC a causé plus d’un million de maladies et 100 décès en 2010 (Havelaar et al., 2015). Entre 1998 et 2016, la région européenne (176) et la région du Pacifique occidental (35) ont signalé 211 épidémies de STEC, soit beaucoup moins que le nombre d’épidémies sur le continent américain (708) (FAO/OMS, 2018).

La plus grande épidémie de STEC O157 jamais enregistrée s’est produite au Japon en 1996 (Fukushima et al., 1999) et la plus grave épidémie de STEC non O157 (O104) s’est produite en Allemagne, en 2011 (Frank et al., 2011). En 2018, une forte augmentation des cas de STEC a été signalée dans l’Union Européenne (UE). Le plus grand nombre de cas confirmés a été signalé par l’Allemagne et le Royaume-Uni, qui représentaient ensemble 47 % de tous les cas signalés dans l’UE. Les taux de notification par pays les plus élevés ont été observés en Irlande, en Norvège, en Suède, à Malte et au Danemark (**Figure 5**). Le groupe d’âge le plus touché par les STEC était les nourrissons et les enfants jusqu’à quatre ans, qui représentaient plus d’un quart de tous les cas confirmés en 2018. Une proportion encore plus importante d’enfants a été observée parmi les cas de SHU, où deux tiers des cas ont été signalés chez les 0-4 ans (EFSA, 2019). Dans des analyses récentes, la viande de bœuf et les produits frais (fruits et légumes) ont été incriminés comme étant les sources les plus importantes d’infections à STEC en Europe, chacune étant associée à 30 % des maladies (Pires et al., 2018).

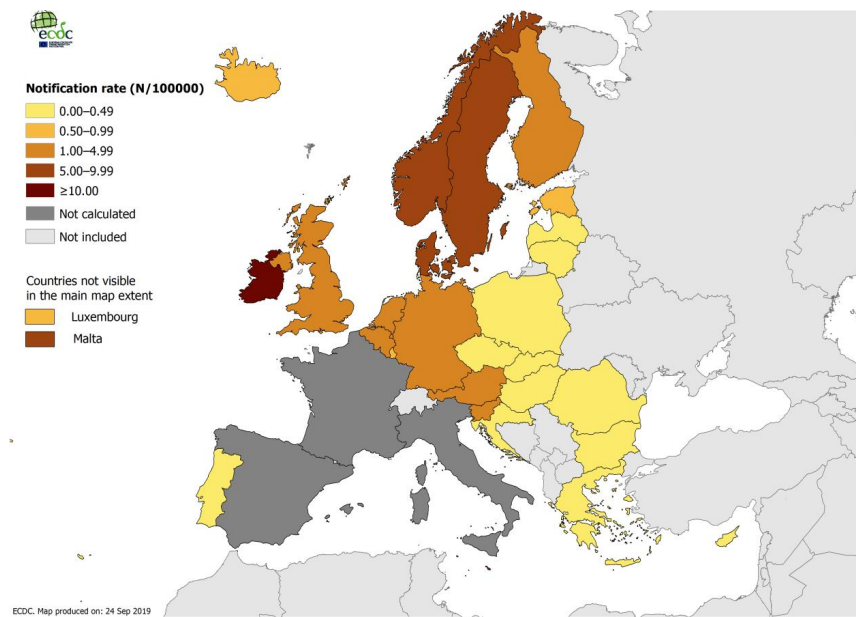


Figure 5 : Répartition des cas confirmés d'infection par les STEC pour 100 000 habitants en UE en 2018 (Rapport épidémiologie annuel pour 2018, ECDC).

Chez l'homme, les AE-STECS sont associées à des colites hémorragiques et/ou à un syndrome hémolytique et urémique. Les cas sévères sont observés chez les enfants et les personnes immunodéprimées (Davis et al., 2014). 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. Les complications observées peuvent se manifester sous la forme d'un SHU dans environ 10% des cas surtout chez l'enfant. 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. 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 (Tarr et al., 2005).

Les (AE)-STECS sont également responsables d'infection chez les animaux. Elles peuvent causer la maladie de l'œdème chez les porcs en post-sevrage et les jeunes porcs par la capacité de certains STECS à se fixer sur des récepteurs glycolipidiques présents chez le porc (Ching et al., 2002). Chez les ovins, les STECS touchent préférentiellement les animaux jeunes en causant de fortes diarrhées chez les agneaux (Wani et al., 2005). La volaille et les animaux domestiques comme le chien peuvent également être touchés par des diarrhées à STECS (Dutta et al., 2011 ; Sancak et al., 2004). Ils sont également responsables de diarrhées chez les veaux (Beutin et Fach., 2015).

Il existe une grande variété de sérotypes AE-STEC humains dont le "gang-of-seven" qui sont les plus fréquents et pathogènes dans le monde, et où O157:H7 et O26:H11 représentent la majorité des cas humains confirmés dans l'UE (Tozzoli et al., 2014 ; Beutin et Fach., 2015 ; Stevens et al., 2015 ; EFSA, 2019). Les STEC humains appartiennent quant à eux à des sérotypes comme O91:H21 et O113:H21 (Bando et al., 2017 ; Bielaszewska et al., 2009).

La transmission à l'homme peut se faire par différentes voies : consommation de viande et de produits laitiers (voie alimentaire), contamination des cultures ou de l'eau potable (voie hydrique) par des déchets animaux, ou transmission directe de personne à personne en raison d'une très faible dose infectante (Naylor et al., 2005). Dans de rares cas, la transmission du bétail à l'éleveur a été impliquée (Louie et al., 1999). Le rôle du bœuf haché en tant que vecteur des STEC semble diminuer, et des épidémies récentes ont été associées à des produits laitiers crus, des épinards, de l'eau de distribution (Salvadori et al., 2009) ou du fenugrec (Buchholz et al., 2011). Les épidémies d'origine alimentaire sont les plus répandues, suivies de la transmission de personne à personne. Les voies de transmission peuvent aussi rester inconnues comme pour le sérotype O80:H2. *E. coli* peut survivre pendant des mois dans l'environnement, ce qui peut entraîner la contamination de produits frais (Park et al., 2012).

Les bovins peuvent en effet être porteurs asymptomatiques dans leur tractus intestinal, plus particulièrement dans le côlon et au niveau de la jonction recto-anale (Naylor et al., 2003 ; Kudva et al., 2013 ; Persad et Lejeune, 2015). De plus, les jeunes veaux sont plus fréquemment porteurs sains d'AE-STEC que les animaux plus âgés (Cobbold et Desmarchelier, 2000 ; Mellor et al., 2016 ; Borwne et al., 2018). Les AE-STEC sont également responsables de diarrhées chez les veaux de moins de 3 mois. La majorité appartient à certains des « gangs-of-seven », tels que O26:H11 et O111:H-, et à quelques autres sérotypes, tels que O5:H-, O80:H2 et O118:H16 (Mainil et Fairbrother, 2014 ; Fakih et al., 2017 ; Habets et al., 2021).

Pour mieux comprendre la relation existante entre les STEC et les EPEC le schéma présenté en **Figure 6**, propose un système de classification où :

- toutes les souches possédant le LEE 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 AE-STEC sont des STEC

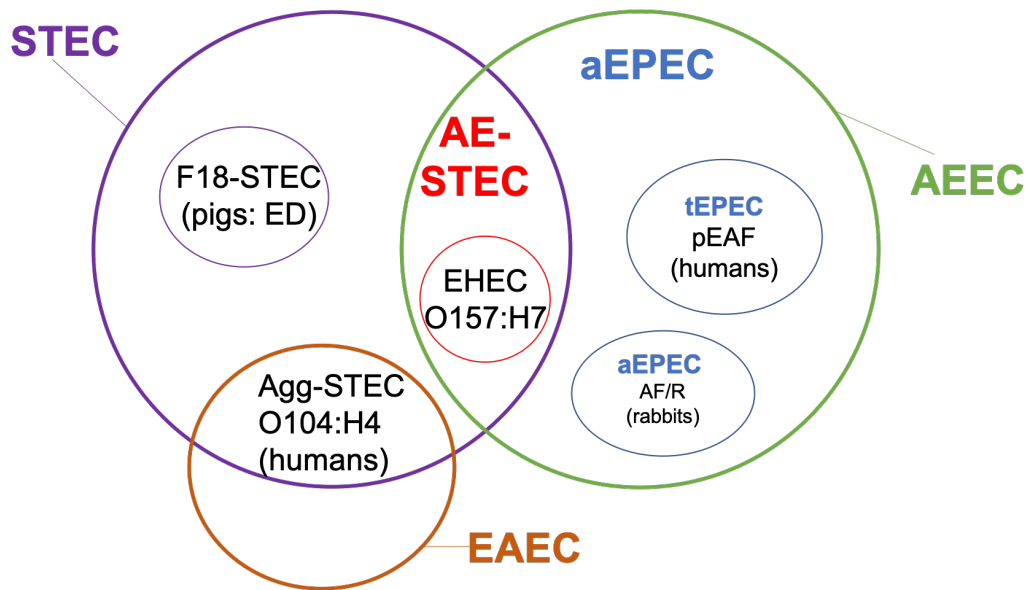


Figure 6 : Classification des STEC, AE-STECS, EPEC et AEEC. ED = edema disease, AF/R = Adherence Factor/Rabbit 1, pEAF = adherence factor plasmid (adaptée de Afssa – Saisine n°2010-SA-0031).

2.2.1 Aspect zoonotique

Les zoonoses sont des maladies causées par des infections qui se transmettent entre l'animal et l'homme. La gravité de ces maladies chez l'homme va de symptômes légers à des états susceptibles d'engager le pronostic vital. Les STEC sont des agents zoonotiques.

Les zoonoses d'origine alimentaire sont provoquées par la consommation d'aliments ou d'eau contaminés par des microorganismes pathogènes tels que des bactéries, des virus. Ces derniers pénètrent dans l'organisme par le tractus gastro-intestinal, où se manifestent souvent les premiers symptômes. Un grand nombre de ces microorganismes se trouvent couramment dans les intestins d'animaux sains producteurs d'aliments. Les risques de contamination sont présents à tous les stades de la chaîne alimentaire, de la ferme à la table, et ils requièrent une prévention et un contrôle tout au long de la filière (EFSA, 2020).

Les maladies d'origine alimentaire les plus courantes sont causées par les bactéries *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* et *Listeria*. Les zoonoses d'origine alimentaire représentent une menace importante et répandue dans le monde entier pour la santé publique. Dans l'UE, plus de 350 000 cas humains sont signalés chaque année mais le nombre réel de cas est probablement beaucoup plus élevé.

Pour protéger les consommateurs, l'UE a adopté une approche intégrée en matière de sécurité sanitaire des aliments qui couvre toute la chaîne alimentaire, de la ferme à la table. Cette approche intègre des mesures d'évaluation du risque (par exemple, collecte de données, analyse, recommandations) et des

mesures de gestion du risque (par exemple, mesures législatives, objectifs de réduction). Elles sont accompagnées et renforcées par des activités de communication réactives et efficaces (EFSA, 2020).

Les STEC sont des agents zoonotiques. Les ruminants tels que les bovins, les moutons, les chèvres et les cervidés sont les principaux réservoirs des STEC.

2.2.2 Traitements

La plupart des antibiotiques sont déconseillés pour traiter les infections aux AE-STECS. En détruisant les bactéries, ces derniers entraînent la libération de Shiga-toxines dans l'organisme, ce qui peut aggraver le SHU. Cependant, des traitements à base de certains antibiotiques, comme l'azithromycine, n'entraînant pas le relargage de ces toxines sont en cours d'évaluation. La stratégie thérapeutique du SHU consiste à compenser les déficiences occasionnées par les Shiga-toxines (chute des globules rouges, des plaquettes, atteinte rénale) par transfusion, dialyse, et échanges plasmatiques.

Les épisodes diarrhéiques sont, quant à eux, traités de manière symptomatique : les patients sont réhydratés, mais ne prennent pas d'anti-diarrhéiques, afin de permettre l'élimination de la bactérie et de ses toxines dans les selles.

Bien que de nombreuses stratégies de traitement aient été utilisées pour mettre au point un traitement thérapeutique ou prophylactique contre les maladies induites par les STECS, peu d'entre elles ont, à ce jour, dépassé les essais de phase II. Plusieurs approches, dont les anticorps monoclonaux, les analogues de récepteurs tels que Synsorb Pk, ou l'utilisation de l'éculizumab, semblaient prometteuses, mais lorsqu'elles ont été évaluées de manière systématique ou dans le cadre d'essais de phase III, elles ont montré peu de signes de succès (Mühlen et Dersch, 2020).

Tableau 2 : Sérotypes et sérogroupes retrouvés chez les tEPEC, aEPEC et AE-STE/C

Pathovars	Hôtes	Site de colonisation	Maladie	Réservoirs et sources	Adhésion	Marqueurs génétiques	Sérotypes ou sérogroupes majeurs	Références
tEPEC <i>E. coli</i> entéropathogène typique	Enfant < 5 ans, adulte	Intestin grêle	Diarrhée aqueuse abondante	Humain	Attachement et effacement	<i>eae, bfp</i>	O55:H6 O86:H34 O111:H2 O114:H2 O119:H6 O127:H6 O142:H6 O142:H34	Trabulsi et al., 2002 ; Afset et al., 2003 ; Chen et Frankel 2005 ; Varela et al., 2015
aEPEC <i>E. coli</i> entéropathogène atypique				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	
EHEC (AE-STE/C) <i>E. coli</i> entérohémorragique	Adulte, enfant	Iléon distal, colon	Diarrhée aqueuse, colite hémorragique, SHU	Humain, animal, aliments, eau	Attachement et effacement	<i>stx, eae</i>	O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157, O91	Croxen et al., 2013 ; Beutin et Fach, 2014

2.3 Les facteurs de virulence

2.3.1 Adhérence initiale

La lésion d'attachement et d'effacement a été décrite pour la première fois par Moon et al. 1983. La première étape se caractérise par l'attachement des agents pathogènes à la surface des entérocytes. L'adhérence s'effectue chez les tEPEC par l'intermédiaire d'un pilus de type 4 (T4P) nommé BFP. Le BFP de type IV est défini comme un organite fibrillaire dynamique qui peut s'étendre et se rétracter sur la surface bactérienne (Ramboarina et al., 2005). La protéine BFP est à l'origine d'une fixation à longue distance et non intime des EPEC aux récepteurs N-acétyl-lactosamine des cellules épithéliales intestinales (Girón et al., 1999). Par la suite, BFP recrute les cellules EPEC individuelles en agrégats, ce qui entraîne la formation de microcolonies sur la membrane de l'hôte. Ce type d'adhérence des EPEC est appelé phénotype d'adhérence localisée (AL) (Scaltsky et al., 1984).

Une variante du modèle AL a été décrite dans certaines souches d'aEPEC appelé LAL (*localized adherence-like*) (Rodrigues et al., 1996), d'autres souches peuvent exprimer des schémas d'adhérence distincts tels que DA (*diffuse-adherence*) ou AA (*aggregative adherence*) (Trabulsi et al., 2002).

Plusieurs autres adhésines (Paa, LpfAO113, Iha, Ehx, ToxB, LdaG) sont présentes dans les souches aEPEC et jouent probablement le même rôle que BFP dans l'adhérence (Hernandes et al., 2009).

Les souches (AE)-STEC adh rent aux cellules épithéliales coliques grâce aux ECP (*E. coli common pilus*) et aux HCP (*haemorrhagic coli pilus*) mais peuvent également utiliser d'autres moyens d'adhésion à la membrane des entérocytes par l'intermédiaire par exemple des facteurs Iha (*IrgA homologue adhesin*) (Tarr et al., 2000), Lpf (*long polar fimbriae*) (Doughty et al., 2002), ToxB (Tatsuno et al., 2001), Spf (*Sorbitol-fermenting protein*) (Brunder et al., 2001), Efa1 (*EHEC factor for adherence*) (Nichols et al., 2000), Paa (*Porcine attaching- and effacing associated*) (Batisson et al., 2003) présents également pour les EPEC ou Saa (*STEC autoagglutinating adhesine*) pour les STEC (Paton et al., 2001).

2.3.2 Locus of enterocyte effacement (LEE)

Les gènes nécessaires et suffisants pour la production de la lésion A/E sont regroupés sur un fragment d'ADN chromosomique de 35–45 kb, repr santant un îlot de pathogénicité (Pai) de type III, appelé à l'origine *Locus of enterocyte effacement* (LEE). Le LEE, décrit pour la première fois dans une souche EPEC E2348/69 (Mcdaniel et al., 1995) comprend jusqu'à 50 g nes et cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frames* ou ORF) répartis en cinq unités de transcription polycistroniques à savoir LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5, un opéron bicistronique (*glrA* et *grlR*) et plusieurs unités de transcription monocistroniques (**Figure 7**). L'opéron LEE1 héberge le gène régulateur *Ler* qui code une protéine de liaison à l'ADN qui agit comme un régulateur transcriptionnel, modulant l'expression des autres opérons

du LEE (Elliott et al., 2000) mais également les protéines chaperons CesAB et les composants structurels du T3SS tels que EscR, EscS, EscT, EscU, EscK (Soto et al., 2016) et EscL (Biemans-Oldehinkel et al., 2011). L'opéron LEE2 code la protéine chaperon CesD, trois composants du T3SS à savoir EscC, EscJ, SepD, l'effecteur EspZ et une ORF de fonction inconnue. Le LEE3 code trois composants du T3SS tels que EscV, EscN, SepQ, l'effecteur EspH et deux ORF de fonction inconnue.

Le LEE4 contient les gènes codant pour les protéines translocatrices EspB, EspD, EspA, EscF, la protéine chaperone CesD, la protéine SepL (Deng et al., 2005) et l'effecteur EspF2. Enfin, le LEE5 contient les effecteurs Tir, l'adhésine intimine *eae* et la protéine chaperon CesT. L'effecteur Map est situé en 5' du LEE5 (Kenny et Jepson, 2000) et l'effecteur EspG en 5' du LEE1 (Elliott et al., 2001). Le nombre de variants du gène *eae* qui code pour l'intimine a considérablement augmenté depuis les descriptions originales des prototypes EPEC (Blanco et al., 2004a). Il existe au moins 30 variants *eae*, à savoir $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 8$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, ξ , z , $z3$, η , $\eta 2$, θ , τ , $\iota 1$, $\iota 2$, κ , λ , μ , ν , υ , \omicron , π , ρ , et σ qui ont été définis jusqu'à présent (Yang et al., 2020).

Les changements induits par ces protéines comprennent la modification du cytosquelette de l'hôte (Campellone et al., 2004), des défauts dans la fonction des microtubules (Thomson et al., 2005), l'inhibition du transport d'ions (Hodges et al., 2008) et une perturbation dans la fonction de la barrière épithéliale (Viswanathan et al., 2009).

La régulation du LEE est très complexe puisqu'elle fait intervenir des régulateurs globaux et des régulateurs spécifiques dont certains sont codés par des gènes présents dans des prophages ou dans le LEE lui-même, et elle a lieu aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Mellies et Lorenzen, 2014).

Les LEE des EPEC humains et animaux peuvent différer en taille, en nombre de gènes et d'ORF et au niveau des sites d'insertion sur le chromosome (locus *selC*, locus *pheU*, locus *pheV*, etc.). Cependant, l'organisation interne des gènes sur le LEE est conservée (Goffaux et al., 2001). Le LEE des EPEC et des AE-STECS sont identiques à 93,9% au niveau de leur séquence génétique, bien que le LEE des AE-STECS possède 13 ORF supplémentaires à l'extrémité 5' en raison de l'insertion d'un prophage cryptique. Ainsi, chez les AE-STECS, la taille du LEE est de 43 kb et il comporte 54 ORF. Le nombre d'effecteurs transloqués varie d'environ 22 chez les EPEC et jusqu'à 39 chez certaines souches AE-STECS (Deng et al., 2012). Les séquences de gènes individuels peuvent être très variables et vont de l'invariance complète dans le cas des composants structurels du T3SS jusqu'à seulement 33,52 % d'identité, pour l'effecteur Tir.

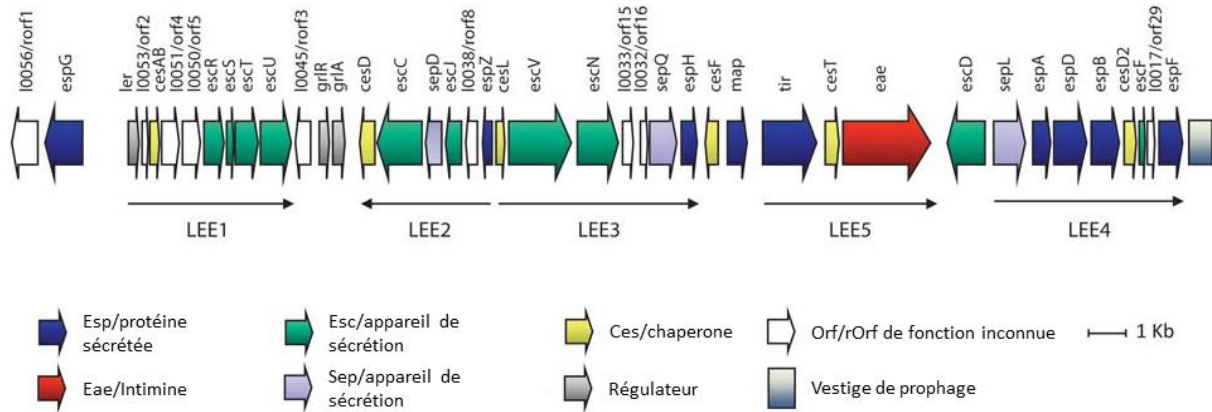


Figure 7 : Organisation schématique du LEE des AE-STEC/EPEC (Stevens et Frankel, 2014).

2.3.3 Le système de sécrétion de type III

Le T3SS ou injectisome des EPEC est un complexe nanomoléculaire d'environ 3,5 MDa d'une vingtaine de protéines qui permet l'injection de facteurs de virulence (ici appelés « effecteurs ») dans le cytoplasme des cellules intestinales. Ces effecteurs peuvent être codés par des gènes situés sur le LEE4 ou par des gènes localisés hors du LEE (Santos et Finlay., 2015). Un corps basal apparenté à celui des flagelles est ancré dans la paroi des bactéries et se prolonge par un filament rigide. Ce filament, formé par la polymérisation de la protéine EspA, permet la translocation des effecteurs grâce aux protéines EspB et EspD qui forment un pore dans la membrane de la cellule hôte (Tampakaki et al., 2004). EspB est également injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte et faciliterait l'effacement des microvillosités et l'inhibition de la phagocytose (Lizumi et al., 2007). La translocation des effecteurs nécessite une séquence signal N-terminal et/ou des protéines chaperons qui dirigent les effecteurs vers l'appareil de sécrétion (Ghosh, 2004). Les EPEC codent deux protéines chaperons CesT et CesF (*Chaperonne EPEC Secreted*). CesT facilite la translocation de plusieurs effecteurs dont Tir (*Translocated Intimin Receptor*), Map (*Mitochondrial Associated Protein*) et NleA (*Non-LEE A*) (Mills et al., 2013) tandis que CesF facilite la translocation d'EspF qui possède un rôle multifonctionnel tels que l'inhibition de la phagocytose (Quitard et al., 2006) et la perturbation des jonctions serrées (Guttman et al., 2006), ainsi que l'imitation de certains aspects de la voie de signalisation de la cellule hôte qui est impliquée dans le trafic membranaire (Alto et al., 2007) (**Figure 8**).

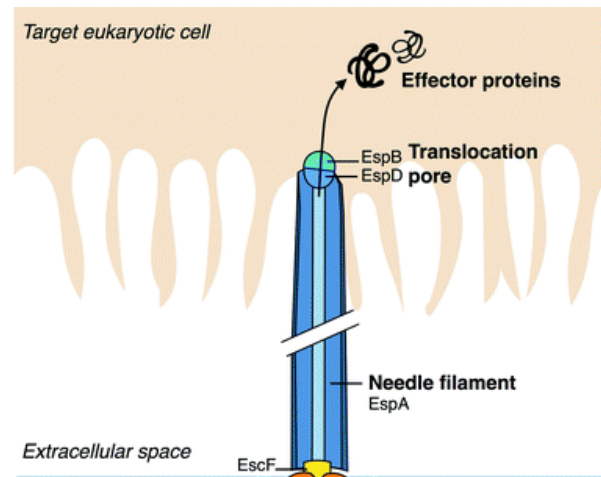


Figure 8 : Représentation du système de sécrétion de type III (adaptée de Slater et al., 2018).

Tir est intégré à la membrane plasmique selon une topologie en épingle à cheveux, la boucle étant tournée vers l'extérieur de la cellule où elle sert de récepteur à l'intimine adhésive bactérienne (Luo et al., 2000). L'interaction Tir-intimine induit le regroupement et la dimérisation de Tir, ce qui active une cascade de signaux qui commence par la phosphorylation des résidus sérine/thréonine et conduit à la polymérisation de l'actine et à la formation de piédestal sous la bactérie attachée (Lai et al., 2013).

L'événement le plus critique pour la polymérisation de l'actine est la phosphorylation du résidu Tir cytoplasmique Y474 (Devinney et al., 2001). Cela induit une cascade de signaux qui recrute l'adaptateur de la cellule hôte Nck et N-WASP requis pour engager et activer le complexe ARP2/3 qui produit la nucléation et la polymérisation de l'actine. La polymérisation de l'actine entraîne la protrusion de la membrane et la formation du piédestal (Goosney et al., 1999) (**Figure 9**).

L'action conjointe de Tir, Map et EspF, inhibe le transporteur sodium-D-glucose (SGLT-1), la principale pompe à eau de l'intestin grêle, responsable d'environ 70 % de l'absorption totale de liquide (Dean et al., 2006).

Map et EspF réduisent l'absorption de Na⁺ par l'échangeur sodium-hydrogène (NHE3) (Simpson et al., 2006), et les protéines EspG1/2 modifient le ciblage membranaire de l'échangeur Cl⁻/OH⁻ (DRA), ce qui réduit l'absorption de Cl⁻. Ces processus entraînent l'accumulation de sels dans la lumière intestinale, ce qui entraîne une perte d'eau de la muqueuse (Gill et al., 2007). EspF et EspG induisent également une mauvaise localisation des aquaporines (AQP), réduisant ainsi l'absorption d'eau épithéliale (Guttman et al., 2007). Map agit également comme un facteur d'échange guanine-nucléotide pour CDC42 pour aboutir à la formation des filopodes qui entourent les microcolonies bactériennes (Alto et al., 2006). Map perturbe aussi la structure et la fonction mitochondriales (Ma et al., 2006).

Un deuxième effecteur multifonctionnel, EspF, est dirigé vers les mitochondries et déclenche la voie de la mort mitochondriale (Nougayrède et Donnenberg., 2004). Les protéines Nle jouent également un rôle dans la virulence des EPEC dont NleA qui réduit le trafic de protéines et perturbe les jonctions serrées. Tout cela entraîne l'effacement des microvillosités, et cette réduction de la surface absorbante exacerbe probablement la diarrhée causée par les EPEC (Lizumi et al., 2007) (**Figure 9**).

Le mécanisme de formation du piédestal par les AE-STEPC est légèrement différent de celui utilisé par les EPEC. Tir n'est pas phosphorylée, et la formation du piédestal est indépendante de Nck. Les réarrangements de l'actine nécessaires à la formation du piédestal sont médiés par la protéine de couplage du cytosquelette Tir (TccP ; également connue sous le nom d'EspFU), qui est liée à Tir par l'intermédiaire de la protéine hôte « *insulin receptor tyrosine kinase substrate* » (IRTKS ; également connue sous le nom de BAIAP2L1) et interagit avec N-WASP pour activer le complexe ARP2/3 (**Figure 9**).

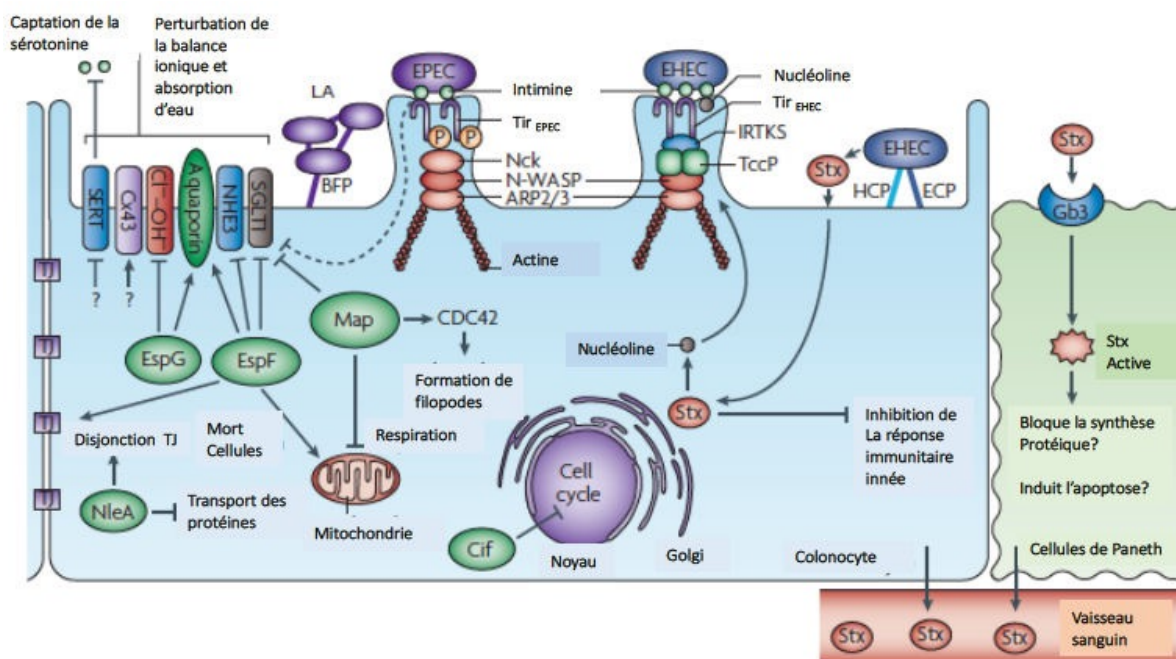


Figure 9 : Mécanismes pathogènes des EPEC et des EHEC (=AE-STEPC) (adaptée de Croxen et Finlay., 2010).

2.3.4 Les Shiga-toxines

Le terme « toxine de Shiga » a tout d'abord été utilisé pour identifier les toxines produites par *Shigella dysenteriae* de type 1 (Stx) donnant naissance aux termes *Shiga-like toxin* (O'Brien et al., 1982) et, plus tard, Shiga-toxine, quand celles-ci ont été identifiées chez *E. coli*.

Ce terme a remplacé celui de « Vérotoxine » utilisé pour caractériser des toxines lysant les cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe) chez *E. coli* (Konowalchuk et al., 1977), identifiées plus tard aux Shiga-toxines (Bergan et al., 2012).

En plus de *S. dysenteriae* et de certaines *E. coli*, des Shiga-toxines sont produites par quelques souches de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Shigella flexneri* (Herold et al., 2004).

Il existe deux types de Shiga-toxines : les Shiga-toxines de type 1 (Stx1) codées par les gènes *stx1* qui sont très proches de la Stx de *S. dysenteriae* et les Shiga-toxines de type 2 (Stx2) codées par les gènes *stx2* qui présentent moins de 60 % d'homologie avec la séquence en acides aminés des Stx1 (Karch et al., 2005; Strockbine et al., 1986). Quatre variants pour le gène *stx1* ont été décrits (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d* et *stx1e*), codant pour quatre toxines Stx1 dont les séquences ne diffèrent que très peu, sans conséquence sur l'antigénicité et la toxicité cellulaire. Initialement, 8 variants pour le gène *stx2* ont été décrits (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*, *stx2h*) et depuis de nouveaux sous-types de Stx2 sont continuellement identifiés tels que *stx2i*, *stx2j*, *stx2k*, *stx2l*, *stx2m* (Yang et al., 2020 ; Bai et al., 2021 ; Gill et al., 2022), lesquels diffèrent plus les uns des autres dans leur antigénicité, leur toxicité et leurs séquences génétiques que les variants Stx1 (Bai et al., 2018). La toxine Stx2 est la plus fréquente parmi les STEC et est considérée comme la plus toxique avec les sous-types *stx2a*, *stx2c* et *stx2d* les plus fréquemment associés au développement de maladie graves lors d'une infection humaine dont le SHU (Krüger et Lucchesi, 2015 ; Koutsoumanis et al., 2020).

Les STEC produisant les sous-types *stx2b*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g* sont généralement associées à des infections animales, comme chez les cerfs, les porcs, les pigeons et les bovins (Hughes et al., 2019 ; Luna-Gierke et al., 2014 ; Farooq et al., 2009). Les souches produisant Stx2f sont fréquemment trouvées chez les pigeons et autres oiseaux (Murakami et al., 2014). En 2018, Stx2h et Stx2i ont été identifiés dans des souches de STEC isolées de marmottes sauvages et de crevettes, respectivement (Bai et al., 2018 ; Lacher et al., 2016). Stx2k a été isolée à partir de souches bactériennes de diverses sources, y compris des animaux (chèvres et porcs), de la viande crue (bœuf et mouton) et de patients humains atteints de diarrhée (Hughes et al., 2019 ; Yang et al., 2020). La présence concomitante de plusieurs gènes *stx* a aussi été détectée dans une même bactérie avec la présence des gènes *stx1* et *stx2* ou la présence de plusieurs variants du gène *stx2* (Feng et Reddy, 2013 ; Friedrich et al., 2007 ; Prager et al., 2011). La production de plusieurs Shiga-toxines influence le pouvoir pathogène des souches : une étude montre qu'une souche exprimant une seule variante de la toxine est plus pathogène qu'une souche exprimant plusieurs variantes d'une même toxine (Krüger et al., 2011).

Les Shiga-toxines appartiennent à la famille de toxines AB₅. Chez *E. coli*, les Shiga-toxines sont codées par deux gènes *stx* (*stxA* et *stxB*) formant un opéron et généralement présents sur un prophage lambdaïde (*stx-converting bacteriophage* ou *stx-phage*) qui est un élément génétique mobile (Herold et al., 2004). L'opéron codant pour les Shiga-toxines 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 (toxic Activity) de 32.2 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 (Menge, 2020).

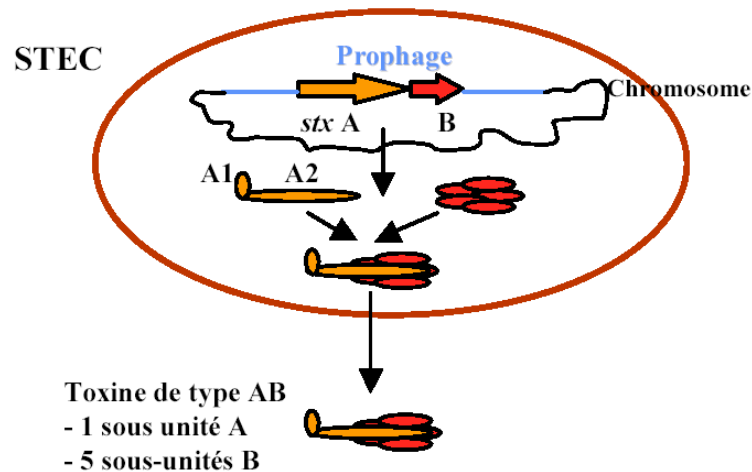


Figure 10 : Structure de l'opéron codant les Shiga-toxines (AFSSA 2003).

Après ingestion via des aliments contaminés ou de l'eau contaminée, les STEC colonisent la muqueuse intestinale et produisent les toxines de Shiga. Il est supposé que la toxine est libérée dans la lumière intestinale suite à la lyse bactérienne après induction du cycle lytique du phage (Wagner et al., 2002). La manière dont les toxines traversent l'épithélium intestinal reste inconnue mais des études *in vitro* ont démontré le transport paracellulaire et transcellulaire des Stx (Hurley et al., 2001 ; Tran et al., 2014). Les toxines atteignent les cellules cibles via la circulation sanguine (Karmali et al., 1985). 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 aux récepteurs glycolipidiques des cellules endothéliales : globotriaosylcéramide (Gb3) chez l'Homme, présent au niveau du tube digestif, des reins et du système nerveux central ou globotetraosylcéramide (Gb4) chez le porc (Müthing et al., 2012). La plupart des variants Stx1 et Stx2 lient Gb3 sauf le variant *stx2e* qui lie Gb4. D'autres toxines comme *stx1a* et *stx2a* peuvent également interagir avec Gb4 mais avec une plus faible affinité (Müthing et al., 2012).

L'absence signalée de récepteurs aux Stx sur l'endothélium bovin, au moins dans les petits vaisseaux de l'intestin (Wurzner et al., 2014), a conduit à l'hypothèse que les bovins sont résistants aux Stx (Pruimboom-Brees et al., 2000) et donc à une absence d'altérations microangiopathiques.

Cependant, les travaux de différents groupes ont fourni des preuves substantielles que différents types de cellules cibles pour les Stx telles que les cellules endothéliales de la veine ombilicale et de l'aorte bovine existent chez les bovins (Perera et al., 1999) mais ne peuvent pas y pénétrer efficacement (Sapountzis et al., 2020).

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 par le complexe protéique transmembranaire Sec61. La partie A1 ainsi clivée est transloquée dans le cytoplasme jusqu'à sa cible, la sous-unité 60S du ribosome où elle clive un résidu de purine de l'ARNr modifiant la fonction des ribosomes, qui ne sont plus capables d'interagir avec les facteurs d'élongation EF1 et EF2. Ceci conduit à l'arrêt de la synthèse protéique et à la mort de la cellule (**Figure 11**) (Bergan et al., 2012).

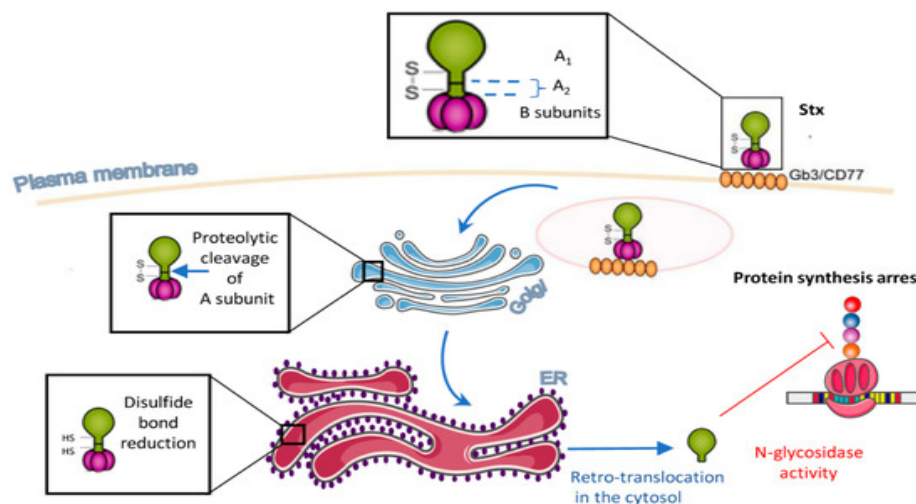


Figure 11 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines. 1) Fixation 2) Internalisation 3) Transport rétrograde 4) Clivage et Action (d'après Pacheco et Sperandio 2012).

2.3.5. Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence potentiels, codés par des gènes présents sur le chromosome et/ou sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages ou îlots de pathogénicité), ont été décrits chez les souches EPEC et AE-STEC :

Le gène *katP* code une catalase/peroxidase et permet aux souches de *E. coli* de résister au stress oxydatif (Heimer et al., 2002).

Le gène *efal* code des protéines homologues impliquées dans la formation de lésions A/E qui permettent l'adhésion des EPEC et des STEC aux cellules épithéliales (Badea et al., 2003).

Le gène *tccP* n'est que le deuxième effecteur après Tir qui joue un rôle direct dans la polymérisation de l'actine induite par les AE-STECS (Garmendia et al., 2005).

Le gène *gadAB* encode la glutamate décarboxylase et protège *E. coli* des effets toxiques du pH bas et des acides de fermentation, facteurs présents dans la lumière intestinale (Grant et al., 2001).

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).

Les gènes *ehxA* et *hlyA* codent les enterohémolysine A et α -hémolysine, qui sont impliquées dans la lyse cellulaire des lignées lymphocytaires et érythrocytaires en formant des pores dans la membrane cellulaire (Lorenz et al., 2013). Ces toxines sont détectées chez les souches EPEC et les STECS isolées de cas cliniques graves, d'animaux malades et de l'environnement (eaux usées d'origine humaine et animale) (Kobayashi et al., 2013).

Le gène *iha* (*IrgA* homologue adhésin) 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 STECS et AE-STECS. Cette protéine contribue à la virulence des souches en favorisant leur fixation (Tarr et al., 2000).

Le gène *saa* (*STECS autoagglutinating adhésin*) code une adhésine non fimbriale auto-agglutinante. Elle a été mise en évidence dans des souches STECS responsables d'infections humaines et animales et isolées de l'environnement (Amézquita-Lopez et al., 2014).

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 STECS en général cette toxine est responsable de thrombose et de nécrose en agissant via l'arrêt de la synthèse protéique des cellules (Galli et al., 2010).

Les gènes des *long polar adhésin* (Lpf) sont présents chez de nombreuses souches d'*E. coli*. Si leur rôle dans l'adhésion des souches STECS est avéré, il n'est cependant pas clairement défini chez les EPEC (Tatsuno et al., 2006).

Les différents gènes de virulence étudiés dans cette étude ainsi que leurs fonctions sont représentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Gènes de virulence retrouvés chez les souches EPEC et (AE)-STEC d'*E. coli*.

	Gènes	Support génétique	Noms	Fonctions	Références
Gènes associés au LEE	<i>espA</i>	LEE4	Protéine de secretion d' <i>E. coli</i>	Formation de la seringue moléculaire et translocation de protéines	Garrido et al., 2006
	<i>espB</i>				
	<i>espD</i>			Cible les mitochondries, provoque la mort de la cellule	
	<i>espF</i>				
	<i>map</i>	LEE5	<i>Mitochondrial associated protein</i>	Cible les mitochondries, formation filipodes,	Lizumi et al., 2007
	<i>tir</i>		<i>Translocated intimin receptor</i>	Récepteur de l'intimine, formation de la lésion A/E et du piédestal	Garrido et al., 2006
	<i>eae</i>		<i>Intimine</i>	Protéine d'adhésion, formation lésion A/E	Garrido et al., 2006
	<i>espG1/2</i>	LEE1	Protéine de secretion d' <i>E. coli</i>	Module et perturbe le cytosquelette	Clements et al., 2011
	<i>espZ/sepZ</i>	LEE2		Régule la translocation de protéines effectrices codées par le LEE	Berger et al., 2012
<i>espH</i>	LEE3	Perturbe le cytosquelette		Roxas et al., 2018	
Gènes non codés par le LEE	<i>nleA/espI</i>	prophage	<i>Non LEE-encoded effector</i>	Perturbe les jonctions serrées	Thanabalasurari et al., 2010
	<i>nleB</i>	prophage		Interfère avec la réponse inflammatoire de l'hôte	Gao et al., 2013
	<i>nleC</i>	prophage		Supprime la réponse inflammatoire de l'hôte	Sham et al., 2011
	<i>cif</i>	Phage lambdaïdoïde	<i>Cycle inhibiting factor</i>	Cycloglobuline empêchant la progression du cycle cellulaire puis l'apoptose	Samba-Louaka et al., 2009
	<i>espJ</i>	prophage	Protéine de secretion d' <i>E. coli</i>	Inhibe l'opsonophagocytose par les globules rouges	Marchès et al., 2008
	<i>espC (EPEC)</i> <i>espP(AE-STE C)</i>	prophage pO157		Perturbe les jonctions épithéliales, mucinase, clive le facteur de coagulation humain V	Dziva et al., 2007
Autres gènes présents sur le chromosome/plasmide	<i>ehxA</i>	pO157	Entérohémolysine A	Cytotoxine capable de lyser les érythrocytes, induit la libération de cytokines inflammatoires	Lorenz et al., 2013
	<i>efa1</i>	chromosome	<i>EHEC factor adherence</i>	Colonisation du tube digestif des bovins et inhibe l'action des lymphocytes	Badea et al., 2003
	<i>tccP</i>	prophage	<i>Tir-cytoskeleton coupling protein</i>	Formation lésion A/E, polymérisation de l'actine	Garmendia et al., 2005
	<i>gad</i>	chromosome	<i>Glutamate decarboxylase</i>	Maintient pH neutre intracellulaire	Grant et al., 2001
	<i>etpD</i>	pO157	<i>Type II secretion protein</i>	En lien avec la sécrétion du StcE	Lathem et al., 2003
	<i>katP</i>	pO157	Catalase, peroxydase	Protège contre les dommages oxydatifs	Heimer et al., 2002
	<i>iha</i>	chromosome	<i>IrgA homologue adhesin</i>	Adhésine, acquisition du fer par la bactérie	Tarr et al., 2000
	<i>hlyA</i>	chromosome	α -hemolysin	Lyse des lymphocytes et érythrocytes	Lorenz et al., 2013
	<i>saa</i>	pO113	<i>STEC autoagglutinating adhesin</i>	Adhésion par autoagglutination observée chez les STEC	Amézquita-Lopez et al., 2014
	<i>subA</i>	pO113	Cytotoxine subtilase	Induit l'arrêt de la synthèse protéique	Paton et al., 2004
	<i>lpfA</i>	chromosome	<i>Long polar fimbriae</i>	Rôle d'adhésion pour les souches STEC	Tatsuno et al., 2006
	<i>stcE</i>	pO157	Métalloprotéase et mucinase	Protéase contribuant à l'adhésion intime des AE-STE C	Grys et al., 2005

2.4 O80:H2, un sérotype émergent

A côté des sérotypes AE-STECS les plus fréquents dans l'Union européenne et en Suisse (O26:H11, O103:H2, O111:H-, O121:H19, O145:H-, O157:H7), des dizaines d'autres sérotypes peuvent également être détectés quoique beaucoup plus rarement (EFSA, 2017 ; Fierz et al., 2017 ; Mainil et Fairbrother, 2014). Cependant, certains de ces sérotypes AE-STECS plus rares peuvent aussi émerger, comme le sérotype O80:H2 qui a émergé en France en 2014. Ces souches AE-STECS O80:H2 portaient les gènes de toxine de Shiga *stx2a*, *stx2c* ou *stx2d*, et le sous-type rare d'intimine *eae*ξ. Ce sérotype O80:H2 était cependant associé non seulement à des colites hémorragiques et au syndrome hémolytique-urémique, mais aussi à une bactériémie et à des abcès profonds (Soysal et al., 2016). Les patients présentaient une défaillance de plusieurs organes, une atteinte étendue du système nerveux central et une microangiopathie thrombotique étendue (Mariani-Kurkdjian et al., 2014).

En effet, les AE-STECS O80:H2 représentent un pathotype hybride qui combine les facteurs de virulence classiques des AE-STECS (*stx*, *eae*, ...) avec des déterminants de virulence extra-intestinale (Cointe et al., 2018). Le phénotype de virulence extra-intestinale est attribué à la présence d'un plasmide porteur de gènes de virulence qui permettent la translocation de l'intestin vers des sites extra-intestinaux et la survie d'*E. coli* dans le sang et les organes internes. Ce plasmide est dénommé pS88, car il est étroitement relié au plasmide pS88 que l'on trouve dans les *E. coli* septicémiques aviaires (APEC) et dans ceux responsables de méningites néonatales chez les jeunes enfants (NMEC). Le plasmide pS88 porte notamment les gènes *iro* (acquisition du fer), *iss* (résistance au sérum) et *hlyF* (hémolysine aviaire), *sitABCD* (transporteur ions), *iutA* (récepteur du fer), *iucC* (synthèse aérobactine) et *ompTp* (protéase) (Peigne et al., 2009). De plus, certains plasmides pS88 portent également une cassette génétique qui confère une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques (aminoglycosides, tétracyclines et β-lactames) et aux métaux lourds comme le mercure, formant ainsi des plasmides mosaïques, comme le plasmide (pR444_A).

Ce sérotype AE-STECS O80:H2 émergent, appartient au ST301, au complexe clonal CC165 et forme un groupe distinct dans la phylogénie des AE-STECS, car il appartient au phylogroupe A (Cointe et al., 2018), alors que les autres appartiennent au phylogroupe E (O157:H7) ou B1 (sérotypes non O157) (Denamur et al., 2021), ce qui suggère que le sérotype O80:H2 a émergé indépendamment des autres sérotypes AE-STECS.

En dehors de la France, des souches AE-STECS O80:H2 ont également été identifiées, mais de manière plus sporadique chez l'homme en Belgique (De Rauw et al., 2019), en Suisse (Fierz et al., 2017), en Hollande (Wijnsma et al., 2017) et au Royaume-Uni (Rodwell et al., 2021).

Des données récentes suggèrent d'ailleurs que le sérotype O80:H2 est devenu le deuxième sérotype AE-STECS le plus fréquemment isolé en 2016 en France (Bruyand et al., 2019).

Il est également le troisième sérotype AE-STE C le plus fréquemment isolé parmi les cas de SHU en Europe en 2019, responsable de 9% des SHU européens (EFSA, 2021).

Une étude récente a aussi révélé que 40% des 104 *E. coli* entéropathogènes atypiques (aEPEC) isolés de veaux belges diarrhéiques entre 2009 et 2015 appartiennent au sérotype O80:H2 et portent le gène *eae* ξ (Thiry et al., 2017). Par contre, aucune souche AE-STE C O80:H2 n'avaient été identifiées chez ces veaux diarrhéiques avant nos travaux. Enfin, aucune souche AE-STE C ou EPEC O80:H2 n'avait pu être isolée à partir de prélèvements fécaux de bovins sains réalisés dans deux abattoirs belges en 2014 (Thiry et al., 2018).

3. Les bactériophages

3.1 Historique

La découverte des bactériophages fait l'objet d'une controverse. Selon la source, elle est attribuée au bactériologiste anglais Frederick Twort ou au biologiste Franco-canadien Félix Hubert D'Hérelle. Dès 1896, des études faisaient allusion à l'existence de « phagelike » ayant une activité antibactérienne. A l'époque, Ernest Hanbury Hankin (bactériologiste britannique) s'intéresse de près aux propriétés bactéricides des eaux de la Jumna et du Gange, deux fleuves d'Inde, lorsqu'il constate que les colonies de bactéries de choléra (*Vibrio cholerae*) qui ont prospéré dans l'eau du robinet meurent rapidement dans l'eau du Gange. Il poursuit donc son expérience en utilisant l'eau du Gange filtrée ou bouillie (30 min à 115 °C). À sa grande surprise, tandis que l'eau filtrée continue à montrer un effet antibactérien, l'eau bouillie n'a plus cette propriété. Ceci indiquait clairement que le facteur responsable de l'action bactéricide de l'eau était thermolabile, mais pas non filtrable avec le filtre Pasteur utilisé dans son expérience (Born et al., 2015 ; Hankin, 1896). Malgré ses observations, il ne détermine ni l'origine ni la nature de cette substance active présente dans les deux fleuves.

Frederick William Twort quant à lui, a déjà relevé en 1914 plusieurs de ces caractéristiques au cours de ses travaux sur le virus de la vaccine qu'il publie dans le journal *The Lancet* (Twort, 1915). Il a obtenu sur certains tubes de gélose inclinée, une culture d'un microcoque dont certaines colonies prenaient un aspect vitreux et transparent. Néanmoins il abandonne ses recherches sur ce phénomène.

En 1916, au cours de ses recherches au sein de l'institut Pasteur à Paris, Félix Hubert D'Hérelle observe la formation de cercles de lyse sur des cultures de *Shigella dysenteriae*, bactérie responsable de la dysenterie bacillaire. Intrigué par la ou les causes de ce phénomène, il poursuit ses recherches et parvient ainsi à isoler un « microbe » qu'il nomme anti-Shiga à partir de selle de personnes malades. Le filtrat actif de selles mis au contact d'un bouillon de culture de bacilles de *Shigella* provoque leur lyse dans un laps de temps très court (D'Herelle, 1917). La poursuite de ses travaux lui permet de déduire qu'il s'agit d'un microorganisme, capable de se multiplier en présence de bactéries intègres, capable de traverser les filtres utilisés à l'époque, transmissible d'une culture à l'autre et non pathogène à l'égard des animaux (D'Herelle, 1917; 1918a). Persuadé que ce micro-organisme est unique et qu'il appartient à un genre nouveau, il le nomme « Bacteriophagum intestinalis » (D'Hérelle F, 1918b) et envisage de l'utiliser pour combattre les épidémies bactériennes qui faisaient des ravages à cette époque.

Les débuts de l'âge d'or ont été marqués par les 1^{ers} essais thérapeutiques de Félix Hubert D'Hérelle sur les animaux en 1918 puis rapidement sur de jeunes enfants de l'hôpital Necker à Paris atteints de dysenterie bacillaire en 1919. Il publie alors ses résultats positifs de phagothérapie deux ans après, dans son ouvrage intitulé : *Le bactériophage : son rôle dans l'immunité* (D'Hérelle F, 1921).

A partir de ce moment, convaincu de l'innocuité de cette thérapeutique, il décide de se consacrer à la lutte des diverses infections bactériennes connues aux moyens de préparations bactériophagiques.

En 1940, Helmut Ruska, grâce à l'avènement du microscope électronique, met en évidence pour la première fois un bactériophage de la bactérie *E. coli* ainsi que son action lytique (Kruger et al., 2000). Entre 1920 et 1940, la phagothérapie connaît donc son âge d'or, mais elle sera mise rapidement de côté par les pays occidentaux, alors que les pays de l'Est continuent à mener des travaux de recherche.

Dans les pays occidentaux, le déclin de la phagothérapie réside dans l'avènement des antibiotiques au milieu du XX^{ème} siècle (Aminov, 2010). Ainsi en Europe occidentale, les nombreux avantages apportés par les antibiotiques dû à leur large spectre d'action ainsi que leur facilité d'utilisation et leur stabilité concourent à l'abandon de la phagothérapie (Summers, 2012). A l'inverse, dans certains pays de l'Europe de l'Est, notamment ceux de l'ex-Union Soviétique (Géorgie, Pologne et Russie), l'utilisation de préparations phagiques reste prépondérante dans le système de santé.

A partir des années 1950, la recherche sur les bactériophages joue un rôle important dans l'essor de la biologie moléculaire. Parmi les applications directes, nous pouvons noter la technique du *phage display* (Smith, 1985), l'utilisation du phage λ comme vecteur de clonage pour insérer de l'ADN dans les bactéries (Chauthaiwale et al., 1992), l'utilisation de ligases (phage T4) (Pascal, 2008), et de polymérase (phages T7 et T4) lors des réactions de PCR par exemple (Kubista et al., 2006). En parallèle, de leurs utilisations pour la recherche fondamentale qui ont conduit à mettre en place les piliers de la génétique moderne, certains chercheurs scientifiques sont toujours convaincus du potentiel des bactériophages pour lutter contre les infections ou pour leurs propriétés prophylactiques mais il faut attendre les années 80 pour que la phagothérapie suscite un nouvel intérêt en Occident, et 2004 pour assister au 1^{er} congrès international sur la biologie des Phages.

3.2 Structure et classification

Le terme bactériophage, d'origine grecque, est constitué de la racine « phagos » qui signifie « manger » et du suffixe « baktéria » qui signifie « bâton », la notion de bâton faisant référence aux bactéries à cette époque. C'est donc Félix Hubert d'Hérelle qui employa ce terme pour la première fois pour qualifier ce « microbe invisible » capable de « manger » des bactéries. Également appelés phages, ils font partie de l'ensemble des virus. Les phages, parasites intracellulaires obligatoires, utilisent ainsi toute, ou partie, de la machinerie biosynthétique de leur hôte procaryote pour se reproduire et se multiplier. Par conséquent, ils sont inoffensifs pour les cellules eucaryotes (humaines, animales et végétales) et peuplent tous les écosystèmes où l'on retrouve des bactéries tels que les eaux d'égouts, les eaux douces, le sol, le corps humain, etc.. (Breitbart, 2012). Ils sont ainsi de très loin l'entité biologique la plus abondante sur Terre. D'après M. Breitbart qui ne s'intéresse pourtant qu'à une seule des niches écologiques des phages : le milieu marin, il souligne dans une revue que les virus y sont de loin les prédateurs les plus abondants avec un nombre estimé à 10^{31} . Malgré leur petite taille (20-200 nm) la biomasse des virus océaniques se classe au second rang après la biomasse totale des procaryotes (Suttle, 2005).

3.2.1 Morphologie générale

Le bactériophage est d'une manière générale, constitué d'acide nucléique porteur de l'information génétique, sous la forme d'ADN ou d'ARN. Un arrangement de protéines selon des motifs précis permet de protéger cette information génétique en formant la capsid. L'acide nucléique associé à la capsid forme la nucléocapsid que l'on appelle aussi « tête » du bactériophage (**Figure 12**). Dans certains cas, cette dernière peut être entourée de lipides et de protéines virales formant une enveloppe, on parle alors de phages « fragiles », *a contrario* des phages non enveloppés qui sont qualifiés de « résistants » (Guttman et al., 2005).

3.2.2 Génome viral

L'information génétique portée par le génome viral est à l'origine de la synthèse des protéines virales. Ce dernier est constitué d'une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui peut être bi-caténaire (double brin) ou monocaténaire (simple brin), segmenté ou non, mais également linéaire ou circulaire. La majorité des phages connus ont une molécule d'ADN bi-caténaire. La majorité des phages ont un génome allant de 35 à 100 kb. La taille du génome est directement liée à la complexité morphologique du phage. Deux types de protéines sont codées par le génome et indispensables lors de la multiplication intracellulaire du phage : les protéines structurales et les protéines non structurales. Leurs fonctions seront détaillées en même temps que le cycle viral.

3.2.3 Diversité des capsides

La capside, est une coque de nature protéique qui entoure le génome et est capable d'assurer sa protection et sa persistance dans le milieu extérieur. Selon l'architecture de la capside, quatre types de symétries sont représentées parmi les phages :

- Symétrie hélicoïdale : la capside est cylindrique. Les bactériophages ont alors une forme de filaments ou de bâtonnets.
- Symétrie cubique ou icosaèdre : la capside est à symétrie icosaédrique. Les bactériophages peuvent alors apparaître sphériques.
- Symétrie binaire ou phage caudé : la capside ou « tête » est à symétrie icosaédrique et la « queue » est à symétrie hélicoïdale.
- Symétrie complexe : la capside est de forme très diverse, on parle alors de phage pléomorphe.

Les variations de forme, de taille, de symétrie dans la morphologie des phages permettent de les classer en sept groupes différents, eux-mêmes scindés en vingt et un sous-groupes, parfois composés d'éléments très polymorphes.

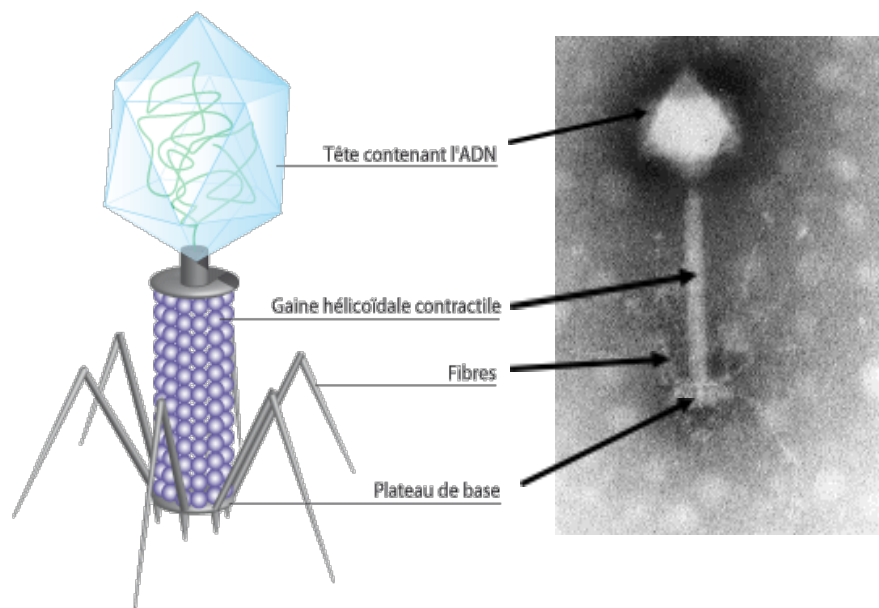


Figure 12 : Structure générale d'un bactériophage (Meyer, 2020).

3.3 Taxonomie

Historiquement, les phages ont été classés en fonction de leur morphologie, avant l'existence de la PCR, du séquençage ou de nombreuses méthodes moléculaires (Ackermann et Dubow 1987 ; Ackermann, 2001, 2006). Pour les phages à queue, la taxonomie a été dérivée du travail de classification de David Bradley (Memorial University, Canada) qui les a classés en trois morphotypes, A (queue contractile), B (longue queue non contractile), C (courte queue non contractile), sur base de la microscopie électronique, un système qui a ensuite été amélioré par Ackermann et Eisenstark (1974) (Bradley, 1967 ; Ackermann et Eisenstark, 1974). En 1971, ce système a été officiellement adopté par le Comité international de la nomenclature des virus (ICNV), mais pas avec les noms que nous connaissons aujourd'hui. Les noms *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae* ont été officiellement acceptés par le Comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) en 1981 et 1984. L'ordre *Caudovirales*, unifiant tous les phages à queue, a été proposé en 1998 par Hans-Wolfgang Ackermann. Certaines des autres familles de phages ont une histoire tout aussi longue, les familles *Inoviridae* (*Tubulavirales*), *Microviridae*, *Tectiviridae*, *Corticoviridae*, *Plasmaviridae*, *Leviviridae* et *Cystoviridae* ayant toutes été officialisées en 1978. Ce système de classification par famille, vieux de plus de 40 ans, a donné lieu aux figures classiques des manuels (**Figure 13**) sur la taxonomie des phages.

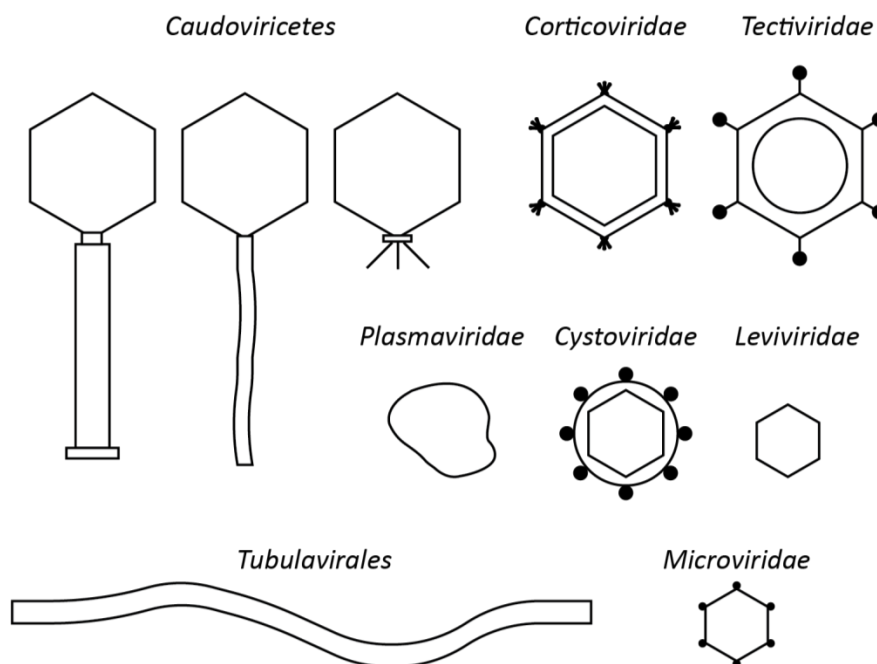


Figure 13 : Dessin linéaire des morphotypes de bactériophages (Turner et al., 2021).

Au début des années 2000, le séquençage des génomes de phages a révélé une diversité génomique beaucoup plus importante que ce qui avait été envisagé auparavant, en particulier chez les bactériophages appartenant à l'ordre des *Caudovirales*, ce qui a conduit à la création des premières sous-familles au sein des trois familles existantes : *Podoviridae* (Lavigne et al., 2008), *Myoviridae* (Lavigne et al., 2009) et, plus tard, *Siphoviridae* (Krupovic et al., 2016). Avec l'augmentation du nombre de génomes de phages dans les bases de données, il est rapidement apparu que ces trois familles n'étaient pas monophylétiques et cohésives au sein d'un ordre monophylétique. Cette paraphylie a été illustrée par un certain nombre d'outils et de publications ce qui a amené le sous-comité des virus bactériens et archéens de l'ICTV à définir de nouvelles familles basées sur le génome. Pour le moment, trois nouvelles familles de myovirus ont été officiellement ratifiées : *Ackermannviridae* (Adriaenssens et al., 2018), *Chaseviridae* (Adriaenssens et al., 2020), *Herelleviridae* (Barylski et al., 2020a,b) ; deux pour les siphovirus, *Demereciviridae* (Adriaenssens et al., 2020) et *Drexleriviridae* (Adriaenssens et al., 2020), et une pour les podovirus, *Autographiviridae* (Adriaenssens et al., 2020). Ces dernières années, l'ICTV a élargi les rangs taxonomiques, qui allaient auparavant d'espèces à ordre, pour inclure 15 divisions jusqu'au domaine, afin de faciliter la description des relations d'ordre supérieur entre les groupes de virus (Gorbalenya et al., 2020 ; Koonin et al., 2020). Pour les phages à queue, cela a conduit à l'introduction de la classe *Caudoviricetes* comprenant tous les phages à queue. Avec la création de cette classe, il a été en mesure d'abolir l'ordre des *Caudovirales* et les familles *Myoviridae*, *Podoviridae*, et *Siphoviridae*, et de les remplacer par des familles monophylétiques, basées sur le génome. Cependant, les termes myovirus, podovirus et siphovirus seront utilisés pour indiquer la morphologie du phage. La famille *Herelleviridae* a été créée comme étude de cas pour la délimitation et la structuration interne de nouvelles familles futures (Barylski et al., 2020). L'élimination des familles de phages classiques crée en premier lieu un grand nombre de sous-familles et de genres de "Caudoviricetes non classifiés".

Deux phages sont assignés à la même espèce si leurs génomes sont identiques à plus de 95% au niveau des nucléotides sur toute la longueur de leur génome, testé réciproquement et à plus de 70% pour le genre. Ces valeurs peuvent être calculées par un certain nombre d'outils, tels que BLASTn (% d'identité multiplié par % de couverture) (Altschul et al., 1990), VIRIDIC (calculateur de distance intergénomique) (Moraru et al., 2020). La sous-famille est facultative pour les bactériophages. Les membres d'une même famille partagent un nombre significatif (dépendant de la taille des génomes et du nombre de séquences codantes) de gènes orthologues. L'ordre doit être monophylétique et est proposé lorsque deux familles ou plus sont apparentées.

3.4 Les différents cycles de multiplication

Tous les phages connus peuvent être divisés en deux groupes principaux en fonction du type d'infection qu'ils induisent lors de leur parasitisme (Kutter et al., 2005). Un groupe se caractérise par une infection lytique et l'autre est représenté par un cycle lysogène également appelé tempéré.

Dans la première forme d'infection, la libération de l'ADN induit un détournement de la machinerie enzymatique de la bactérie hôte pour le bénéfice des agents infectieux aboutissant à la synthèse de 50 à 200 nouveaux phages. Cette abondante synthèse nécessite une réquisition des ressources de la cellule hôte. S'en suivra une lyse, causant la mort de la cellule bactérienne hôte et la libération de nouveaux virions sur le site infectieux.

L'autre mode d'infection, lysogène, se caractérise par l'intégration de l'ADN du phage dans le génome de la cellule hôte. L'ADN de phage incorporé sera répliqué en même temps que le génome des bactéries hôtes et de nouvelles bactéries hériteront de ce fragment d'ADN viral. Cette transmission pourrait avoir lieu à travers plusieurs générations de bactéries sans grandes conséquences métaboliques pour elles. En revanche, en présence d'un stress tels que les UV ou un environnement non favorable pour la bactérie, l'ADN du phage est capable de revenir à un cycle lytique, conduisant à la libération de phages complètement assemblés (**Figure 14**).

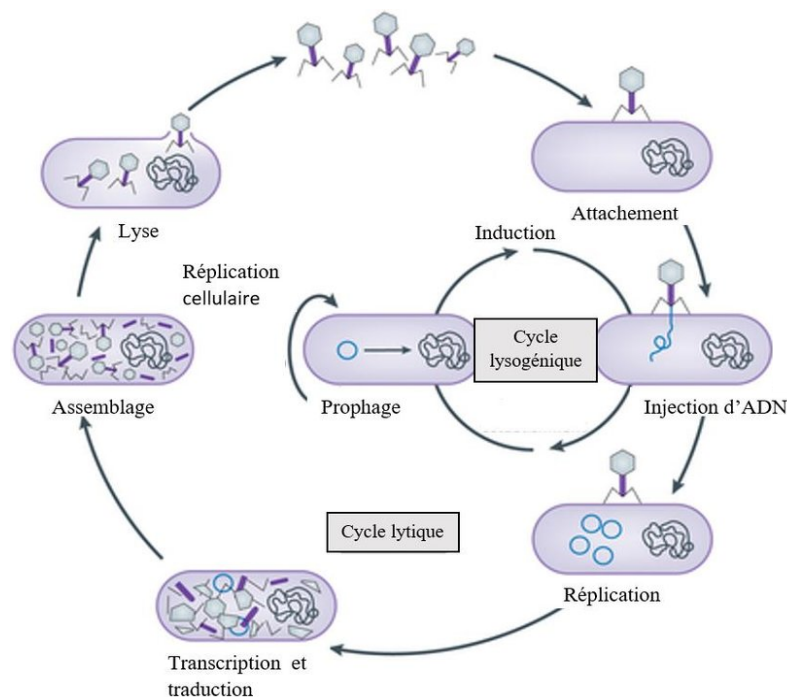


Figure 14 : Cycle lytique et lysogène (adaptée de Salmond et Fineran, 2015).

3.4.1 Le cycle lytique

Les phages virulents sont limités à un cycle de vie lytique qui se termine finalement par la lyse de leur hôte pour libérer les virions de la descendance. Les phages lytiques (ou virulents) sont capables de détruire les bactéries en libérant de nouveaux phages dans l'environnement en moins de 30 minutes. La plupart des phages qui sont problématiques pour les industries de fermentation et de bioprocédés sont de type lytique strict. A l'inverse ils peuvent également être d'un grand intérêt pour d'autres applications comme la phagothérapie.

Après la phase d'adsorption à la surface de la cellule hôte, le phage introduit son génome dans le cytoplasme de l'hôte, il utilise la machinerie cellulaire de la bactérie pour fabriquer des protéines essentielles à la réplication du génome, à la formation de nouveaux virions et à la lyse de la bactérie hôte.

Le cycle lytique se déroule en plusieurs étapes :

A. L'adsorption :

Une souche de bactériophage spécifique est connue pour être capable d'infecter une gamme d'hôtes étroite. Cette spécificité de l'interaction de la cellule bactérienne avec le phage est déterminée par la spécificité d'adsorption, qui à son tour dépend de la nature et de la structure des récepteurs de la surface cellulaire bactérienne. La spécificité des bactériophages à une cible est due à la présence de récepteurs spécifiques localisés à la surface de la bactérie hôte et permettant l'infection. Cependant, cette interaction phage-bactérie est complexe. L'adhésion des phages peut être affectée par une variété de variables, y compris la virulence de la bactérie, les circonstances de croissance, ou si la bactérie est gram-positive ou gram-négative (Rakhuba et al., 2010). Les phages s'adsorbent en deux étapes. La première, réversible, implique des interactions faibles de type Van der Waals. À ce stade, le phage peut ne pas poursuivre l'infection de la bactérie si les conditions environnementales ou intrinsèques ne le permettent pas. Parfois deux récepteurs sont impliqués dans l'adsorption. Le premier fixe le phage très en surface, par exemple une flagelline d'un flagelle bactérien. Puis des changements conformationnels engendrés par cette liaison modifient l'organisation du support du récepteur qui va alors « tracter » le phage au contact d'un second récepteur plus proche de la membrane bactérienne. L'emplacement et le type de récepteur de surface des cellules bactériennes peuvent varier (Fokine et Rossmann, 2014) : chez les bactéries Gram -, il peut s'agir des protéines flagellaires ou des lipopolysaccharides (LPS). Le site d'interaction phagique quant à lui peut être situé au niveau des fibres caudales (courtes ou longues) ou au niveau de la capsid. Cette fixation, réversible à son début via des interactions électrostatiques, devient donc rapidement irréversible.

B. Transfert du génome phagique

Une fois l'adsorption terminée le processus de « tunnélisation » de la paroi bactérienne débute immédiatement. Les phages disposent d'un équipement enzymatique et glycoprotéique, adjacent à leurs sites de fixation, capable de perforer la paroi des bactéries. En effet, contrairement à un virus de cellule eucaryote qui n'a que la membrane cellulaire à franchir, les phages vont être confrontés au peptidoglycane bactérien. La digestion du peptidoglycane se poursuit jusqu'à la membrane bactérienne qui sera perforée de la même manière. L'adhésion irréversible produit un signal en cascade qui est transmis le long de la queue du phage, entraînant l'ouverture du canal et permettant à l'acide nucléique du virus d'être transporté dans le cytoplasme bactérien tandis que la capsidie reste à l'extérieur (Plisson et al., 2007).

C. Réplication du génome phagique

Après injection de leur génome dans la cellule hôte bactérienne, l'ADN est circularisé et répliqué par réorientation biochimique de la bactérie. Une fois à l'intérieur, le phage synthétise des protéines précoces, notamment des endonucléases et des exonucléases qui dégradent le génome de l'hôte. Ils sont ensuite capables d'utiliser la machinerie de la cellule hôte pour synthétiser des protéines et produire une descendance. Les nucléotides libérés peuvent être recyclés par le phage pour la réplication de sa propre descendance, ou excrétés de la cellule hôte. De petites modifications chimiques, au génome du phage permettent de différencier son matériel génétique de celui de l'hôte et d'empêcher son autodégradation au cours de ce processus. Parmi les autres protéines précoces figurent celles nécessaires à la réplication du génome du phage. L'ARN n'étant pas dégradé, le phage peut également produire des inhibiteurs qui empêchent l'ARN polymérase de l'hôte d'interférer avec les polymérases virales lors d'une infection ultérieure. Le génome du phage nouvellement synthétisé produit des protéines tardives, notamment les sous-unités de la capsidie et la queue (Verbeken, 2015).

D. Nouveaux phages

Une fois que tous les composants ont été synthétisés, ils doivent être assemblés en phage mature. Les protéines de la capsidie s'assemblent pour former des têtes vides dans lesquelles l'ADN phagique condensé est emballé. Les parties de la queue s'assemblent indépendamment de la structure de la tête et la dernière étape de la synthèse consiste à joindre les têtes remplies aux queues pour former la progéniture du phage. Les enzymes produites par le phage affaiblissent progressivement la paroi de la cellule bactérienne et finalement les cellules bactériennes se lysent, libérant en moyenne 100 à 200 progénitures de phages dans le milieu environnant.

Les phages lytiques exercent une pression sélective sur la population bactérienne, éliminant les hôtes sensibles et favorisant la propagation de la résistance, par transfert de gènes par exemple, au sein de la population bactérienne (Steward, 2018).

3.4.2 Le cycle lysogénique

Les phages tempérés sont capables de subir un cycle de vie lysogène qui débute de la même façon que le cycle lytique, avec l'injection du matériel génétique des virus qui est ensuite circularisé. Cependant, le phage ne se multiplie pas, mais intègre son génome dans le chromosome de l'hôte pour établir un état de prophage par le phénomène de transduction. Par conséquent, le phage est répliqué à chaque division de la bactérie tout en étant dans un « état de repos », les cellules filles hériteront donc de l'ADN viral. Le signal permettant d'entrer dans le cycle de vie lytique ou lysogène par ces phages de descendance tempérée est basé sur un interrupteur génétique qui détecte les conditions environnantes dans lesquelles il devra évoluer. Des déclencheurs environnementaux tels que, le pH, la température, la concentration en sel, une carence nutritionnelle ou des déclencheurs cellulaires peuvent induire le passage au cycle lytique et libérer des progénitures de phages en établissant un cycle lytique complet. Plus récemment, des travaux ont mis en évidence la production de peptides par les phages eux-mêmes, leur permettant d'osciller entre cycles lytiques et cycles lysogéniques (Erez et al., 2017). Dans certains cas, des changements peuvent survenir dans le phénotype de la bactérie permettant au bactériophage d'offrir de nouvelles propriétés à la bactérie hôte. Comme dans le cas des nouveaux gènes de virulence, ces nouvelles caractéristiques peuvent être avantageuses ou non. Les phages tempérés servent de vecteurs et d'instruments en biologie moléculaire (Ravat et al., 2015).

3.4.3 Les autres cycles

- Le cycle pseudo-lysogénique

Le phage injecte son génome dans la cellule hôte mais celui-ci ne s'intègre pas et reste latent dans le cytoplasme, sous forme extra-chromosomique comme un plasmide. Ce cycle, reste mal compris et interviendrait chez les bactéries ne possédant pas assez d'énergie disponible pour le phage, cela lui permettrait ainsi de persister dans des environnements défavorables en attendant des conditions plus propices pour mettre en place un cycle lytique ou un cycle lysogénique (**Figure 14**) (Los Marcin et Wegrzyn Grzegorz, 2012).

- Le cycle chronique

Le cycle chronique n'a été décrit que pour une espèce de phages, les phages M13 du genre *inovirus*. En effet, dans leur cas, la libération de nouveaux virions se fait par bourgeonnement ou extrusion. La bactérie est alors préservée de la lyse et reste porteuse du génome phagique de façon chronique (**Figure 15**) (Wilson et Finlay, 1998)

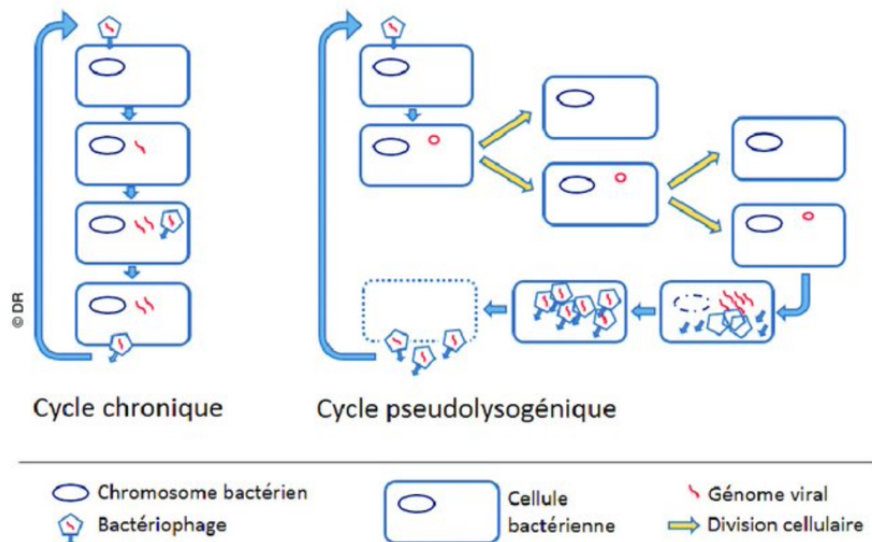


Figure 15 : Cycle chronique et cycle pseudolysogénique (Dufour, 2016).

4. Phages Stx

4.1 Morphologie des phages Stx

Tous les phages Stx connus sont des phages à ADN double brin avec une organisation génétique fonctionnelle similaire à celle de l'archétype du phage lambda, qui est l'un des phages d'*E. coli* les mieux étudiés (Casjens et Hendrix, 2015). Les phages Stx partagent une structure tête-queue commune allant de têtes icosaédriques ou allongées à des queues contractiles, non contractiles ou courtes avec ou sans fibres caudales (Smith et al., 2012).

Bien que tous les phages Stx partagent la même structure génétique de type lambda, des variations significatives dans leur composition génétique se produisent et des tailles de génome allant de 28,7 à 71,9 kb ont été décrites.

Le génome d'un phage lambdoïde (tel que le phage λ et les phages Stx) est organisé en opérons ou groupes de gènes pour lesquels la transcription ne s'effectue pas simultanément. Ces gènes sont nommés précoces immédiats, précoces retardés et tardifs selon le moment où ils sont transcrits. Parmi les gènes précoces, les gènes codant les protéines N et Cro sont les premiers à être transcrits.

La protéine Cro joue un rôle dans l'entrée en cycle lytique. La protéine N, quant à elle, est un anti-terminateur de transcription. Elle se fixe aux promoteurs pL et pR et permet ainsi de continuer la transcription des gènes précoces. Les autres gènes précoces codent les protéines impliquées dans la réplication (O et P) et dans la recombinaison du phage (telles que Int, Xis, Exo, Bet et Gam) ainsi que la protéine Q et les protéines cII et cIII. La protéine Q est également un anti-terminateur de transcription. Elle se fixe au promoteur pR' permettant la transcription des gènes tardifs. Ces gènes codent les protéines impliquées dans la lyse cellulaire (R et S). Les gènes tardifs codent aussi des protéines impliquées dans la morphogénèse de nouvelles particules de phage comme les protéines A, B, C, D, E et F formant la tête et G, H, I, J, K, L, M, T, U, V et Z formant la queue (Casjens et Hendrix, 2015). Parmi les gènes de lyse cellulaire, le gène R code une endolysine responsable de la dégradation du peptidoglycane de la paroi cellulaire. Le gène S, quant à lui, code une petite protéine membranaire nommée « holin » qui crée des lésions non-spécifiques de la membrane cytoplasmique permettant ainsi à l'endolysine de dégrader le peptidoglycane (Blasi et Young, 1996).

Enfin, l'entrée en cycle lytique ou lysogénique est contrôlée par les protéines Cro et cI. La protéine Cro permet l'entrée en cycle lytique alors que la protéine cI joue un rôle dans le maintien du cycle lysogénique. La transcription de cI est initiée grâce aux protéines cII et cIII. Le maintien du cycle lysogénique ou l'entrée en cycle lytique résulte d'une compétition entre les protéines Cro et cI ainsi que d'une cascade complexe de régulation (**Figure 16**) (Casjens et Hendrix, 2015). A la différence du phage λ , les phages Stx possèdent les gènes *stx* qui ont été mis en évidence en aval du promoteur pR' (à une distance d'environ 1 kb) et plus précisément en aval des gènes de lyse. (Wagner et al., 2002 ; Wagner et al., 2001b ; Neely et Friedman, 1998).

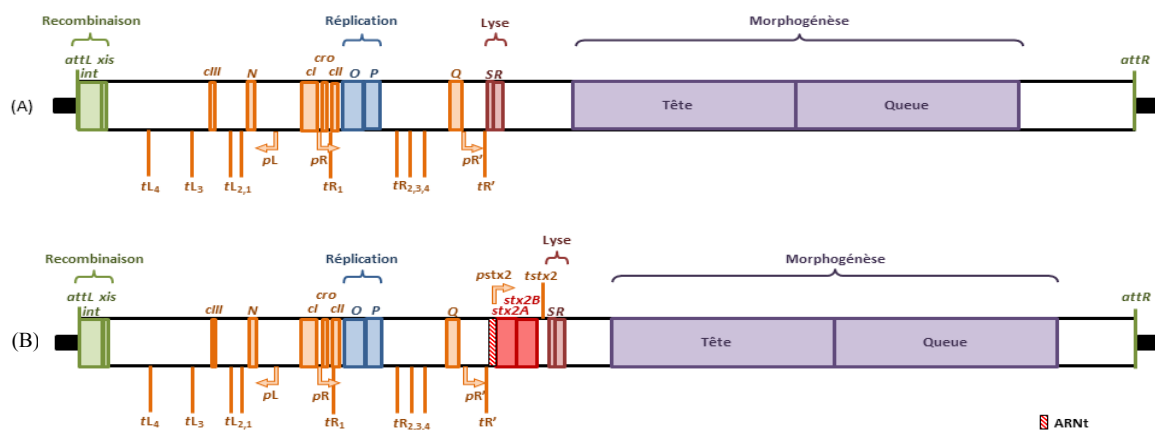


Figure 16 : Schéma de l'organisation génétique des phages λ (A) et Stx2 (B). Les génomes des phages sont représentés dans leur forme intégrée (prophage) dans le chromosome bactérien (en noir) entourés des sites jonctions attL et attR (en vert). (A) phage λ , (B) phage Stx2. Le phage Stx2 possède trois gènes codant pour des ARN de transfert (ARNt) : ileZ, argN et argO (hachures rouges) (Schmidt, 2001).

La comparaison des génomes de deux phages Stx à celui du phage λ a révélé que certains gènes situés en amont du promoteur pR' étaient homologues tandis que les gènes tardifs et la terminase sont différents de λ (Schmidt, 2001). De plus, trois gènes codant des ARN de transfert (ARNt), *ileZ*, *argN* et *argO*, ont été mis en évidence en amont du gène *stx* mais seulement dans les phages Stx2 (Plunkett et al., 1999 ; Schmidt, 2001). Enfin, deux gènes, *lom* et *bor*, présents chez le phage λ ont été aussi identifiés dans des phages issus de STEC O157:H7. Le gène *bor* est impliqué dans la résistance au sérum alors que le gène *lom* code une protéine de la membrane externe qui permet d'améliorer la capacité de la bactérie à survivre dans les macrophages (Schmidt, 2001). Ce gène *lom* a aussi été retrouvé dans des phages Stx issus de STEC de sérogroupes non-O157 et est considéré comme un gène de virulence (**Figure 17**) (Ogura et al., 2009).

Des phages Stx provenant de différents sérogroupes de STEC (O157, O26, O111 et O103) ont aussi été comparés. Ces études ont montré qu'il y avait une grande divergence dans l'organisation génomique des phages Stx provenant de sérogroupes STEC différents (**Figure 16**) (Ogura et al., 2009, Unkmeir et Schmidt, 2000). Il est important de noter que, contrairement aux premières prédictions d'uniformité des phages Stx, ce groupe de virus a été reconnu comme très variable (Krüger et Lucchesi, 2015). Un hôte *E. coli* peut être lysogénéisé non seulement par un, mais aussi par deux ou plusieurs phages Stx, ce qui peut entraîner la production de différents types de toxines Stx dans une cellule bactérienne.

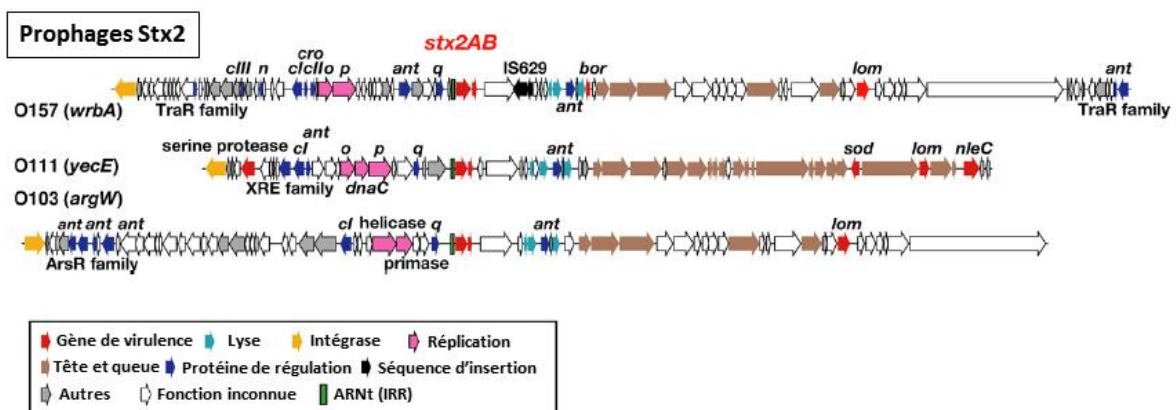


Figure 17 : Organisation des gènes de phages Stx2 provenant de STEC de sérogroupes différents (adaptée de Ogura et al., 2009).

4.2 Système d'intégration spécifique du site

L'ADN des phages Stx est intégré dans le chromosome bactérien par une recombinaison spécifique de site (de type « crossing-over »). Cette recombinaison s'effectue entre le site attB de la bactérie et le site attP présent sur le génome du phage. L'intégrase (Int) codée par le phage est une enzyme recombinase tyrosine, spécifique du site qui reconnaît deux séquences distinctes dans les sites d'attachement (De Greve et al., 2002) (**Figure 18**).

Le site *attB* (21 pb) contient deux sites de fixation pour la protéine Int, appelés « sites cœur ». Le site *attP* (250 pb) contient lui aussi deux sites de fixation pour l'intégrase, similaires aux « sites cœur » de la bactérie, nommés « sites arm ». Les deux sites de fixation de Int présents dans les régions « cœur » et « arm » sont composés de deux motifs de séquences répétées, orientées inversement et séparées par un court espace appelé région de recouvrement (ou « overlap region ») contenant la séquence à échanger. Ces motifs sont reconnus spécifiquement par différents domaines de l'intégrase Int. Une fois intégré, le génome du phage est encadré par les sites hybrides ou de jonction, *attL* et *attR* (Dorgai et al., 1998, 1995) (**Figure 18**). L'intégration du phage s'effectue selon trois étapes, le clivage des brins d'ADN à la fois sur les sites *attB* et *attP*, l'échange de brins et la liaison des brins de chaque site reformant l'intégrité du brin d'ADN. Trois protéines accessoires, Xis, Fis et IHF codées par les bactéries se fixent sur une séquence spécifique de la région arm du site *attP* et jouent un rôle structural dans la formation du complexe de recombinaison entre l'intégrase et les sites d'attachement (Dorgai et al., 1998).

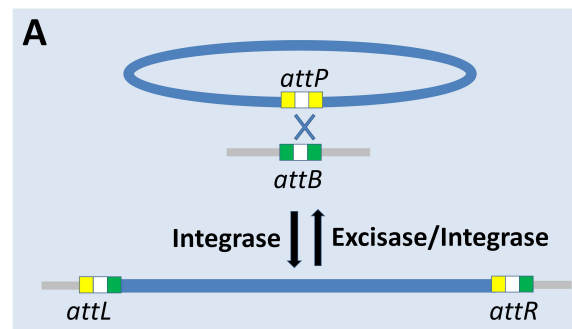


Figure 18 : Recombinaison site-spécifique pour l'insertion et excision de l'ADN du phage dans le chromosome bactérien (Ramisetty et Sudhakari, 2019).

Deux grandes familles d'intégrase ont été définies, les tyrosine-recombinases et les sérine-recombinases (Groth et Calos, 2004). Les intégrases codées par les phages de type λ appartiennent à la famille des tyrosine-recombinases. Ces recombinases utilisent un résidu tyrosine pour cliver le brin d'ADN et reconnaissent généralement de longues séquences *attP*. Cette famille d'intégrase nécessite des facteurs supplémentaires codés par le phage et par la bactérie hôte comme le facteur d'intégration de l'hôte (IHF ou « integration host factor »). Les sérine-recombinases utilisent un résidu sérine pour cliver le brin d'ADN. A l'inverse des tyrosine-recombinases, cette famille d'intégrase reconnaît des séquences *attP* courtes et ne requiert pas de facteurs codés par l'hôte (Groth et Calos, 2004).

L'excision du phage est stimulée par le facteur de stimulation d'inversion (FIS) de la bactérie hôte. Durant l'induction du phage, l'excisionase Xis, si elle est produite en quantité suffisante, va entraîner l'excision du phage catalysée par l'intégrase et va contrôler la directionnalité de la réaction (Abbani et al., 2007).

Les protéines Xis et FIS se fixent alors sur leurs sites respectifs (sur les sites X1 et X2 pour Xis, et F pour FIS) et induisent ainsi une courbure de l'ADN. La fixation de Xis sur X1 permet de faciliter la liaison entre Int et le site P2 (adjacent au site X1, et seulement impliqué dans l'excision) entraînant une interaction protéine-protéine et l'excision du phage (De Greve et al., 2002).

4.3 Les sites d'insertion des phages Stx

L'ADN des phages Stx est préférentiellement intégré dans des gènes basiques du chromosome bactérien (Herold et al., 2004). Il existe, chez les AE-STEC, neuf sites d'insertion potentiels des phages Stx décrits dans la littérature. Les quatre plus connus sont les sites *wrbA* codant la protéine de fixation du répresseur du tryptophane (Plunkett et al., 1999), le site *yehV* codant un régulateur transcriptionnel (Yokoyama et al., 2000 ; Creuzburg et al., 2005b), le site *yecE* dont la fonction est inconnue (De Greve et al., 2002) et le site *sbcB* qui code une exonucléase (Mellor et al., 2012).

Les cinq autres sites d'insertion sont le site *Z2577* codant une oxydoréductase (Koch et al., 2003), le site *ssrA* codant un ARNtm (transfert et messenger) (Creuzburg et al., 2005a), le site *prfC* codant une protéine nommée « peptide chain release factor 3 », le site *argW* codant l'ARNt-Arg (ARN de transfert de l'Arginine) et la région intergénique *torS-torT* (Shringi et al., 2012).

Lorsque le LEE est absent, les phages Stx sont localisés au niveau de sites d'insertion différents comme, par exemple, les gènes *potC*, *ycaD*, *ynfH*, *serU* et *yjbM* (Steyert et al., 2012).

Il est intéressant de noter qu'une souche STEC peut posséder plusieurs copies du même phage Stx à diverses positions dans son chromosome (Fogg et al., 2007).

4.4 Induction des phages Stx

4.4.1 Systèmes d'induction des phages Stx

L'induction des phages Stx permet le passage du cycle lysogénique au cycle lytique et conduit donc à la libération de nouvelles particules phagiques. La présence d'agents inducteurs, provoquant des lésions sur l'ADN, peut entraîner l'induction des phages. Les bactéries lysogènes possédant des prophages du type λ sont en général très stables. Cependant, en l'absence d'agent inducteur externe, une simple lésion de l'ADN (coupures) ou un arrêt de la transcription suffit à déclencher une induction dite spontanée (Tyler et al., 2013).

Ces dommages déclenchent une cascade de régulation, le système SOS, impliqué dans la réparation de l'ADN. Le système SOS est composé du régulon LexA auquel appartient la protéine RecA, impliquée dans la réparation de l'ADN. Cependant, cette protéine permet aussi d'induire un auto-clivage des répresseurs du phage tels que la protéine *ci* (Tyler et al., 2013).

Une fois la protéine cI clivée, le phage entre en cycle lytique provoquant ainsi la production de nouvelles particules de phages et la synthèse des protéines de lyse. Les nouvelles particules de phages sont alors libérées de la cellule lysée et la toxine se répand hors de la bactérie. Cependant, une mutation mise en évidence dans le gène du répresseur cI permet d'empêcher l'induction du phage. Cette mutation nommée Ind, induit le changement d'un acide aminé dans une région de la protéine cI impliquée dans l'activité sérine-protéine permettant son auto-clivage (Tyler et al., 2013).

4.4.2 Autre voie d'induction RecA-indépendante

Il existe un autre mécanisme indépendant de la protéine RecA, le système RcsABC, impliqué dans la détection par la bactérie hôte d'une mort cellulaire imminente. Ce mécanisme permet également l'induction du cycle lytique des phages (Rozanov et al., 1998). Ce mécanisme est caractérisé par deux gènes d'*E. coli* : *rcsA* et *dsrA*, qui, lorsqu'ils sont surexprimés, entraînent l'induction des phages de type λ . Le gène *rcsA* code la protéine RcsA, un régulateur positif de transcription de l'opéron *cps* impliqué dans la synthèse de polysaccharides capsulaires. Le gène *dsrA* code un ARN de 85 nucléotides qui lève la répression du gène *rcsA* causé par la protéine « histone-like » H-NS (Rozanov et al., 1998).

4.4.3 Induction spontanée

Les phages Stx sont induits spontanément dans une fraction de souches lysogènes. En effet, une cellule lysogène sur 20 000 qui possède le phage Stx1 (H-19B) et une cellule lysogène sur 7 000 qui possède le phage Stx2 (933W) sont induites spontanément à chaque génération cellulaire en milieu LB (Livny et Friedman, 2004). De plus, l'induction spontanée des phages Stx est plus fréquente que celle d'autres phages de type λ . Grâce à des pressions de sélection, seule une petite partie de la population bactérienne possédant un phage Stx est sacrifiée pour permettre l'induction des phages Stx ainsi que la production de Shiga-toxines. La population majoritaire restante a donc la possibilité de se développer et de coloniser les cellules épithéliales comme cela a déjà été suggéré (Wagner et al., 2001b ; Livny et Friedman, 2004). Cette population « survivante » est alors à l'origine des symptômes de diarrhée (Livny et Friedman, 2004).

4.4.4 Facteurs déclencheurs d'induction

- Mitomycine C

La mitomycine C est une molécule fréquemment utilisée pour l'étude de l'induction des phages Stx. Des microbiologistes japonais ont découvert la mitomycine comme un antibiotique dans les années 1950 lors de la fermentation de *Streptomyces caespitosus*. La mitomycine C a plusieurs fonctions tels que la mutagenèse, la stimulation de la recombinaison génétique, l'inhibition de la synthèse de l'ADN et l'induction de la réponse SOS (Tomasz, 1995).

En effet, une étude d'Imamovic et al. a montré que dans des souches déficientes pour le gène *recA*, la mitomycine C n'avait aucun effet sur l'induction des phages présents démontrant ainsi que l'action de la mitomycine C est dépendante du système SOS (Imamovic et Muniesa, 2012).

L'effet inducteur de la mitomycine C sur les phages Stx a été mis en évidence par plusieurs études (Garcia-Aljaro et al., 2009 ; Muniesa et al., 2004a ; Muniesa et al., 2003). Cependant, d'autres études ont montré qu'en présence de mitomycine, il existe des variations d'induction des phages Stx2 (Muniesa et al., 2003). Les résultats montrent que lorsqu'il y a une faible densité optique à 600nm (DO_{600nm}) de la culture bactérienne, cela est dû à la lyse bactérienne par les phages et donc qu'il existe une forte production de phage et une grosse quantité d'ADN de phages libérés. Enfin, une étude de Ritchie et al. a mis en évidence que la mitomycine C avait très peu d'effet sur la production de la toxine Stx1 par rapport à la toxine Stx2 issue de souches bovines (Ritchie et al., 2003).

En présence de mitomycine C, l'induction des phages Stx1 et Stx2 est différente. En effet, la présence de la toxine Stx2 a été mise en évidence dans la fraction extracellulaire (surnageant de culture) tandis que la toxine Stx1 n'était pas détectée dans cette fraction mais dans la fraction périplasmique (Shimizu et al., 2009). Ce résultat suggère que la libération des toxines Stx2 est bien liée à l'induction des phages Stx2 qui entraîne la transcription des gènes *stx2* et des gènes de lyse (S et R). A l'inverse, la transcription des gènes *stx1* et des gènes de lyse sont indépendants (Shimizu et al., 2009).

- Ultraviolets (UV)

A l'origine, le phage λ a été mis en évidence et isolé suite à l'irradiation aux UV de la souche d'*E. coli* de laboratoire K12 (Casjens et Hendrix, 2015). En effet, une étude a montré que l'irradiation aux UV était responsable de l'activation du système SOS chez *E. coli* (Aksenov, 1999). Yue et al. ont par la suite confirmé l'induction des phages Stx chez *E. coli* O157:H7 suite à une irradiation aux ultraviolets. Ils ont aussi mis en évidence que l'augmentation de la température de 22°C à 37°C était également un facteur d'induction. Ils ont d'ailleurs montré qu'une irradiation aux UV associée à une hausse de température avaient un effet synergique (100 fois plus important) sur l'induction des phages Stx (Yue et al., 2012).

Bien que dans des conditions de laboratoire, l'irradiation aux UV ou les antibiotiques liant l'ADN, comme la mitomycine C, soient couramment utilisés pour activer la réponse SOS, il semble que le stress oxydatif puisse être l'une des principales causes de l'induction du prophage Stx chez les humains infectés par des STEC (Licznarska et al., 2016).

5. Mécanismes de résistance aux bactériophages

Ces dernières années, la médecine a commencé à reconsidérer l'utilisation thérapeutique des phages en raison de l'augmentation alarmante des infections causées par des bactéries multirésistantes (MDR) (Moelling, Broecker et Willy 2018). Cependant, le succès de la phagothérapie pourrait être limité par le développement de résistances aux phages par les bactéries. De multiples mécanismes permettent aux bactéries de se défendre contre les phages (Doron et al., 2018 ; Gao et al., 2020), certains spécifiques à certaines espèces ou souches, d'autres plus répandus. Les bactéries échappent aux infections par les phages de différentes manières :

5.1 Adaptation des récepteurs

Ce sont des mutations aléatoires ou variations phénotypiques des bactéries qui entraînent une diminution de l'adsorption des phages (**Figure 19**).

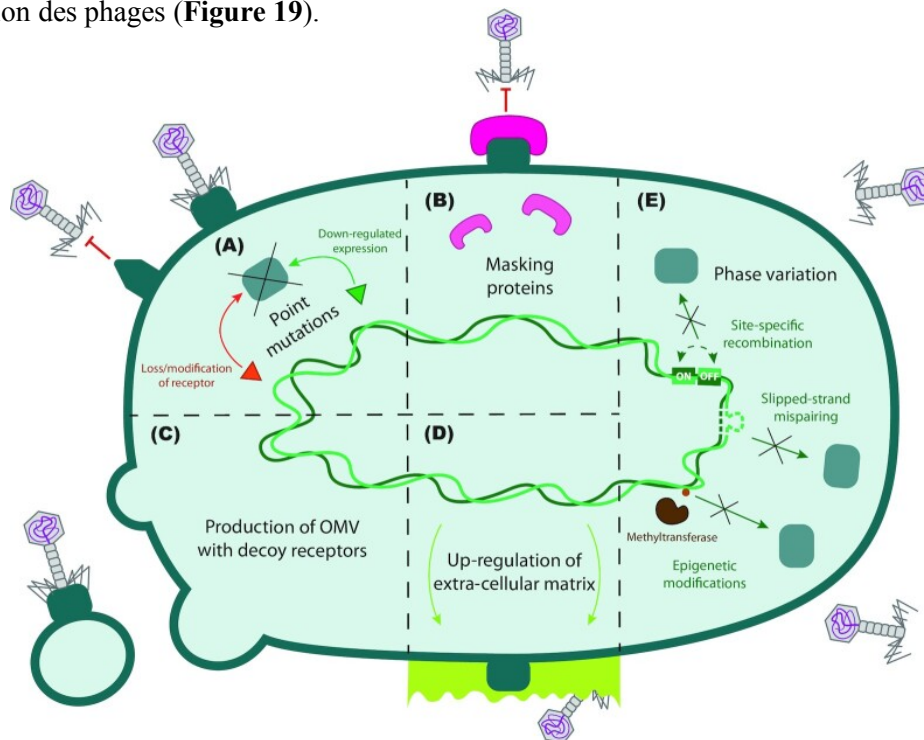


Figure 19 : Adaptations de l'hôte conduisant à la résistance aux phages (Egido et al., 2022).

(A) Des mutations ponctuelles peuvent entraîner une perte ou une modification des récepteurs phagiques (rectangles verts), ou une régulation négative de leur expression. (B) Les protéines masquant les récepteurs (rose), peuvent se lier aux régions exposées à la surface des récepteurs des phages, les rendant inaccessibles aux phages. (C) Les vésicules de la membrane externe (OMV) présentant des récepteurs de phages agissent comme des leurres pour empêcher les phages de rencontrer les bactéries. (D) Une augmentation de la production de la matrice extracellulaire (vert clair) entraîne la dissimulation physique des récepteurs phagiques. (E) La variation de phase se produit par le biais de trois mécanismes : la recombinaison spécifique au site, le mauvais

appariement des brins glissés et les modifications épigénétiques. Elle peut réguler le phénotype bactérien, y compris l'expression de protéines de surface comme les récepteurs de phages.

5.2 Systèmes de défense de l'hôte

Ce sont des voies moléculaires qui ont évolué spécifiquement chez les bactéries pour prévenir ou supprimer les infections par les phages (**Figure 20**).

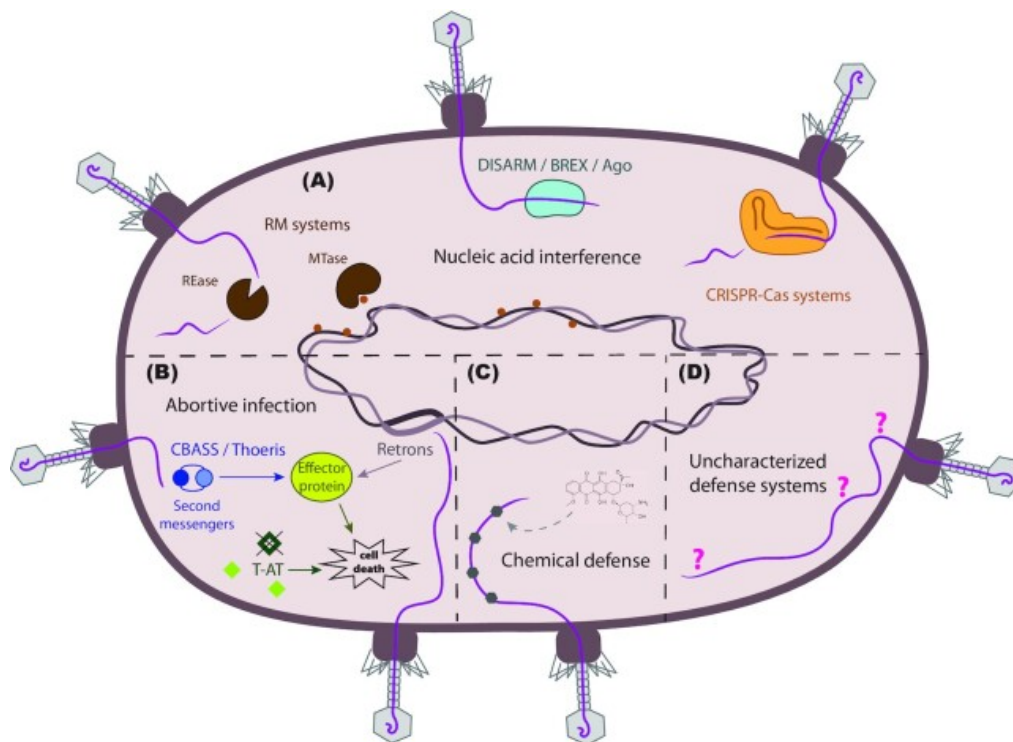


Figure 20 : Systèmes de défense des phages de l'hôte (Egido et al., 2022). **(A)** De multiples systèmes de défense agissent par interférence des acides nucléiques. Les systèmes R-M (restriction-modification) sont généralement composés d'une MTase (méthylase) qui méthyle l'ADN endogène pour le distinguer de l'ADN exogène, et d'une REase (endonucléase) qui clive l'ADN exogène non méthylé. Les systèmes BREX (bactériophage exclusion) interagissent avec l'ADN phagique et l'empêchent de se répliquer sans nécessairement le cliver. Les systèmes CRISPR-Cas sont connus comme le système immunitaire adaptatif des bactéries. Le réseau CRISPR contient des séquences d'origine étrangère qui peuvent être transcrites et traitées pour servir de guide à l'endonucléase Cas, qui reconnaît et clive lesdites séquences lors de la réintroduction dans la bactérie. **(B)** L'infection avortée comprend une série de mécanismes qui conduisent au suicide des cellules bactériennes. **(C)** Les bactéries peuvent produire des métabolites secondaires tels que la daunorubicine (représentée) qui intercalent l'ADN du phage et l'empêchent de se circulariser et de se répliquer. **(D)** L'analyse des îlots de défense génétiques a récemment conduit à la découverte d'une série de systèmes de défense qui n'ont pas encore été entièrement caractérisés.

6. Modèle de larves *Galleria mellonella*

L'utilisation de mammifères comme modèles d'infection se heurte à des obstacles éthiques, budgétaires et logistiques. Tout d'abord, le maintien d'un nombre suffisant d'animaux pour obtenir des données statistiquement pertinentes est coûteux et souvent considéré comme inacceptable d'un point de vue éthique. Deuxièmement, les mammifères ont des temps de reproduction longs, ce qui ralentit la progression de l'expérimentation. Plus récemment, les larves de *Galleria mellonella* ont été introduites comme modèle alternatif pour étudier les infections microbiennes. Les larves de *G. mellonella* peuvent être obtenues facilement et à moindre coût en grand nombre et sont simples à utiliser car elles ne nécessitent pas d'équipement de laboratoire particulier. Il n'y a pas de contraintes éthiques et leur cycle de vie court les rend idéales pour des études à grande échelle. Bien que les insectes n'aient pas de réponse immunitaire adaptative, leur réponse immunitaire innée présente des similitudes avec la réponse immunitaire des vertébrés (Tsai et al., 2016). La mélanisation, qui comprend la synthèse et le dépôt de mélanine pour encapsuler les agents pathogènes au niveau de la plaie, suivie de la coagulation de l'hémolymphe et de l'opsonisation, commence généralement par des taches noires distinctes sur les larves de couleur crème (troisième image). La mélanisation complète (larves noires) correspond à la mort des larves peu après (**Figure 21**).

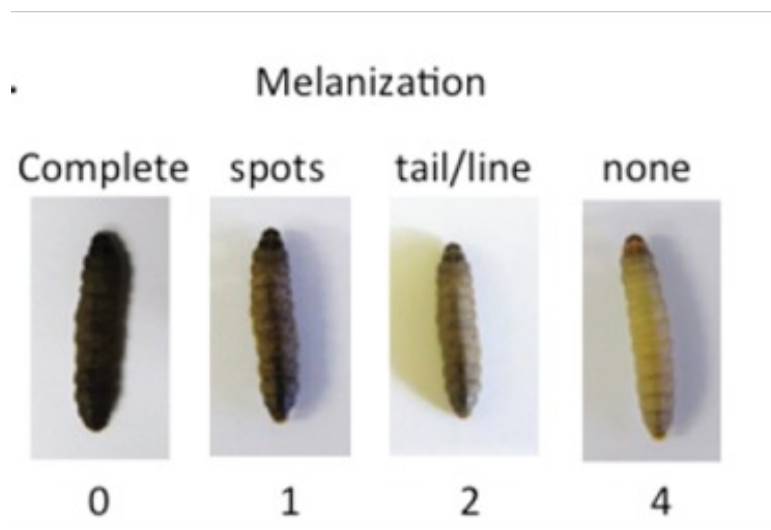


Figure 21 : Images photographiques de larves de *G. mellonella* infectées montrant différents stades de la maladie (Tsai et al., 2016).

Objectifs

A côté des sérotypes classiques les plus fréquents et les plus pathogènes d'AE-STECS humains et bovins (O5:H-, O26:H11, O103:H2, O111:H-, O118:H16 ; O121:H19, O145:H-, O157:H7 et O165:H25) considérés comme critiques en santé publique, d'autres sérogroupes non classiques émergent depuis plusieurs années et sont de plus en plus fréquemment associés au SHU chez l'homme (EFSA). Parmi ceux-ci, le sérotype O80:H2 émerge en Europe de l'ouest (Nüesch-Inderbinen et al., 2018 ; Wijnsma et al., 2017 ; Soysal et al., 2016 ; De Rauw et al., 2019) depuis 2015 et est devenu un sérotype prédominant associé au SHU chez les enfants en France (Ingelbeen et al., 2018). En plus des caractéristiques cliniques typiques d'une infection à AE-STECS, une bactériémie peut se développer chez les patients (Mariani-Kurkdjian et al., 2014).

Inversement, une minorité d'EPEC bovins appartient à l'un de ces sérotypes classiques d'AE-STECS, le sérotype le plus fréquent étant O26:H11. Des EPEC du sérotype O80:H2 ont également été détectés chez les bovins mais beaucoup plus rarement, soit chez des bovins adultes en Espagne et en France (Blanco et al., 2004 ; Cointe et al., 2018), soit chez le jeune veau diarrhéique en Belgique (Thiry et al., 2017 ; De Rauw et al., 2019) et sont génétiquement apparentés aux AE-STECS O80:H2 humains (Cointe et al., 2018 ; De Rauw et al., 2019).

Ce sérotype O80:H2 est un sérotype hybride car il contient à la fois des facteurs de virulence intestinaux (*eae*, *stx*) mais également extra-intestinaux (*cia*, *iss*, *iroN*, *hlyF*...) dû à la présence de gènes présents sur le plasmide pS88. Cependant plusieurs aspects restent inconnus concernant ce sérotype notamment l'origine des infections humaines et bovines ainsi que les relations génétiques entre ces souches.

L'objectif général de cette thèse a été de poursuivre l'identification du sérotype O80:H2 parmi des souches EPEC et AE-STECS isolées de veaux malades et sains en Belgique, d'étudier leur virulence et de mieux comprendre le rôle du phage Stx2d dans la pathogénicité et dans l'évolution de ces souches.

Le premier objectif de ce travail a été de poursuivre l'identification du sérotype O80:H2 parmi les souches EPEC et AE-STECS isolées de veaux diarrhéiques et septicémiques et de les comparer génétiquement aux AE-STECS humains O80:H2.

Le deuxième objectif a été de rechercher la présence de ces souches du sérotype O80:H2 chez des jeunes veaux sains de moins de 6 mois dans trois élevages laitiers, après prélèvement par écouvillonnage au niveau la muqueuse recto-anale (RAMS).

Le troisième et dernier objectif de ce travail a été d'isoler et de caractériser le phage Stx2d d'une souche STECS bovine O80:H2, de le transférer vers des souches non-STECS et d'évaluer le pouvoir pathogène de ces souches transduites dans des larves de *Galleria mellonella*.

Section expérimentale

Section expérimentale

Etude 1 :

Le sérotype O80:H2 chez des veaux diarrhéiques

Préambule

En France, les AE-STECS O80:H2 ont été la deuxième cause de SHU chez les enfants en 2014 (Soysal et al., 2016) et représentent 30% des cas de SHU entre 2013 et 2016 (Ingelbeen et al., 2018). Outre l'HC et le SHU (Tozzoli et Scheutz., 2014), les AE-STECS O80:H2 peuvent également provoquer une infection systémique puisqu'ils hébergent un plasmide (pS88) portant au moins quatre gènes codant pour les propriétés de virulence (*sitA*, *cia*, *hlyF* et *ompTp*) des *E. coli* extra-intestinaux (Soysal et al., 2016 ; Ingelbeen et al., 2018).

L'objectif de cette première étude a été de poursuivre l'identification du sérotype O80:H2 parmi des EPEC voire des AE-STECS isolées de veaux diarrhéiques et septicémiques et de comparer génétiquement ces souches bovines avec les AE-STECS humaines O80:H2.

Des souches O80:H2 de trois différentes collections ont ainsi été étudiées et comparées : une collection partiellement caractérisée et publiée (Fakih et al., 2017 ; Thiry et al., 2017) de souches EPEC récoltées entre 2009 et 2015 à l'ARSIA de veaux diarrhéiques ou autopsiés, une collection de souches EPEC et AE-STECS nouvellement récoltées à l'ARSIA entre 2015 et 2018 également de veaux diarrhéiques ou autopsiés et une collection de souches AE-STECS humaines belges identifiées entre 2009 et 2019 au CNR STEC.

Une analyse phylogénétique d'environ 50 de ces souches EPEC et AE-STECS O80:H2 isolées chez le veau et l'homme, sur base de polymorphismes d'un seul nucléotide (PSN) a été réalisée, et un arbre à maximum de vraisemblance (ML) a été construit. Les gènes de virulence présents sur le plasmide pS88 ou non ont également été identifiés. Les résultats de cette première étude nous ont permis d'observer que non seulement les EPEC, mais aussi les AE-STECS O80:H2 sont présentes chez les veaux diarrhéiques et septicémiques en Belgique, sont génétiquement apparentées aux AE-STECS humains et portent des gènes de virulence présents sur le plasmide pS88.


Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 from diarrhoeic and septicæmic calves and relatedness to human Shigatoxigenic *E. coli* O80:H2

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072, Vol. 130, 258-264, 2020
--

A. Habets^{1,*}, F. Crombé², K. Nakamura³, V. Guérin¹, K. De Rauw^{2,†}, D. Piérard², M. Saulmont⁴, T. Hayashi³, J.G. Mainil¹ and D. Thiry¹

ORIGINAL ARTICLE

Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 from diarrhoeic and septicaemic calves and relatedness to human Shigatoxigenic *E. coli* O80:H2

A. Habets^{1,*}, F. Crombé², K. Nakamura³, V. Guérin¹, K. De Rauw^{2,†}, D. Piérard², M. Saulmont⁴, T. Hayashi³, J.G. Mainil¹  and D. Thiry¹

1 Bacteriology, Department of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Centre for Fundamental and Applied Research for Animals and Health (FARAH), University of Liège (ULiège), Liège, Belgium

2 Belgian National Reference Center for STEC (NRC STEC), Universitair Ziekenhuis Brussel (UZ Brussel), Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium

3 Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

4 Association Régionale de Santé et d'Identification Animale (ARSIA), Ciney, Belgium

Keywords

calves, enteropathogenic *Escherichia coli*, genome sequencing, humans, phylogenetic analysis, serotype O80:H2, Shigatoxigenic *Escherichia coli*.

Correspondence

Jacques G. Mainil, Bacteriology, Department of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Campus du Sart Tilman B43a, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 6, Université de Liège, 4000 Liège, Belgium. E-mail: jg.mainil@uliege.be

*Present address: Eurogentec SA, Seraing, Belgium

†Present address: Applied Maths NV, bioMérieux, Sint-Martens-Latem, Belgium

Jacques G. Mainil and Damien Thiry are joint senior authors on this work.

2020/0470: received 13 March 2020, revised 3 June 2020 and accepted 22 June 2020

doi:10.1111/jam.14759

Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia* (*E.*) *coli* (EHEC) are responsible for haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic–uraemic syndrome (HUS) in humans (Tozzoli and Scheutz

Abstract

Aim: The purpose of this work was to identify and genetically characterize enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) O80:H2 from diarrhoeic and septicaemic calves in Belgium and to comparing them with human EHEC after whole genome sequencing.

Methods and Results: Ten EHEC and 21 EPEC O80 identified by PCR between 2009 and 2018 from faeces, intestinal content and a kidney of diarrhoeic or septicaemic calves were genome sequenced and compared to 19 human EHEC identified between 2008 and 2019. They all belonged to the O80:H2 serotype and ST301, harboured the *eae*ζ gene, and 23 of the 29 EHEC contained the *stx2d* gene. Phylogenetically, they were distributed in two major sub-lineages: one comprised a majority of bovine EPEC whereas the second one comprised a majority of *stx2d* bovine and human EHEC.

Conclusions: Not only EPEC but also EHEC O80:H2 are present in diarrhoeic and septicaemic calves in Belgium and are genetically related to human EHEC.

Significance and Impact of the Study: These findings support the need to assess cattle as potential source of contamination of humans by EHEC O80:H2 and to understand the evolution of bovine and human EHEC and EPEC O80:H2.

2014). EHEC are Attaching–Effacing (AE) Shigatoxigenic *E. coli* since they produce the AE lesion and Shiga toxins (Stx) (Piérard *et al* 2012).

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* harbour the *eae* gene, located on the Locus of Enterocyte Effacement

(LEE) pathogenicity island and involved in the production of the AE lesion, and one or more *stx* genes located on lambdoid phages (Stx phages) (Tozzoli and Scheutz 2014). Besides the seven most frequent and pathogenic serotypes worldwide (Karmali *et al.* 2003; Tozzoli and Scheutz 2014), other serotypes can emerge from time to time, like the O104:H4 serotype in Germany in 2011 (Navarro-Garcia 2015) and the O80:H2 serotype reported in France and in some neighbouring and other countries since 2011 (Soysal *et al.* 2016; Fierz *et al.* 2017; Wijnsma *et al.* 2017; Ingelbeen *et al.* 2018; Nüesch-Inderbinen *et al.* 2018; Patel *et al.* 2018; De Rauw *et al.* 2019; Lang *et al.* 2019). In France, the EHEC O80:H2 were the second-leading cause of HUS in children in 2014 (Soysal *et al.* 2016) and represents 30% of the HUS cases between 2013 and 2016 (Ingelbeen *et al.* 2018). In addition to HC and HUS (Tozzoli and Scheutz 2014), EHEC O80:H2 can also cause systemic infection since they harbour a plasmid (pS88) carrying genes coding for virulence properties of extra-intestinal *E. coli* (Soysal *et al.* 2016; Ingelbeen *et al.* 2018). EHEC O80:H2 have also been detected in cattle although much rarely, either in adult cattle in Spain and France (Blanco *et al.* 2004; Cointe *et al.* 2018) or in one young diarrhoeic calf in 1987 in Belgium (Thiry *et al.* 2017; De Rauw *et al.* 2019) and are genetically related to human EHEC O80:H2 (Cointe *et al.* 2018; De Rauw *et al.* 2019).

Conversely the O80:H2 serotype represents 40% of the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated between 2009 and 2015 from young diarrhoeic calves in Belgium (Thiry *et al.* 2017). EPEC produce the AE lesion and carry the *eae* gene but do not possess any *stx* genes (Tozzoli and Scheutz, 2014). These bovine EPEC O80:H2 are also genetically related to Belgian human EHEC O80:H2, including the presence of pS88 plasmid-located genes (De Rauw *et al.* 2019). Nevertheless, there was no evidence of systemic infection in calves (Thiry *et al.* 2017).

The purpose of this work was therefore to (i) further attempt to identify the O80:H2 serotype among EHEC isolated from young diarrhoeic and septicaemic calves from 2015 to 2018; and (ii) genetically compare these bovine EHEC with human EHEC and bovine EPEC O80:H2.

Materials and methods

Escherichia coli isolates

A total of 202 enterohemolysin-producing *E. coli* isolated between mid-2015 and mid-2018 from faeces or intestinal contents of diarrhoeic and/or septicaemic calves (one isolate per calf with a few exceptions) following the routine diagnostic procedure at ARSIA (Regional Association for

Animal Health and Identification) were studied to identify EHEC and EPEC O80 using two different PCRs, as previously described (Iguchi *et al.* 2015; Thiry *et al.* 2017). The first PCR was a triplex PCR detecting the presence of the *eae*, *stx1* and *stx2* genes of EHEC and EPEC and the second PCR detected the O80 antigen-encoding gene.

Genome sequencing and gene identification

To study the genetic relationships between bovine EHEC, human EHEC and bovine EPEC O80, the newly identified bovine EHEC and EPEC were genome sequenced using Illumina sequencers (Table S1) along with (i) six bovine EPEC from a previous study (Thiry *et al.* 2017) and (ii) 10 human EHEC identified in 2018/2019 at the Belgian National Reference Centre (NRC) STEC. In addition, the previously sequenced genomes of 17 Belgian EHEC and EPEC O80:H2 (nine human EHEC isolated between 2009 and 2016, six bovine EPEC isolated between 2009 and 2015 and two bovine EHEC isolated from a single calf in 1987) (Thiry *et al.* 2017; De Rauw *et al.* 2019) and of the American human 2013C-4991 EHEC O80:H2 strain (Patel *et al.* 2018) were included in this comparison (Table S1). The genome sequences of the 52 Belgian EPEC and EHEC are available via the Bioproject PRJNA606200 and the GenBank accession numbers are listed in the Table S1.

The O:H serotypes, multi-locus sequence types (MLST), *eae* and *stx* gene subtypes, type 3 secretion system (T3SS)- and type 3-secreted effector (T3SE)-encoding genes, pS88 plasmid-located genes and other virulence-associated genes were searched for using MLST-2.0, SerotypeFinder-2.0, MyDbFinder-2.0 and VirulenceFinder-2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/>) (%ID threshold: 85%, minimum length: 60%).

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis was performed using the genome of the American human 2013C-4991 EHEC O80:H2 strain as a reference (Patel *et al.* 2018). A maximum likelihood (ML) tree was constructed, as previously described (Nakamura *et al.* 2020). The regions of prophages (PPs) and PP-like integrative elements (IEs) were searched in the complete genome of the human American 2013C-4991 EHEC O80:H2 strain to use the PP- and IE-masked chromosome sequence as the reference genome for one-to-one alignment of WG assemblies of the 52 Belgium isolates. The 1756 single nucleotide polymorphism sites on the PP/IE-free and recombination-free chromosome conserved backbone sequence (4 240 120 bp) of the 53 isolates were

STEC and EPEC O80:H2 in calves and humans

A. Habets *et al.*

identified using Gubbins ver. 2.2.0 and Nucmer program ver. 3.1 (MUMmer package) and used for the construction of the ML tree with RAxML ver. 8.2.10. The tree was rooted by the O149:H10 UMNK88 strain. The reliabilities of the tree internal branches were assessed using bootstrapping with 1000 pseudoreplicates. ML tree was displayed using FigTree ver. 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Results

Identification of EHEC and EPEC O80

Of the 202 haemolytic *E. coli*, 174 tested positive with the triplex PCR for the *eae*, *stx1* and *stx2* genes. Of these, 19 were positive for the O80 antigen by PCR (one isolate per calf with one exception): 9 EPEC, 1 *stx1* and 9 *stx2* EHEC. Three *stx2* EHEC were isolated from the intestinal content and from the kidney of a single septicaemic calves. All 52 Belgian EPEC and EHEC and the American human 2013C-4991 EHEC strain belonged to the O80:H2 serotype and ST301, and harboured the *eae*ζ gene.

Eight bovine EHEC contained the *stx2d* gene and three the *stx1a* gene, including the two isolates from a single calf in 1987 (Table 1 and Table S1). No *stx* gene was detected in the genome of the remaining bovine EHEC (EH3317), that was originally PCR positive for *stx2*, but no more when retested, suggesting the deletion of the *stx2* gene during the cultivation or storage. Of the 20 human EHEC, 15 harboured the *stx2d* gene, including the American 2013C-4991 strain. Two other isolates contained the *stx2a* and the remaining three isolates, the *stx1a* gene (Table 1 and Table S1).

Phylogenetic analysis

Phylogenetically, the 53 bovine and human EHEC and EPEC were distributed in two main lineages (Fig. 1): a major one (L1) with all isolates from 2009 to 2019 and a minor one (L2) with the two bovine *stx1a* EHEC isolated from a single calf in 1987. Lineage L1 was divided into two major and two minor sub-lineages (SL): sub-lineage SL1-1 comprised all but four bovine EPEC, four *stx1a* and three *stx2* bovine and human EHEC (including the American human 2013C-4991 strain) whereas sub-lineage SL1-2 comprised all but four bovine and human *stx2d* EHEC and four bovine EPEC. The two minor sub-lineages comprised one human *stx2a* EHEC (SL1-3) and two bovine *stx2d* EHEC (SL1-4) respectively.

Two human EHEC (EH3173 and EH3180) isolated from two young brothers clustered together, as did the three EHEC isolated from a single calf with enteritis and septicaemia (EH3155, EH3160 and EH3338). In addition, two human EHEC (EH3257 and EH3278) were identical, although there was no evidence of any epidemiological relation (Fig. 1; Table S1).

Identification of virulence-associated genes

The search for virulence genes identified notable variations in the repertoire of (non)-LEE-located T3SS- and T3SE-encoding genes, pS88 plasmid-located genes and other virulence-associated genes (Tables 1 and 2 and Table S1). Of the many genes searched for with VirulenceFinder-2-0 tool, 21 genes were present in all or almost all bovine and human EHEC and EPEC while three others were detected in only a few isolates. Four other genes were differently distributed among EPEC and

Table 1 Virulotypes, type 3 secretion system (T3SS)- and type 3-secreted effector (T3SE)-encoding genes identified by whole genome sequencing (WGS) in the 53 bovine and human EHEC and EPEC O80:H2. The detailed results are listed in Table S1

Hosts	Pathotype (no. isolates)	Virulotype (no. isolates)	LEE-located genes*:	Non-LEE-located genes*: no.		References
			no. +ve isolates <i>espA/B/F/tir</i>	+ve isolates <i>nleA/B/C/espP</i> <i>cif/espII/espJ</i>		
Calves	EPEC (21)	<i>eae</i> ζ (21)	21	21	0	De Rauw <i>et al.</i> (2019);
	EHEC (12)	<i>eae</i> ζ <i>stx1a</i> (3 [†])	3	2–3	0	Patel <i>et al.</i> (2018);
		<i>eae</i> ζ <i>stx2d</i> (9 ^{‡,§})	9	9	0	Thiry <i>et al.</i> (2017); this study
Humans	EHEC (20)	<i>eae</i> ζ <i>stx1a</i> (3)	3	3	0	
		<i>eae</i> ζ <i>stx2a</i> (2)	2	2	0	
		<i>eae</i> ζ <i>stx2d</i> (15 [¶])	15	13–15	0–4	

*See Joensen *et al.* (2014) for the proteins encoded by the listed genes.

[†]Including two isolates from the intestines of a single calf in 1987.

[‡]Including one isolate originally *stx2+* by PCR, but no more after WGS. According to the ML tree (Fig. 1), this isolate was most probably *stx2d* positive.

[§]Including three isolates from the intestinal content and the kidney of a single calf in 2018.

[¶]Including the American human 2013C-4991 strain.

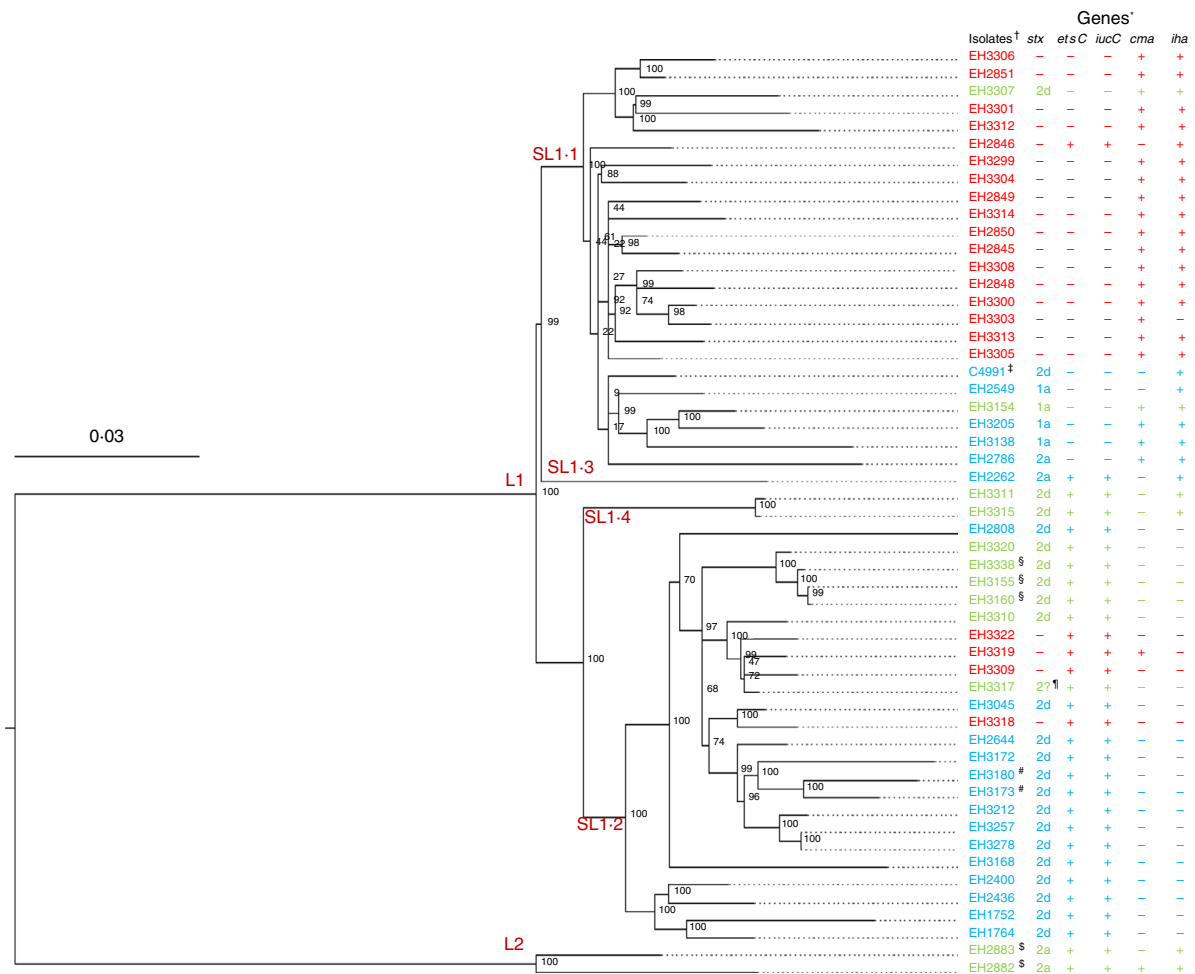


Figure 1 Whole genome (WG)-based maximum likelihood (ML) tree of the 52 bovine and human EHEC and EPEC O80:H2 isolated in Belgium. †See Joensen *et al.* (2014) and Lemaitre *et al.* (2012) for the proteins encoded by these genes. ‡The origin of each isolate is indicated by the following colours: calf EPEC, red; calf EHEC, green; human EHEC, blue. §American human 2013C-4991 EHEC as a reference. ¶Three isolates from the intestinal content and the kidney of a single calf in 2018. #This isolate was originally *stx2+* by PCR, but no more after WGS. §Isolated from two young brothers. §Two isolates from the intestines of a single calf in 1987. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

EHEC. The *iucC* and *etsC* pS88-located genes coding for the aerobactin siderophore and for a putative type 1 secretion outer membrane protein, were present together in only one isolate in sub-lineage SL1-1, but in all isolates in sub-lineages SL1-2, SL1-3, SL1-4 and in lineage L2 (Fig. 1). Conversely, two chromosome-located genes, *cma* and *iha* coding for the colicin M and for an iron-regulated gene A (IrgA) homologous adhesin, were present together in most isolates in sub-lineage SL1-1, but in only a few isolates in sub-lineages SL1-2, SL1-3, SL1-4 and in lineage L2. Two gene profiles were therefore defined: the ‘EPEC gene profile’ (negative for *etsC* and *iucC* and positive for *cma* and *iha*) and the ‘EHEC gene profile’

(positive for *iucC* and *etsC* and negative for *cma* and *iha*) (Fig. 1).

Not taking into account these four genes, the gene profile of the 52 Belgian isolates comprised between 18 and 22 genes while the American human 2013C-4991 EHEC strain comprised only 14 genes, being negative for the *espF* LEE-located, for the *cia*, *hlyF*, *iroN*, *ompT* and *sitA* pS88-located and for the *ehxA* genes. One Belgian *stx1a* human EHEC was also negative for the *hlyF*, *iroN*, *ompT* and *sitA* pS88-located genes, while seven *stx2d* human and bovine EHEC and one bovine EPEC were negative for both *mchB* and *mchC* genes (Table S1).

STEC and EPEC O80:H2 in calves and humans

A. Habets *et al.***Table 2** Virulotypes, pS88-located and other virulence-associated genes identified by whole genome sequencing (WGS) in the 53 bovine and human EHEC and EPEC O80:H2. The detailed results are listed in Table S1

Host	Pathotype (no. iso- lates)	Virulotype (no. isolates)	pS88-located genes* [†] : no. +ve isolates		Other virulence genes*: no. +ve isolates			References
			<i>cia/cvaA/hlyF/iroN/issI/ ompT/sitA</i>	<i>etsC/ iucC</i>	<i>efa1/ehxA/gad/ mchB/C/F</i>	<i>astA/ireA/ cba</i>	<i>cmal/ iha</i>	
Calves	EPEC (21)	<i>eae</i> _ζ (21)	18–21	5–5	20–21	0–1	15–17	De Rauw <i>et al.</i> (2019); Patel <i>et al.</i> (2018); Thiry <i>et al.</i> (2017); this study
	EHEC (12)	<i>eae</i> _ζ <i>stx1a</i> (3 [‡])	3	2–2	2–3	0–3	3–3	
		<i>eae</i> _ζ <i>stx2d</i> (9 [§] ,*)	8–9	8–8	7–9	0–2	1–3	
Humans	EHEC (20)	<i>eae</i> _ζ <i>stx1a</i> (3)	1–3	0–0	3	0–2	2–3	
		<i>eae</i> _ζ <i>stx2a</i> (2)	2	1–1	2	0–1	1–2	
		<i>eae</i> _ζ <i>stx2d</i> (15 ^{**})	13–15	14–14	10–15	0	0–1	

*See Joensen *et al.* (2014), Johnson *et al.* (2006) and Lemaitre *et al.* (2012) for the proteins encoded by the listed genes.[†]No isolate was positive for the *eitB* gene.[‡]Including two isolates from the intestines of a single calf in 1987.[§]Including one isolate originally *stx2+* by PCR, but no more after WGS. According to the ML tree (Fig. 1), this isolate was most probably *stx2d* positive.^{*}Including three isolates from the intestinal content and the kidney of a single calf in 2018.^{**}Including the American human 2013C-4991 strain.**Discussion**

Besides EPEC, EHEC O80:H2 are also present in young calves in Belgium, and are associated with diarrhoea and septicaemia. Nevertheless, systemic infection by EHEC or EPEC in calves appears to be a rare event although several pS88-located and other invasion-related genes are present (Thiry *et al.* 2017; De Rauw *et al.* 2019). Although the O80:H2 serotype was already identified among EHEC from healthy cattle previously (Blanco *et al.* 2004; Cointe *et al.* 2018), this is to our knowledge the first description in young diarrhoeic and septicaemic calves, with the exception of the two isolates from a single calf in 1987 (Thiry *et al.* 2017). Nevertheless, since the O80 serotype is not included in the list of the most frequent and pathogenic EHEC worldwide in humans (Karmali *et al.* 2003; Tozzoli and Scheutz 2014), it is not systematically searched for in human medicine and even less in veterinary medicine.

With the emergence of this invasive EHEC serotype in Western Europe, more especially in France and Switzerland, it is of the utmost importance to study the genetic relatedness of human EHEC between themselves and with bovine EHEC and EPEC. According to a previous report on a limited number of isolates, human EHEC and bovine EPEC are indeed genetically related (De Rauw *et al.* 2019). The results of this study on 53 *E. coli* O80:H2 not only confirm these previous results but also show that bovine EHEC isolated since 2009 are phylogenetically even more closely

related to human EHEC than to bovine EPEC, even if all *E. coli* O80:H2 belong to ST301, as previously published (Soysal *et al.* 2016; Fierz *et al.* 2017; Ingelbeen *et al.* 2018; Nüesch-Inderbinnen *et al.* 2018) and to the same phylogenetic major lineage L1 (Fig. 1). The only two bovine EHEC not belonging to L1 were isolated in 1987.

Indeed, L1 includes two major sub-lineages, SL1.1 and SL1.2 with different distributions of *E. coli* O80:H2: the majority of bovine EPEC belong to SL1.1 and the majority of bovine and human EHEC belong to SL1.2 (Fig. 1). Nevertheless, the few EHEC in sub-lineage SL1.1 contained different *stx* genes while those in sub-lineage SL1.2 harboured only the *stx2d* genes. Most of these *stx2d* EHEC cluster apart from *stx1a* EHEC as already observed (Nüesch-Inderbinnen *et al.* 2018).

These data suggest that (i) the EPEC O80:H2 in sub-lineage SL1.2 actually derived from *stx2d* EHEC by deletion of the *stx2d* gene, as already observed or suggested (Bielaszewska *et al.* 2007; Cointe *et al.* 2018) and as the EH3317 isolate during this study; and (ii) the EHEC O80:H2 in sub-lineage SL1.1 originated from EPEC by Stx phage acquisition (Toth *et al.* 2003; Bielaszewska *et al.* 2007) which appears to have occurred at different times as these EHEC contain different *stx* genes (Fig. 1). Nevertheless, the loss of Stx phages by all these bovine EPEC cannot be absolutely ruled out as a consequence of a higher Stx1a or Stx2a phage instability, like observed by others (Cointe *et al.*, 2018), although this hypothesis needs more phylogenetic studies to be confirmed.

A. Habets *et al.*

STEC and EPEC O80:H2 in calves and humans

In addition, the two different profiles of the *iucC/etsC* and *cmaliha* genes, preferentially associated with *stx2d* EHEC and with EPEC, respectively (Table 2 and Table S1; Fig. 1) might be related, directly or indirectly, to their virulence potential and/or molecular evolution. Interestingly enough, the presence of the *etsC* and *iucC* pS88-located genes in *stx2d* but their absence in *stx2a* human EHEC was already observed in French and Swiss *E. coli* O80:H2 (Cointe *et al.* 2018; Nüesch-Inderbinen *et al.* 2018).

In as much the source of human infections is still unclear (Soysal *et al.* 2016; Ingelbeen *et al.* 2018; Nüesch-Inderbinen *et al.* 2018), these new findings support the need to perform additional studies to (i) assess the healthy adult cattle as potential source of contamination of humans by EHEC O80:H2, since human and bovine EHEC are co-distributed in the two major sub-lineages, although EHEC O80:H2 in healthy cattle are rare or absent (Blanco *et al.* 2004; Cointe *et al.* 2018; Thiry *et al.* 2018); (ii) understand the origin of EHEC O80:H2 by comparing them with *E. coli* O80 from different countries, animal species and H serotypes (Cointe *et al.* 2018; Hayashi, Mainil, Nakamura and Thiry, unpublished data); (iii) understand the evolution of the human and bovine EHEC and EPEC within the O80:H2 serotype; and (iv) investigate the putative role of the *iucC/etsC* and *cmaliha* genes in the pathogenicity of EHEC and EPEC O80:H2.

Acknowledgements

The authors are grateful to the scientists and technicians of the Brussels Interuniversity Genomics High Throughput core (BRIGHTcore; funded by the VUB grant OZR2434, ULB and 'Foundation against Cancer' grant 2016-021, UZ Brussel and Hôpital Erasme; www.brightcore.be) for performing the sequencing, and to Mr Jean-Noël Duprez of ULiège and the technicians of the Bacteriology laboratory of ARSIA for their efficient technical help. The University of Liège provided financial support ('Fonds Spéciaux de la Recherche, 2016-2018 and 2018-2020').

Conflict of Interest

There is no conflict of interest to declare.

Author contribution

A.H. performed the bovine EHEC and EPEC O80:H2 PCR identification, analysed the genome sequences to identify the O:H serotype, the MLST, and the virulence-

associated gene profiles and wrote parts of the manuscript. F.C., K.D.R. and D.P. isolated and identified the human EHEC O80:H2 and sequenced the bovine and human EHEC and EPEC O80:H2. K.N. and T.H. performed the phylogenetic analysis and the ML tree and wrote parts of the manuscript. V.G. and M.S. isolated and identified the bovine enterohemolysin-positive *E. coli*. J.G.M. and D.T. supervised the whole study, wrote parts of the manuscript and synthesized the different parts of the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

References

- Bielaszewska, M., Prager, R., Köck, R., Mellman, A., Zhang, W., Tschäpe, P.I., Tarr, P.I. and 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02937-06>.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., González, E.A., Bernárdez, M.I. and Blanco, J. (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *J Clin Microbiol* **42**, 645–651. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.645-651.2004>.
- Cointe, A., Birgy, A., Mariani-Kurkdjian, P., Liguori, S., Courroux, C., Blanco, J., Delannoy, S., Fach, P. *et al.* (2018) Emerging multidrug-resistant hybrid pathotype Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O80 and related strains of clonal complex 165, Europe. *Emerg Infect Dis* **24**, 2262–2269. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180272>.
- De Rauw, K., Thiry, D., Caljon, B., Saulmont, M., Mainil, J. and Piérard, D. (2019) Characteristics of Shiga toxin producing- and enteropathogenic *Escherichia coli* of the emerging serotype O80:H2 isolated from humans and diarrhetic calves in Belgium. *Clin Microbiol Infect* **25**, 111.e5–111.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.023>.
- Fierz, L., Cernela, N., Hauser, E., Nüesch-Inderbinen, M. and Stephan, R. (2017) Characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated during 2010–2014 from human infections in Switzerland. *Front Microbiol* **8**, 1471. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01471>.
- Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheutz, F. and Ohnishi, M. (2015) *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J Clin Microbiol* **53**, 2427–2432. <https://doi.org/10.1128/JCM.00321-15>.
- Ingelbeen, B., Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Le Hello, S., Danis, K., Sommen, C., Bonacorsi, S. and de Valk, H. (2018) Emerging Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O80 associated hemolytic and uremic syndrome in France, 2013–2016: differences with other serogroups.

STEC and EPEC O80:H2 in calves and humans

A. Habets *et al.*

- PLoS One* **12**, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207492>.
- Joensen, K.G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M. and Aarestrup, F.M. (2014) Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **52**, 1501–1510. <https://doi.org/10.1128/jcm.03617-13>.
- Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J. and Nolan, L.K. (2006) DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **188**, 745–758. <https://doi.org/10.1128/jb.188.2.745-758.2006>.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C. *et al.* (2003) Genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* **41**, 4930–4940. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.11.4930.2003>.
- Lang, C., Hiller, M., Konrad, R., Fruth, A. and Flieger, A. (2019) Whole-genome-based public health surveillance of less common Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serovars and untypeable strains identifies four novel O genotypes. *J Clin Microbiol* **57**, e00768-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00768-19>
- Lemaître, C., Bidet, P., Bingen, E. and Bonacorsi, S. (2012) Transcriptional analysis of the *Escherichia coli* ColV-Ia plasmid pS88 during growth in human serum and urine. *BMC Microbiol* **12**, 115. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-115>
- Nakamura, K., Murase, K., Sato, M.P., Toyoda, A., Itoh, T., Mainil, J.G., Piérard, D., Yoshino, S. *et al.* (2020) Differential dynamics and impacts of prophages and plasmids on the pangenome and virulence factor repertoires of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:H28. *Microb Gen* **6**, <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000323>.
- Navarro-Garcia, F. (2015). *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli* and other Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* ed. Sperandio, V. and Hovde, C.J. pp. 505–532. Washington, DC: ASM Press. ISBN 978-1-55581-878-4.
- Nüesch-Inderbinen, M., Cernela, N., Wüthrich, D., Egli, A. and Stephan, R. (2018) Genetic characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* belonging to the emerging hybrid pathotype O80:H2 isolated from humans 2010–2017 in Switzerland. *Int J Med Microbiol* **308**, 534–538. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.007>.
- Patel, P.N., Lindsey, R.L., Garcia-Toledo, L., Rowe, L.A., Batra, D., Whitley, S.W., Drapeau, D., Stoneburg, D. *et al.* (2018) High-quality whole-genome sequences for 77 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains generated with PacBio sequencing. *Genome Announc* **6**, <https://doi.org/10.1128/genomeA.00391-18>.
- Piérard, D., De Greve, H., Haesebrouck, F. and Mainil, J.G. (2012) O157:H7 and O104:H4 Verotoxin-producing *Escherichia coli*: respective role of cattle and humans. *Vet Res* **43**, 13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-13>.
- Soysal, N., Mariani-Kurkdjian, P., Smail, Y., Liguori, S., Gouali, M., Loukiadis, E., Fach, P., Bruyand, M. *et al.* (2016) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hybrid pathotype O80:H2 as a new therapeutic challenge. *Emerg Infect Dis* **22**, 1604–1612. <https://doi.org/10.3201/eid2209.160304>.
- Thiry, D., De Rauw, K., Takaki, S., Duprez, J.-N., Iguchi, A., Piérard, D., Korsak, N. and Mainil, J.G. (2018) Low prevalence of the “gang of seven” and absence of the O80:H2 serotypes among Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in intestinal contents of healthy cattle at two slaughterhouses in Belgium in 2014. *J Appl Microbiol* **124**, 867–873. <https://doi.org/10.1111/jam.13677>.
- Thiry, D., Saulmont, M., Takaki, S., De Rauw, K., Duprez, J.-N., Iguchi, A., Piérard, D. and Mainil, J.G. (2017) Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 in young calves with diarrhea, Belgium. *Emerg Infect Dis* **23**, 2093–2095. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170450>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/aem.69.12.7242-7247.2003>.
- Tozzoli, R. and Scheutz, F. (2014) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. In *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology* ed. Morabito, S. pp. 1–18. Norwich, UK: Horizon Scientific Press and Caister Academic Press. ISBN 978-1-908230-37-9.
- Wijnsma, K.L., Schijvens, A.M., Rossen, J.W.A., Kooistra-Smid, A.M.D.M., Schreuder, M.F. and van de Kar, N.C.A.J. (2017) Unusual severe case of hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin 2d-producing *E. coli* O80:H2. *Pediatr Nephrol* **32**, 1263–1268. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3642-3>.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. List of bovine EPEC, bovine EHEC and human EHEC O80:H2 studied by whole genome sequencing (WGS): case history data, *eae* and *stx* gene subtypes, Type 3 Secretion System- and Type 3-Secreted Effector-encoding genes, other virulence-associated genes and GenBank accession numbers.

Table S1

Host / Pathotype	Isolate code ¹	Isolation year	Clinical sign / Lesion	Age	Sex	Province / Country	NGS technology	LEE-located Type 3 Secretion System- and Type 3-secreted effector-encoding genes ²					Non-LEE-located Type 3 Secretion System- and Type 3-secreted effector-encoding genes ²					pS88 plasmid-located genes ³										
								<i>eae</i> and <i>stx</i> gene subtypes	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espF</i>	<i>tir</i>	<i>espP</i>	<i>nleA</i>	<i>nleB</i>	<i>nleC</i>	<i>cif</i>	<i>espL</i>	<i>espJ</i>	<i>cia</i>	<i>cvxA</i>	<i>hlyF</i>	<i>iroN</i>	<i>iss</i>				
bEPEC	EH2850	2009	Diarrhea	UNK	UNK	LIEGE	MiSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2851	2009	Diarrhea	UNK	UNK	NAMUR	MiSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2846	2010	Diarrhea	1 M	M	LUXEMBOURG	MiSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2845	2012	Diarrhea	6.5 M	M	LIEGE	MiSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2849	2014	Diarrhea	16 D	M	LIEGE	MiSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2848	2015	Diarrhea	17 D	M	LUXEMBOURG	MiSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3299	2015	Enteritis, pneumonia	3 M	F	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3300	2015	Enteritis	UNK	UNK	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3301	2015	Enteritis	UNK	UNK	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3303	2015	Septicemia, salmonellosis	2 W	M	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3304	2015	Septicemia, salmonellosis	10 D	F	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3305	2015	Enteritis	2 W	F	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3306	2015	Diarrhea	UNK	UNK	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3308	2016	Diarrhea	UNK	UNK	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3309	2016	Hemorrhagic colitis	1 M	F	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3312	2017	Diarrhea	UNK	UNK	BRABANT WALLON	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3313	2017	Hemorrhagic colitis	1 W	M	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3314	2017	Enteritis	UNK	F	GD Luxembourg	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3318	2017	Septicemia	1 W	M	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3319	2017	Diarrhea	UNK	UNK	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3322	2018	Pleuropneumonia	1 W	M	NAMUR	NovaSeq	ξ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
bEHEC	EH2882 ⁴	1987	Diarrhea	2.5 M	UNK	BRABANT WALLON	MiSeq	ξ	a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2883 ⁵	1987					MiSeq	ξ	a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3307	2016	Diarrhea	UNK	UNK	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3310	2016	Diarrhea	UNK	UNK	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3311	2016	Diarrhea	UNK	UNK	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3315	2017	Diarrhea	UNK	UNK	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3317	2017	Enteritis	1 W	F	LUXEMBOURG	NovaSeq	ξ	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3320	2017	Diarrhea	UNK	UNK	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3154	2018	Enteritis, pneumonia	4 W	F	NAMUR	HiSeq	ξ	a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3155 ⁶	2018	Enteritis	1 W	F	NAMUR	HiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3160 ⁸	2018					HiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3338 ⁸	2018	Septicemia				NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
bEHEC	EH1752	2008	Diarrhea	1 Y	F	BRABANT WALLON	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH1764	2008	Diarrhea	72 Y	F	UNK	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2262	2013	Diarrhea	49 Y	F	VLAAMSE BRABANT	MiSeq	ξ	-	a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2400	2014	Diarrhea	61 Y	F	WEST VLAANDEREN	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2436	2014	UNK	UNK	F	BRABANT WALLON	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2549	2015	Bloody diarrhea	60 Y	F	ANTWERPEN	MiSeq	ξ	a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2644	2015	Diarrhea/HUS	11 M	F	BRABANT WALLON	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2786	2016	UNK	UNK	F	BRUSSELS CAPITAL	MiSeq	ξ	-	a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH2808	2016	HUS	61 Y	F	UNK	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3045	2018	Diarrhea	68 Y	M	LIEGE	HiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3138	2018	Bloody diarrhea	63 Y	F	OOST VLAANDEREN	MiSeq	ξ	a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3168	2018	Bloody diarrhea	72 Y	F	ANTWERPEN	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3172	2018	Diarrhea	66 Y	F	LIEGE	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3173 ⁷	2018	UNK	1 Y	M	HAINAUT	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3180 ⁷	2018	UNK	4 Y	M	HAINAUT	MiSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3205	2019	Diarrhea	33 Y	M	OOST VLAANDEREN	HiSeq	ξ	a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3212	2019	Diarrhea/HUS	1 Y	F	BRUSSELS CAPITAL	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3257	2019	Bloody diarrhea/HUS/Death ⁵	1 Y	M	NAMUR	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	EH3278	2019	Diarrhea/HUS	11 M	F	HAINAUT	NovaSeq	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	2013C-4991 [#]	2013	---	---	---	USA	PacBio	ξ	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

EPEC = enteropathogenic E. coli; EHEC = enterohemorrhagic E. coli; b = bovine; h = human; UNK = unknown; HUS = hemolytic-uremic syndrome; D = days; W = weeks; M = months; Y = years; GD = Grand-Duchy

¹ see Joensen et al. (2014), Johnson et al. (2006) and Lemaitre et al. (2012) for the proteins encoded by the listed genes

² The origin of each isolate is indicated by the following colors: calf EPEC, red; calf EHEC, green; human EHEC, blue.

³ isolated from the intestines of a single calf in 1987

⁴ isolated from the intestinal content and the kidney of a single calf in 2018

⁵ isolated from 2 young brothers

⁶ American human 2013C-4991 EHEC as a reference

⁷ from a cardiogenic shock

⁸ this isolate was originally stx2+ by PCR, but no more after WGS

Genes coding for other virulence-associated factors*														GenBank	References		
<i>ompT</i>	<i>sitA</i>	<i>eitB</i>	<i>etsC</i>	<i>incC</i>	<i>efal</i>	<i>ehxA</i>	<i>gad</i>	<i>mchB</i>	<i>mchC</i>	<i>mchF</i>	<i>astA</i>	<i>cha</i>	<i>ireA</i>	<i>ema</i>		<i>iha</i>	accession numbers
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	SAMN13876229	De Rauw <i>et al.</i> 2019; Thiry <i>et al.</i> 2017
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	SAMN13876233	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN13876234	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN13876235	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14087589	
-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN13876249	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086249	Thiry <i>et al.</i> 2017; this study
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086250	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086251	
+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	SAMN14086255	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086265	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086266	This study
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086268	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086269	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14086270	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14086995	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14087009	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14087010	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087011	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	SAMN14087012	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087013	De Rauw <i>et al.</i> 2019; Thiry <i>et al.</i> 2017
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	SAMN13876256	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN13876258	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14087032	This study
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087033	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	SAMN14087039	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	SAMN14087040	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087041	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087146	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	SAMN14087147	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087149	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087151	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087161	
+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	SAMN14087242	De Rauw <i>et al.</i> 2019
-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	SAMN14087243	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	SAMN14087244	
+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	SAMN14087245	
+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	SAMN14087253	
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	SAMN14087304	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087454	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14087455	
+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14087456	
+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090730	This study
-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	SAMN14090731	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090732	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090733	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090734	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090735	
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	SAMN14090736	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090737	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090738	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	SAMN14090739	
-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	SAMN08579568	Patel <i>et al.</i> 2018

Section expérimentale

Etude 2 :

Absence de O80:H2 chez des veaux sains

Préambule

Après avoir identifié des EPEC et AE-STE C O80:H2 chez des veaux diarrhéiques/septicémiques, il était intéressant de savoir si ce sérotype était également présent chez des veaux sains. L'infection humaine se produit le plus souvent par la consommation d'aliments d'origine animale ou végétale contaminés par des matières fécales de ruminants, principalement des bovins (Thiry et al., 2018). Les bovins peuvent en effet être porteurs sains dans leur tractus intestinal, plus particulièrement dans le colon et à la hauteur de la jonction recto-anale (Beutin et al., 2015). De plus, les jeunes veaux sont plus fréquemment porteurs sains d'AE-STE C que les animaux plus âgés (Browne et al., 2018 ; Engelen et al., 2021 a,b).

Dans l'étude 2, l'objectif a été d'évaluer la présence de ce sérotype O80:H2 parmi des EPEC et AE-STE C chez des veaux sains de moins de 6 mois dans 3 exploitations laitières différentes après prélèvements par écouvillonnage rectal (« *recto-anal mucosal swabbing* » ou RAMS) et d'évaluer la présence de ces différents pathotypes.

Un total de 233 RAMS ont été testé par une PCR ciblant les gènes *eae*, *stx1* et *stx2*. Sur ces 233 RAMS, 148 étaient positifs pour ces gènes. Ceux-ci ont étéensemencés sur quatre milieux gélosés (semi-) sélectifs. Ensuite, 2146 colonies provenant de ces milieux ont été testées par hybridation sur colonies. Sur les 2146 colonies, 294 provenant de 69 RAMS ont été confirmées par PCR comme étant des AE-STE C, des EPEC ou STE C. Ces résultats ont permis de confirmer que les jeunes veaux laitiers en bonne santé sont des porteurs sains d'EPEC et AE-STE C. Ensuite, ces 294 souches ont été testées pour le séro groupe O80.

Une majorité d'EPEC appartient à des sérotypes O jusqu'ici non identifiés et aucun EPEC, ni AE-STE C O80:H2 n'a été identifié.

Identification of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes in healthy young dairy calves in Belgium by recto-anal mucosal swabbing





Veterinary Sciences, Vol. 7, 167, 2020
--

Audrey Habets¹, Frederik Engelen², Jean-Noël Duprez¹, Brecht Devleeschauwer^{3,4}, Marc Heyndrickx^{5,6}, Lieven De Zutter⁴, Damien Thiry^{1,*}, Eric Cox² and Jacques Mainil¹



Article

Identification of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes in Healthy Young Dairy Calves in Belgium by Recto-Anal Mucosal Swabbing

Audrey Habets ^{1,†}, Frederik Engelen ², Jean-Noël Duprez ¹, Brecht Devleesschauer ^{3,4}, Marc Heyndrickx ^{5,6}, Lieven De Zutter ⁴, Damien Thiry ^{1,*}, Eric Cox ² and Jacques Mainil ¹

¹ Laboratory of Bacteriology, Department of Infectious Diseases, Institute for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH) and Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Quartier Vallée II, Avenue de Cureghem 6, B-4000 Liège, Belgium; Audrey.Habets@uliege.be (A.H.); Jean-Noel.Duprez@uliege.be (J.-N.D.); jg.mainil@uliege.be (J.M.)

² Laboratory of Immunology, Department of Virology, Parasitology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium; Frederik.Engelen@UGent.be (F.E.); eric.cox@ugent.be (E.C.)

³ Department of Epidemiology and Public Health, Sciensano, Rue Juliette Wytsmanstraat 14, B-1050 Brussels, Belgium; brecht.devleesschauer@sciensano.be

⁴ Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium; lieven.dezutter@ugent.be

⁵ Institute for Agricultural and Fisheries Research, Unit Technology and Food, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle, Belgium; marc.heyndrickx@ilvo.vlaanderen.be

⁶ Department of Pathology, Bacteriology and Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium; marc.heyndrickx@ugent.be

* Correspondence: damien.thiry@uliege.be

† Current address: Eurogentec SA, B-4100 Seraing, Belgium.

Received: 9 September 2020; Accepted: 29 October 2020; Published: 31 October 2020



Abstract: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), and Shigatoxigenic *E. coli* (STEC) are carried by healthy adult cattle and even more frequently by young calves in their intestinal tract, especially at the height of the recto-anal junction. The purpose of the present study was to assess the presence of ten EHEC, EPEC, and/or STEC O serotypes (O5, O26, O80, O103, O111, O118, O121, O145, O157, and O165) in calves sampled via recto-anal mucosal swabs (RAMS) at three dairy farms in Belgium. A total of 233 RAMS were collected on three consecutive occasions from healthy <6-month-old Holstein-Friesian calves and submitted to a PCR targeting the *eae*, *stx1*, and *stx2* genes after non-selective overnight enrichment growth. The 148 RAMS testing positive were streaked on four (semi-)selective agar media; of the 2146 colonies tested, 294 from 69 RAMS were PCR-confirmed as EHEC, EPEC, or STEC. The most frequent virulotype was *eae+* EPEC and the second one was *stx1+* *stx2+* STEC, while the *eae+* *stx1+* and *eae+* *stx1+* *stx2+* virulotypes were the most frequent among EHEC. The majority of EHEC (73%) tested positive for one of the five O serotypes detected (O26, O103, O111, O145, or O157) vs. 23% of EPEC and 45% of STEC. Similarly, more RAMS (73%) harbored EHEC isolates positive for those five serotypes compared to EPEC (53%) or STEC (52%). This survey confirms that (i) healthy young dairy calves are asymptomatic carriers of EHEC and EPEC in Belgium; (ii) the carrier state rates, the virulotypes, and the identified O serotypes differ between farms and in time; and (iii) a majority of EPEC belong to so far unidentified O serotypes.

Keywords: *Escherichia coli*; EPEC; STEC; dairy calves; recto-anal mucosal swab; Belgium

1. Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are important human pathogens responsible for hemorrhagic colitis (HC), the origin of their name, and the life-threatening hemolytic-uremic syndrome (HUS). Their most important virulence-associated properties are the Shiga toxins (Stx1 and/or Stx2), encoded by phage-located genes (*stx1* and *stx2*), and the production of the histological attaching–effacing (AE) lesion, encoded by genes located on a pathogenicity island (the locus of enterocyte effacement or LEE), including the *eae* gene coding for the intimin adhesin. There exists a broad variety of human EHEC serotypes of whom O26:H11, O103:H2, O111:H-, O121:H19, O145:H-, O157:H7, and O165:H25 (the so-called “gang-of-seven”) are the most frequent and pathogenic worldwide, and O157:H7 and O26:H11 represent the majority of confirmed human cases in the EU [1–4]. However, not all Stx- and AE-producing *E. coli* cause HC in humans and, therefore, the acronym EHEC is not appropriate for them. Therefore, the acronym AE-STE_C, after attaching–effacing- and Shiga-toxin-producing *E. coli*, will be used throughout this manuscript, as previously proposed [5].

Human infection most frequently occurs via the consumption of animal- or plant-derived foodstuffs contaminated with ruminant, mostly cattle, feces. Cattle can indeed be asymptomatic carriers in their intestinal tract, more especially in the colon and at the height of the recto-anal junction [2,6–8]. Furthermore, young calves are more frequently healthy carriers of AE-STE_C than older animals [9–11]. In addition, AE-STE_C are also responsible for diarrhea in <3-month-old calves. The majority belong to some of the “gang-of-seven”, such as O26:H11 and O111:H-, and to a few other serotypes, such as O5:H-, O80:H2, and O118:H16 [12–14].

Besides AE-STE_C, enteropathogenic *E. coli* (EPEC) harbor the LEE and the *eae* gene and produce the AE lesion but no Stx, while STE_C sensu stricto produce Stx but no AE lesion. EPEC are responsible for diarrheic diseases in humans and several animals, including young calves. EPEC can belong to host-specific serotypes (such as O127 in humans or O15 in rabbits) or to host-non-specific, including the “gang-of-seven”, serotypes (such as O26:H11, O80:H2, and O111:H- in calves). However, the serotypes of the majority of bovine EPEC remain unidentified. As with AE-STE_C, EPEC and STE_C are also present in asymptomatic cattle [1,12–17].

The purpose of the present study was to assess the presence of the “gang-of-seven” and of three other (O5, O80, and O118) (AE-)STE_C and EPEC O serotypes in healthy <6-month-old dairy calves sampled via recto-anal mucosal swabs (RAMS) at three farms [18,19] by following a serotype non-specific enrichment and isolation procedure [17].

2. Material and Methods

2.1. Farms, Animals, and Sampling

A total of 233 RAMS were collected from <6-month-old Holstein-Friesian calves at 3 Belgian dairy farms situated in East Flanders (74 in FarmA, 71 in FarmB, and 88 in FarmC) on 3 consecutive occasions (65 at Sampling1, 75 at Sampling2, and 93 at Sampling3) 2 to 4 weeks apart between June and October 2018 [20]. During the survey, 18 calves in FarmA, 19 calves in FarmB, and 11 calves in FarmC were sampled twice, while 6 calves in FarmA and 13 calves in FarmC were sampled three times. Sterile cotton prepping balls (Covidien, Dublin, Republic of Ireland) were inserted into the anus of the calves and circular motions were applied to sample the entire mucosal surface of the recto-anal junction. Clinical signs (diarrhea), if any, were recorded at each visit. Fecal sampling by recto-anal swabbing is considered non-invasive. Therefore, the calves in this study did not fall into the definition of experimental animals and no ethical approval was required.

2.2. Preliminary Screening

All RAMS were transported on ice to the laboratory of UGent, stored overnight at 4 °C, and homogenized in 25 mL of maximum recovery diluent (Oxoid, Dilbeek, Belgium) by stomaching [20].

At ULiège, the whole procedure to isolate EPEC and (AE-)STEC was slightly adapted from Thiry and collaborators [17].

Briefly, 100 µL of the suspension was added to 5 mL of lauryl sulfate broth (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and incubated overnight at 37 °C. Bacterial DNA was extracted from 1.5 mL of the enrichment broths via the alkaline-boiling method and stored at –20 °C. Lysates were tested with a triplex PCR targeting the *eae*, *stx1*, and *stx2* genes [21]. Each PCR-positive broth was subsequently streaked onto four (semi-)selective agar plates and incubated overnight at 37 °C: McConkey's (MC), Chromocult Coliform ES (ES) (VWR, Leuven, Belgium), Chromocult Coliform ES supplemented with 2.5 mg/mL of potassium tellurite (ESTe) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) [22], and supplemented CHROMagar™ STEC base (STECB) (I2A, Montpellier, France).

2.3. Identification of Virulotypes and O Serotypes

Up to 5 colonies per agar plate were picked up, inoculated into 200 µL Luria–Bertani (LB) broth in 96-well microtiter plates, and tested by colony hybridization (CH). CH was performed with PCR-derived 32P radioactively labeled gene probes targeting the *eae*, *stx1*, and *stx2* genes to identify EPEC and (AE-)STEC [23]. After overnight incubation at 37 °C, 1 µL from each well was transferred onto LB agar using a transfer comb, followed by overnight incubation at 37 °C. The colonies were transferred by contact onto Whatman 541 paper filters (VWR, Leuven, Belgium) and treated to lyse the cells and denature the DNA. All probe-positive colonies were stored at –80 °C in LB broth with 40% glycerol until further use.

Probe-positive colonies were subsequently grown overnight on LB agar plates at 37 °C. DNA was extracted from a single colony by the alkaline-boiling method and subjected to the triplex PCR for the *eae*, *stx1*, and *stx2* genes for confirmation of the virulotypes [21,24]. Isolates with CH/PCR discordant results were retested with the PCR. Finally, confirmed triplex PCR-positive colonies were tested by PCR for the ten O serotypes listed above: the “gang-of-seven”, O5, O80, and O118 [21].

3. Results

3.1. PCR-Positive RAMS

Of the 233 RAMS after overnight enrichment in lauryl sulfate, 148 tested positive with the triplex PCR (Table 1): 49 in FarmA (66%), 47 in FarmB (66%), and 52 in FarmC (59%). The number of PCR-positive RAMS increased with the sampling time (Table 1): 13 RAMS (20%) were PCR-positive at Sampling1 vs. 50 RAMS (77%) at Sampling2 and 85 RAMS (91%) at Sampling3. Eleven of the PCR-positive RAMS were sampled from calves with signs of diarrhea. All 148 PCR-positive broths were subsequently streaked on MC, ES, ESTe, and STECB agar plates and incubated overnight at 37 °C.

Table 1. Results of the different tests performed on the 233 recto-anal mucosal swabs (RAMS) and isolated colonies from <6-month-old calves in three farms during three sampling times.

Performed Tests	RAMS		Number Positive RAMS (n = 69)								
	Farms	FarmA	FarmB			FarmC			Total		
	Samplings (S)	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1		S2	S3
Lauryl sulfate broth triplex PCR	8 (50%) ¹	8 (33%)	33 (97%)	4 (17%)	23 (88%)	20 (91%)	1 (4%)	19 (76%)	32 (86%)	148 (64%)	
Growth on the four agar media ²	8 (70) ³	8 (131)	33 (495)	4 (42)	23 (326)	20 (270)	1 (14)	19 (294)	32 (504)	148 (2146)	
Colony triplex hybridization (CH) ⁴	3 (14) ⁵	3 (4)	13 (50)	3 (14)	13 (59)	12 (58)	1 (5)	8 (34)	21 (100)	77 (338)	
Colony triplex PCR ⁶	1 (9) ⁵	1 (2)	13 (42)	2 (10)	12 (51)	12 (52)	1 (3)	8 (34)	19 (91)	69 (294)	

¹ Number PCR-positive RAMS (% of RAMS tested). ² Only the PCR-positive broths were inoculated onto the four agar media. ³ Number RAMS with growing colonies (Number colonies picked up). ⁴ Only the growing colonies from the PCR-positive broths were tested via CH. ⁵ Number CH/PCR-positive RAMS (Number positive colonies). ⁶ Only the CH-positive colonies were tested via PCR.

3.2. CH- and PCR-Positive Colonies

Of the 2146 colonies studied, 721 were isolated on MC, 711 on ES, 233 on ESTe, and 481 on STECB media. Of these, 338 (16%) from 77 RAMS (52%) tested positive with the probes for the *eae*, *stx1*, and/or *stx2* genes (Table 1). Of these 338 CH-positive colonies, 294 (87%) from 69 RAMS (90%) were confirmed by the triplex PCR (Table 1). Seven of the eight RAMS with no confirmed PCR-positive colonies had only one or two CH-positive colonies. Some CH-positive PCR-negative colonies were also observed in 20 other RAMS. The CH and PCR results were in agreement for 257 PCR-positive colonies (87%).

In summary, 69 of the 148 PCR-positive RAMS (47%) and of the 233 collected RAMS (30%) harbored PCR-positive colonies. Those percentages in the three farms were 31% and 20% (FarmA), 55% and 37% (FarmB), and 54% and 32% (FarmC), respectively. The same respective percentages according to the sampling time were 31% and 6% (Sampling1), 42% and 28% (Sampling2), and 52% and 47% (Sampling3). However, the percentage of triplex PCR-positive RAMS increased differently with sampling in the three farms. In FarmA it increased only at Sampling3 (6%, 4%, 38%), in FarmB it increased at Sampling2 but stabilized at Sampling3 (9%, 46%, 55%), and in FarmC it increased consecutively from Sampling1 to Sampling2 and to Sampling3 (4%, 32%, 51%).

Seventeen RAMS harbored only one PCR-positive colony, while the remaining 52 RAMS harbored up to 15 PCR-positive colonies. Of the 11 PCR-positive RAMS from diarrheic calves, only one PCR-positive colony was isolated in FarmA at Sampling3.

3.3. Virulotypes of the PCR-Positive Colonies

The 294 PCR-positive colonies from 69 RAMS were identified as EPEC (131 isolates including the one from one diarrheic calf), AE-STEC (89 isolates), or STEC (74 isolates) (Table 2). EPEC were identified in 36 of the 69 RAMS with PCR-positive colonies (52%), AE-STEC in 23 RAMS (33%), and STEC in 27 RAMS (39%). Of the 52 RAMS with more than one PCR-positive colony, 4 RAMS from FarmA, 6 RAMS from FarmB, and 1 RAMS from FarmC harbored *E. coli* belonging to two different pathotypes, while 3 RAMS from FarmB and 1 RAMS from FarmC harbored *E. coli* belonging to three different pathotypes.

Table 2. Pathotypes and virulotypes of the triplex PCR-positive colonies according to the farms and sampling time.

Pathotypes		EPEC	AE-STEC ¹ (=EHEC)				STEC			PCR-Positive Colonies	
Virulotypes		<i>eae</i>	<i>eae, stx1</i>	<i>eae, stx2</i>	<i>eae, stx1, stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1, stx2</i>	Per Farm	Per Sampling	
FARMS	A	S1 ²	9 (1) ³	—	—	—	—	—	A: 53 (15)	1: 22 (4)	
		S2	— ⁴	—	2 (1)	—	—	—			
		S3	23 (9) ⁵	15 (4)	—	—	—	2 (2)			2 (2)
	B	S1	9 (1)	—	—	—	—	—	1 (1)	B: 113 (26)	2: 87 (21)
		S2	28 (10)	9 (4)	—	1 (1)	—	13 (3)	—		
		S3	29 (8)	—	1 (1)	5 (2)	5 (4)	12 (3)	—		
	C	S1	—	—	—	—	—	—	3 (1)	C: 128 (28)	3: 185 (44)
		S2	18 (3)	—	—	1 (1)	—	—	15 (4)		
		S3	15 (4)	9 (2)	8 (1)	38 (7)	—	—	21 (8)		
Total virulotypes		131 (36)	33 (10)	11 (3)	45 (11)	5 (4)	27 (8)	42 (16)	294 (69)		
Total pathotypes		131 (36)	89 (23) ⁶		74 (27) ⁶						

¹ AE-STEC = attaching–effacing Shigatoxigenic *Escherichia coli*. ² S = sampling. ³ Number *E. coli* isolates (Number RAMS). ⁴ Number positive colony detected. ⁵ Including one isolate from one diarrheic calf. ⁶ One RAMS harbored *E. coli* belonging to two different virulotypes.

The most frequent virulotype among colonies was *eae+* EPEC and the second one was *stx1+* *stx2+* STEC. The *eae+* *stx1+* and *eae+* *stx1+* *stx2+* virulotypes were the most frequent among AE-STEC, while the *eae+* *stx2+* AE-STEC and the *stx1+* STEC virulotypes were the least frequent (Table 2).

No calf in FarmA sampled either two or three times was positive more than once, while two calves in FarmB sampled twice were twice positive, three calves in FarmC sampled three times were positive twice (at the second and third samplings), and one calf in FarmC sampled three times was

positive at each sampling. The virulotypes were identical (*eae+* and *eae+ stx1+ stx2+*) in only the two calves in FarmB that were sampled twice.

3.4. O Serotypes of the PCR-Positive Colonies

Of the 294 PCR-positive colonies, 136 (46%) tested positive for 5 of the 10 serotypes searched for: O26, O103, O111, O145, or O157 (Table 3). The majority of AE-STECS (73%) tested positive for one of the five O serotypes detected vs. a minority of EPEC (23%) and almost half of STEC (45%). Similarly, a majority of RAMS harboring AE-STECS (83%) were positive for one of those five serotypes vs. half of the RAMS harboring EPEC (53%) or STEC (52%) (Table 3). Nevertheless, 65% of the RAMS with EPEC and/or (AE-)STECS harbored isolates not belonging to the “gang-of-seven” serotypes.

Table 3. O somatic serotypes identified among triplex PCR-positive colonies.

O Somatic Serotypes ¹	EPEC n = 131 (36) ²	AE-STECS ³ (=EHEC) n = 89 (23)			STEC n = 74 (27)			Total n = 294 (69)
	<i>eae</i> n = 131 (36)	<i>eae, stx1</i> n = 33 (10)	<i>eae, stx2</i> n = 11 (3)	<i>eae, stx1, stx2</i> n = 45 (11)	<i>stx1</i> n = 5 (4)	<i>stx2</i> n = 27 (8)	<i>stx1, stx2</i> n = 42 (16)	
O26	4 (3) ⁴	5 (2)	0	0	0	0	0	9 (4)
O103	4 (2)	7 (3)	0	0	0	0	0	11 (4)
O111	5 (4)	2 (2)	0	38 (8)	0	2 (2)	15 (6)	62 (18)
O145	21 (9)	6 (2)	4 (2)	1 (1)	0	4 (2)	7 (3)	43 (16)
O157	4 (1)	0	2 (1)	0	0	0	5 (1)	11 (3)
Total	38 (19)	20 (8)	6 (3)	39 (9)	0/5	6 (4)	27 (10)	136 (42)
	38 (19)		65 (19)			33 (14)		

¹ O5, O80, O118, O121, and O165 serotypes were not identified. ² Number PCR-positive *Escherichia coli* isolates (Number RAMS with PCR-positive colonies). ³ AE-STECS = attaching-effacing Shiga toxin-producing *E. coli*. ⁴ Number serotype-positive *E. coli* isolates (Number RAMS).

The most frequent were the O111 (62 colonies from 18 RAMS) and O145 (43 colonies from 16 RAMS) serotypes, while the O26, O103, and O157 serotypes were the least frequent. In 27 RAMS, all PCR-positive colonies, including the one from the diarrheic calf, tested negative with the PCR for the 10 searched-for serotypes. The identified serotypes were not equally distributed among the different virulotypes, but they were all identified only among *eae+* EPEC. Of the 52 RAMS with more than one PCR-positive colony, 34 (65%) harbored EPEC, AE-STECS, and/or STEC belonging to different serotypes, including unidentified ones.

The O26 serotype was identified only in FarmB, while the O157 and O103 serotypes were not detected in FarmB and FarmC, respectively (Table 4). The number of serotypes identified actually increased with sampling time: from two (O111 and O145) at Sampling1 to four at Sampling2 (O26, O111, O145, and O157) and all five at Sampling3 (O26, O103, O111, O145, and O157). Similarly, the number of RAMS with typeable isolates also increased with sampling time, more especially those positive for the O111 and O145 serotypes (Table 4).

Table 4. Distribution of the O somatic serotypes according to the farms and sampling times in the 42 RAMS with typeable colonies. The O5, O80, O118, O121, and O165 serotypes were not identified.

Sampling/Farm	A	B	C	Total
S1 ¹	O145 (1) ²	O111 (1)	O111 (1)	O111 (2), O145 (1)
S2	O157 (1)	O26 (3), O111 (2), O145 (2)	O111 (3), O145 (2)	O26 (3), O111 (5), O145 (4), O157 (1)
S3	O103 (3), O111 (4), O145 (3)	O26 (1), O103 (1), O145 (4)	O111 (7), O145 (4), O157 (2)	O26 (1), O103 (4), O111 (11), O145 (11), O157 (2)
TOTAL	O103 (3), O111 (4), O145 (4), O157 (1)	O26 (4), O103 (1), O111 (3), O145 (6)	O111 (11), O145 (6), O157 (2)	O26 (4), O103 (4), O111 (18), O145 (16), O157 (3)

¹ S = sampling. ² O serotype (Number positive RAMS).

These same two serotypes, O111 and O145, were identified along with other serotypes in the six calves sampled either two or three times in FarmB and FarmC. Nevertheless, only one of the two calves positive twice in FarmB had the same serotype (O111) identified at both samplings (all isolates were *eae+* *stx1+* *stx2+*), and the calf positive three times in FarmC had the same serotype (O111) identified at Sampling1 and Sampling3 but the virulotypes were not identical (*stx1+* *stx2+* and *eae+* *stx1+* *stx2+*).

3.5. Agar Media and PCR-Positive Colonies

The STECB medium gave the highest rate of PCR-positive colonies: 45% of the tested colonies growing on STECB were PCR-positive vs. 3–5% for the other three media. The highest rate of RAMS with PCR-positive colonies was also obtained with the STECB medium (Table 5): 54% vs. 8–12% for the other three media. Similarly, 73% of the 294 PCR-positive colonies and 84% of the 69 RAMS with PCR-positive colonies were obtained with the STECB medium, vs. 2–13% and 7–25% for the other three media, respectively. Of the 52 RAMS with more than one PCR-positive colony, 13 were positive on two agar media, 4 on three agar media, and 2 on all four agar media. Besides the selective properties of ESTe and STECB, there was no correlation between the agar medium and the identified virulotypes.

Table 5. Pathotypes and virulotypes of the triplex PCR-positive colonies according to the agar media.

Pathotypes	EPEC	AE-STE ² (=EHEC)			STEC			Total PCR-Positive Colonies (%)	Total RAMS with PCR-Positive Colonies (%)	
		<i>eae</i>	<i>eae</i> , <i>stx1</i>	<i>eae</i> , <i>stx2</i>	<i>eae</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>			<i>stx1</i> , <i>stx2</i>
Agar media ¹	MC	11 (5) ³	2 (1)	3 (1)	6 (2)	2 (2)	12 (5)	1 (1)	37 (5%)	16 (11%)
	ES	12 (5)	2 (1)	0	0	3 (2)	14 (6)	3 (3)	33 (5%)	17 (12%)
	ESTe	5 (4)	1 (1)	0	1 (1)	0	0	0	7 (3%)	5 (8%)
	STECB	103 (30) ⁴	28 (10)	8 (3)	38 (11)	0	1 (1)	38 (12)	216 (45%)	58 (54%)
Total virulotypes	131 (36)	33 (10)	11 (3)	45 (11)	5 (4)	27 (8)	42 (16)	294 (14%)	69 (45%)	
Total pathotypes	131 (36)	89 (23)			74 (27)					

¹ MC = McConkey's; ES = Chromocult Coliform ES; ESTe = Chromocult Coliform ES supplemented with TeK; STECB = supplemented CHROMagarTM STEC base. ² AE-STE² = attaching–effacing Shigatoxigenic *Escherichia coli*.

³ Number PCR-positive *E. coli* isolates (Number RAMS with PCR-positive *E. coli* isolates). ⁴ Including one isolate from one diarrheic calf.

4. Discussion

Using RAMS, <6-month-old dairy calves from three farms in Belgium were identified as healthy carriers not only of (AE-)STEC serotypes but also of EPEC. Although the populations were different (dairy calves and beef cattle), as are the regions in Belgium (Flanders and Wallonia), more calves in farms compared to adult cattle at slaughterhouses harbored one “gang-of-seven” serotype (61% vs. 19%) and more “gang-of-seven” serotypes (O26, O103, O111, O145, and O157 vs. O26, O103, and O157) were detected during this study than during the study by Thiry and collaborators [17]. Such a higher prevalence of “gang-of-seven” serotypes in young calves has already been reported during different surveys in Australia and New Zealand in dairy, beef, or veal calves compared to adult animals sampled at slaughterhouses [9,10,25].

Nevertheless, the identified serotypes were not evenly distributed in the three farms at the three samplings (Table 4). For instance, the O26 serotype was identified only in FarmB, while the O157 and O103 serotypes were not detected in FarmB and FarmC, respectively. These five serotypes were also not evenly distributed between the pathotypes and virulotypes (Table 3). For instance, the O26 and O103 serotypes were detected only among *eae+* EPEC and *eae+* *stx1+* AE-STE². In addition, more RAMS harboring AE-STE² isolates (83%) were positive for one of those five serotypes compared to STEC (52%) and EPEC (53%) (Table 3). These latter results are similar to those in diarrheic calves but different from those in healthy cattle in Belgium [13,17].

Conversely, the other three serotypes that were looked for in this study (O5, O80, and O118) were not identified, confirming previous findings in Belgium [17,26] and in Europe in general [4] that they

are absent, or very rare, in asymptomatic calves and adult cattle. This situation is quite different from the situation in young diarrheic calves that can be infected with O5, O118, and O80, in addition to O26 and O111 AE-STECS and EPEC [12–14,16]. Their absence could mean that these O serotypes are present in very low numbers, under the detection level, in healthy calves and adult cattle or that the sampling was not appropriate: recto-anal junction and large intestinal content instead of small intestine in diarrheic calves.

Of the 69 RAMS (30% of all RAMS) with triplex PCR-positive colonies (Table 1), 36 RAMS (15%) harbored EPEC, 23 RAMS AE-STECS (EHEC) (10%), and 27 RAMS (12%) STECS. The *eae+* EPEC was the most frequent virulotype, while the *eae+ stx1+ stx2+* virulotype was the most frequent among AE-STECS and the *stx1+ stx2+* among STECS. Moreover, 15 RAMS (6%) harbored *E. coli* belonging to more than one virulotype, a situation previously reported in Belgium [27]. These results are to some extent different from those obtained during the study in two slaughterhouses in Belgium [17]. For instance, although the percentage of colon samples harboring triplex PCR-positive colonies was similar (25%), more of the colon samples harbored *E. coli* belonging to different virulotypes (15%). Moreover, though the *eae+* EPEC was the most frequently identified virulotype in both surveys, the most frequent AE-STECS and STECS virulotypes were different: *eae+ stx1+* and *stx2+*.

Differences in the percentage of RAMS positive for the presence of EPEC, AE-STECS, or STECS were observed between farms and between samplings. This percentage was much lower in FarmA (20%) than in Farm B (37%) and FarmC (32%) and at Sampling1 (6%) than at Sampling2 (28%) and Sampling3 (47%). The distributions of pathotypes were also different according to the farms and to the samplings (Table 2). A majority of RAMS were positive for EPEC in FarmA and FarmB and for STECS in FarmC, while a minority of RAMS were positive for AE-STECS in FarmB and for EPEC in FarmC. Not enough RAMS were positive at Sampling1 for a detailed analysis, but the percentage of EPEC-positive RAMS decreased from Sampling2 to Sampling3, while the percentage of STECS-positive RAMS increased and the percentage of AE-STECS-positive remained stable. Several hypotheses may explain such differences between farms and samplings. Were the STECS and EPEC present in such low numbers in FarmA that testing only five colonies per agar medium was not enough? Was FarmA less contaminated with STECS and EPEC? Or were the *stx* genes more unstable in vivo or in vitro in the *E. coli* isolates of FarmA? Similarly, the reason for the increase in RAMS with PCR-confirmed colonies according to the sampling in the three farms (though at different rates) can only be hypothesized, e.g., by the introduction of new asymptomatic carriers and/or by an increase in the shedding of STECS and EPEC in the feces of young or adult animals following some stress. The spread of one (AE-)STECS or EPEC serotype within a farm has been observed as soon as one calf becomes a super-shedder, and the numbers of shedders increase with the number of calves and with their age [11]. Another hypothesis would be the occurrence of EPEC- or AE-STECS-associated diarrhea in some of these young calves. However, this last hypothesis has a very low probability since only one of the 11 diarrheic calves sampled excreted EPEC and no (AE-)STECS.

Besides their prevalence, the second purpose of this study was to follow the persistence of the different virulotypes and serotypes in the same calves. The results confirm not only that one negative calf can become a shedder a few weeks later, probably after being contaminated by another shedder, but also that EPEC, AE-STECS, and STECS belonging to different virulotypes and serotypes can be excreted at different times by one single calf, illustrating possible multiple contamination events. These results are similar to those obtained by Rice and collaborators [18] who could differentiate between cattle colonized by and cattle transiently shedding O157:H7 *E. coli* using RAMS. Therefore, more than one sampling over a period of several weeks should be recommended when performing a survey in any farm.

Although fewer healthy dairy calves in those three farms compared to adult cattle in slaughterhouses in Belgium harbored “non-gang-of-seven” serotypes (65% vs. 97%) and although the identification of their actual serotypes will be the purpose of future studies, the question in surveys is the same as previously [17]: how to isolate and identify them. Indeed, so far, the selective methodologies

have targeted only the “gang-of-seven” serotypes. The results of this study were obtained using a first enterobacteria enrichment step followed by growth on four (semi-)selective agar media. MC and ES are selective for enterobacteria and coliforms in general, respectively. ESTe and STECB are selective for tellurite-resistant coliforms, including most, if not all, “gang-of-seven” and several “non-gang-of-seven” (AE-)STEC and EPEC, in opposition to the majority of non-STEC, non-EPEC strains [28,29]. This selective property is reflected by the lower number of RAMS with colonies growing on ESTe and STECB (63 and 107 out of 148, respectively) (Table 5). STECB had the highest performance during this study with a similar rate to that in the previous study [17]. While MC and ES also had a similar efficiency in both studies, the situation was highly different for ESTe (7% of RAMS vs. 53% of colon content). The reason for the lower efficiency of ESTe in this study is unknown.

The choice between a serotype-selective and a non-selective procedure depends on the actual purpose of the study, e.g., whether to study the distribution and circulation of some “gang-of-seven” serotypes or of all EPEC and (AE-)STEC in one farm or one region. This is most important since prevalence and incidence results can differ according to the procedure. For instance, using a serotype-selective procedure on the same RAMS [20], O157 EPEC and (AE-)STEC were detected in FarmA and in FarmC at more sampling times than in this study and O26 EPEC and (AE-)STEC were detected not only in FarmB as in this study but also in FarmA and FarmC.

The final question is the actual place of the EPEC belonging to the same serotypes as AE-STEC. So far, to the best of our knowledge, no classical genetic method has been able to fully distinguish between true EPEC and AE-STEC having lost the *stx* genes [23,30,31]. Recently, however, we performed a phylogenetic analysis of ca. 50 AE-STEC and EPEC O80:H2 isolated from humans and calves, based on single nucleotide polymorphisms (SNPs), and constructed a maximum likelihood (ML) tree that could distinguish between true EPEC and AE-STEC suspected of having lost the *stx* genes [14]. This may also represent a possibility for analyzing other serotypes containing both AE-STEC and EPEC [1–4,12,15,19,32,33].

5. Conclusions

The results of this survey confirm (i) that, besides suffering diarrhea from AE-STEC and EPEC [12–16], healthy young calves in farms in Belgium can also be asymptomatic carriers of (AE-)STEC and EPEC, at least at the same rate as adult cattle, and (ii) that several (AE-)STEC and EPEC belong to several other O serotypes that are so far unidentified and, thus, are not considered in most surveys.

Author Contributions: Conceptualization, B.D., L.D.Z., E.C., and J.M.; methodology, A.H., F.E., J.-N.D., and D.T.; investigation, A.H., F.E., and J.-N.D.; writing—original draft preparation, A.H. and J.M.; writing—review and editing, F.E., B.D., M.H., L.D.Z., D.T., and E.C.; supervision, E.C. and J.M.; project administration, E.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Belgian “Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment” (VTEFFECT Grant; RT16/1).

Acknowledgments: The authors thank Rudy Cooman and Anneleen Mertens (UGent) for their assistance in animal sampling and the Belgian dairy cattle farmers who kindly participated in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tozzoli, R.; Scheutz, F. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. In *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*; Morabito, S., Ed.; Horizon Scientific Press and Caister Academic Press: Norwich, UK, 2014; pp. 1–18; ISBN 978-1-908230-37-9.
2. Beutin, L.; Fach, P. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*; Sperandio, V., Hovde, C.J., Eds.; ASM Press: Norwich, UK; Washington, DC, USA, 2015; pp. 263–295; ISBN 978-1-555581-878-4.

3. Stevens, M.P.; Frankel, G.M. The locus of enterocyte effacement and other associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*; Sperandio, V., Hovde, C.J., Eds.; ASM Press: Norwich, UK; Washington, DC, USA, 2015; pp. 97–130; ISBN 978-1-555581-878-4.
4. EFSA; ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union One Health 2018 zoonoses report. *EFSA J.* **2019**, *17*, e05926.
5. Piérard, D.; De Greve, H.; Haesebrouck, F.; Mainil, J.G. O157:H7 and O104:H4 Verotoxin-producing *Escherichia coli*: Respective role of cattle and humans. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 13. [[CrossRef](#)]
6. Naylor, S.W.; Low, J.C.; Besser, T.E.; Mahajan, A.; Gunn, G.J.; Pearce, M.C.; McKendrick, I.J.; Smith, D.G.E.; Gally, D.L. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 150–1512. [[CrossRef](#)]
7. Kudva, I.T.; Hovde, C.J.; John, M. Adherence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine recto-anal junction squamous epithelial cells appears to be mediated by mechanisms distinct from those used by O157. *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 375–381. [[CrossRef](#)]
8. Persad, A.K.; Lejeune, J.T. Animal reservoirs of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*; Sperandio, V., Hovde, C.J., Eds.; ASM Press: Norwich, UK; Washington, DC, USA, 2015; pp. 211–230; ISBN 978-1-555581-878-4.
9. Cobbold, R.; Desmarchelier, P. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet. Microbiol.* **2000**, *71*, 125–137. [[CrossRef](#)]
10. Mellor, G.E.; Fegan, N.; Duffy, L.L.; McMillan, K.E.; Jordan, D.; Barlow, R.S. National survey of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in Australian beef cattle feces. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 1868–1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Browne, A.S.; Midwinter, A.C.; Withers, H.; Cookson, A.L.; Biggs, P.J.; Marshall, J.C.; Benschop, J.; Hathaway, S.; Haack, N.A.; Akhter, R.N.; et al. Molecular epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on New-Zealand dairy farms: Application of a culture-independent assay and whole-genome sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e00481-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mainil, J.G.; Fairbrother, J.M. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*; Morabito, S., Ed.; Horizon Scientific Press and Caister Academic Press: Norwich, UK, 2014; pp. 19–43; ISBN 978-1-908230-37-9.
13. Fakih, I.; Thiry, D.; Duprez, J.N.; Saulmont, M.; Iguchi, A.; Piérard, D.; Jouant, L.; Daube, G.; Ogura, Y.; Hayashi, T.; et al. Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. *Vet. Microbiol.* **2017**, *202*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Habets, A.; Crombé, F.; Nakamura, K.; Guérin, V.; De Rauw, K.; Piérard, D.; Saulmont, M.; Hayashi, T.; Mainil, J.G.; Thiry, D. Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 from diarrheic and septicemic calves and relatedness to human Shigatoxigenic *E. coli* O80:H2. *J. Appl. Microbiol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Moxley, R.A.; Smith, D.R. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2010**, *26*, 29–56. [[CrossRef](#)]
16. Thiry, D.; Saulmont, M.; Takaki, S.; De Rauw, K.; Duprez, J.N.; Iguchi, A.; Piérard, D.; Mainil, J.G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 in young calves with diarrhea, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2093–2095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Thiry, D.; De Rauw, K.; Takaki, S.; Duprez, J.N.; Iguchi, A.; Piérard, D.; Korsak, N.; Mainil, J.G. Low prevalence of the “gang of seven” and absence of the O80:H2 serotypes among Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in intestinal contents of healthy cattle at two slaughterhouses in Belgium in 2014. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 867–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rice, D.H.; Sheng, H.Q.; Wynia, S.A.; Hovde, C.J. Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4924–4929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. McCabe, E.; Burgess, C.M.; Lawal, D.; Whyte, P.; Duffy, G. An investigation of shedding and super-shedding of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and *E. coli* O26 in cattle presented for slaughter in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Health* **2019**, *66*, 83–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Engelen, F.; Thiry, D.; Devleeschauwer, B.; Heyndrickx, M.; Mainil, J.; De Zutter, L.; Cox, E. *Escherichia coli* O157 and O26 in young Belgian dairy calves by recto-anal mucosal swab culturing. *J. Appl. Microbiol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Iguchi, A.; Iyoda, S.; Seto, K.; Morita-Ishihara, T.; Scheutz, F.; Ohnishi, M. The Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: A comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2427–2432. [[CrossRef](#)]
22. Zadik, P.M.; Chapman, P.A.; Siddons, C.A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* **1993**, *39*, 155–158. [[CrossRef](#)]
23. Szalo, I.M.; Goffaux, F.; Pirson, V.; Piérard, D.; Ball, H.; Mainil, J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes coding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res. Microbiol.* **2002**, *153*, 653–658. [[CrossRef](#)]
24. Mainil, J.G.; Bardiau, M.; Ooka, T.; Ogura, Y.; Murase, K.; Etoh, Y.; Ichibara, S.; Horikawa, K.; Buvens, G.; Piérard, D.; et al. IS621-based multiplex PCR printing method of O26 enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 773–786. [[CrossRef](#)]
25. Jaros, P.; Cookson, A.L.; Reynolds, A.; Prattley, D.J.; Campbell, D.M.; Hathaway, S.; French, N.P. Nationwide prevalence and risk factors for faecal carriage of *Escherichia coli* O157 and O26 in very young calves and adult cattle at slaughter in New Zealand. *Epidemiol. Infect.* **2016**, *144*, 1736–1747. [[CrossRef](#)]
26. Pohl, P.; Cleenwerck, I.; Imberechts, H.; Jacquemin, E.; Marin, M.; China, B.; Mainil, J. Différences entre les pathotypes et les sérogroupes des *Escherichia coli* vérotoxino-gènes isolées de veaux sains et celles isolées de veaux souffrant de diarrhée. *Ann. Méd. Vét.* **1997**, *141*, 155–159.
27. Pohl, P.; Daube, G.; Lintermans, P.; Imberechts, H.; Kaackenbeeck, A.; Mainil, J. Infection multiple des veaux par *Escherichia coli* vérotoxino-gènes (VTEC). *Ann. Méd. Vét.* **1992**, *136*, 259–262.
28. Mainil, J.; Daube, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: Who's who? *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *98*, 1332–1344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Verhaegen, B.; De Reu, K.; Heyndrickx, M.; De Zutter, L. Comparison of six chromogenic agar media for the isolation of a broad variety of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serogroups. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 6965–6978. [[CrossRef](#)]
30. Bardiau, M.; Labruzzo, S.; Mainil, J.G. Putative adhesins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serogroup O26 isolated from humans and cattle. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 2090–2096. [[CrossRef](#)]
31. Bugarel, M.; Beutin, L.; Scheutz, F.; Loukiadis, E.; Fach, P. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2275–2281. [[CrossRef](#)]
32. Soysal, N.; Mariani-Kurkdjian, P.; Smail, Y.; Liguori, S.; Gouali, M.; Loukiadis, E.; Fach, P.; Bruyand, M.; Blanco, J.; Bidet, P.; et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hybrid pathotype O80:H2 as a new therapeutic challenge. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1604–1612. [[CrossRef](#)]
33. Ogura, Y.; Gotoh, Y.; Itoh, T.; Sato, M.; Seto, K.; Yoshino, S.; Isobe, J.; Etoh, Y.; Kurogi, M.; Kimata, K.; et al. The population structure of *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple lineages. *Microb. Genomes* **2017**, *3*. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Section expérimentale

Etude 3 :

Transduction du gène de la toxine de Shiga médiée par un
bactériophage Stx2d à partir d'une souche STEC O80:H2

Préambule

Le sérotype AE-STEC et EPEC O80:H2 étant présent chez des veaux diarrhéiques/septicémiques mais absent chez les veaux sains, il est intéressant d'étudier l'évolution de ces souches EPEC et AE-STEC. La comparaison des génomes a montré que les EPEC bovines O80:H2 sont proches des STEC humaines O80:H2 du CNR STEC humaines de Belgique, mais ne renferment ni les gènes *stx*, ni les phages STX (De Rauw et al., 2019). Il est donc possible que les souches EPEC bovines soient des souches AE-STEC ayant perdu les phages Stx et les gènes *stx* ou bien représentent des précurseurs de souches AE-STEC qui ont acquis les phages Stx et les gènes *stx* par la suite (Munesia et al., 2014).

Les gènes codant pour la plupart des toxines Stx1 et Stx2 sont localisés sur des bactériophages lambdaïdes (*Caudovirus*) intégrés dans le chromosome bactérien (phages STX) qui peuvent être perdus ou acquis *in vivo* ou *in vitro* suite à une recombinaison site-spécifique. D'autres souches pathogènes d'*E. coli* que des EPEC peuvent acquérir des phages Stx. Par exemple, la souche STEC entéro-agrégative hybride (Agg-STEC) O104:H4 responsable de l'épidémie allemande de 2011 proviendrait du transfert du phage Stx à partir d'une souche STEC (Piérard et al., 2012). Les études d'acquisition et de stabilité des phages Stx sont très importantes en termes de santé publique.

Le premier objectif de cette étude a été d'isoler et de caractériser le phage Stx2d d'une souche STEC O80:H2 puis d'étudier la transduction du gène *stx2d* provenant de ce phage dans des souches non-STEC. Le second objectif a été d'évaluer la virulence de ces souches transduites dans un modèle de larves de *Galleria mellonella*.

Le phage Stx2d fait partie de la classe des *Caudoviricetes*, il est stable et peut résister à des conditions étendues de pH (pH 2-8) et de température (45°C) modérées, son génome possède de nombreuses protéines intervenant dans le cycle lysogénique.

Les résultats de cette étude ont permis d'affirmer que les gènes *stx2d* peuvent être transduits à des souches non-STEC et contribuer à leur virulence dans le modèle des larves de *Galleria mellonella*.

Phage-mediated Shiga-toxin (Stx2d) gene transduction from O80:H2
Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) to non-STEC strains and *in vivo*
virulence assessment

Submitted

Audrey Habets¹, Céline Antoine¹, Jeroen Wagemans², Marjorie Vermeersch³, Fanny
Laforêt¹, Jacob Diederich¹, Rob Lavigne², Jacques Mainil¹, Damien Thiry¹

Phage-mediated Shiga-toxin (Stx2d) gene transduction from O80:H2 Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) to non-STEC strains and *in vivo* virulence assessment.

Audrey Habets¹, Céline Antoine¹, Jeroen Wagemans², Marjorie Vermeersch³, Fanny Laforêt¹, Jacob Diderich¹, Rob Lavigne², Jacques Mainil¹, Damien Thiry^{1*}

¹Bacteriology, Department of Parasitic and Infectious Diseases, FARAH, ULiège, Liège, 4000, Belgium; audrey.habets@uliege.be (A.H.); celine.antoine@uliege.be (C.A.); fanny.laforet@uliege.be (F.L.); jacob.diderich@uliege.be (J.D.); jg.mainil@uliege.be (J.M.)

²Department of Biosystems, Laboratory of Gene Technology, KU Leuven, Leuven, 3000, Belgium; Jeroen.wagemans@kuleuven.be (J.W.); rob.lavigne@kuleuven.be (R.L.)

³Center for Microscopy and Molecular Imaging, Electron microscopy laboratory, Gosselies, ULB, 6041, Belgium; Marjorie.vermeersch@ulb.be (M.V.)

*Damien.thiry@uliege.be (D.T.); Tel.: +32-4366-9522

Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are major foodborne pathogens that cause human diseases ranging from diarrhea to life-threatening complications including hemolytic–uremic syndrome. Virulence of STEC strains and their ability to cause severe diseases are associated with the activity of prophage-encoded Shiga toxins (Stxs). The first objective of this work was to isolate and characterize the Stx2d phage from STEC O80:H2 and to study the transfer of this phage in non-STEC strains. The second objective was to assess the survival of *Galleria mellonella* larvae inoculated with these transduced strains. Firstly, one bacteriophage isolated from a STEC O80:H2 strain was used to infect six non-STEC strains, resulting in the conversion of three strains. Then, stability assays were performed, showing that this phage was stable in the new STEC strains after three successive subculturing steps, as confirmed by a combination of short and long read genome sequencing approaches. This phage, vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d, is resistant to moderate temperature and pH. It belongs to a currently unclassified genus and family within the *Caudoviricetes* class, shares 98% identity with Stx2_112808 phage and encodes several proteins involved in the lysogenic cycle. The *yecE* gene was identified as the insertion site. Finally, *Galleria mellonella* experiments showed that the convertant strains caused significantly higher mortality rates than the corresponding non-STEC strains. In conclusion, this study showed that *stx2d* gene from O80:H2 *E. coli* can be transferred to non-STEC strains and contributes to their virulence.

1. Introduction

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) are notorious foodborne pathogens that cause several human diseases, such as diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS) [1]. Shiga toxin (Stx), encoded by Stx-converting bacteriophages (Stx phages), is one of the primary virulence factors of STEC strains and can exhibit cytotoxicity to various target cells [2,3]. Stx toxins belong to two families (Stx1 and Stx2). Each of these types are further divided into subtypes, three for Stx1 (Stx1a, Stx1c and Stx1d) and at least seven for Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f and Stx2g) [4], although new Stx2 subtypes are regularly described, including Stx2h to m [5]. The *stx1* and *stx2* genes which encode these toxins are contained within temperate bacteriophage genomes of the former *Podoviridae*, *Myoviridae* or *Siphoviridae* families [3], integrated as prophages within the bacterial chromosome. The Stx phages' ability to excise themselves and infect other hosts, e.g. in the gastrointestinal tract, makes them important drivers of horizontal gene transfer (HGT) of *stx* genes among *E. coli* serotypes and other *Enterobacteriaceae*. This ability to quickly gain, lose or exchange genes through Stx phages impacts the pathogenicity profile and evolution of STEC strains. Integrated *stx* genes either remain silent within the lysogens [6] or are expressed at low levels following infection with a Stx-converting phage.

STEC can be exposed to various stresses, including heat, mitomycin C, and UV, leading to a bacterial SOS response. This response is characterized by the excision of the prophage DNA from the host chromosome and the initiation of the lytic cycle [7]. This results in host cell lysis and the release of phage particles that can transduce the *stx* genes to other bacteria [8, 9, 10].

Nine Stx phage insertion sites have been described to date, including *wrbA*, which encodes for a tryptophan repressor-binding protein [11], *yehV* encoding a transcriptional regulator [12] and *yecE*, whose function is unknown [13].

Evidence suggests that STEC O157:H7 is responsible for numerous outbreaks and has evolved from an EPEC O55:H7 strain by acquisition of Stx2c phage followed by multiple introductions of Stx2a and Stx1a phages [14]. Other studies have shown that the enteroaggregative STEC strain (EAEC) O104:H4, responsible for the German epidemic in 2011, was driven by the Stx phage transfer from a STEC strain [15]. Stx phage transfers have also been demonstrated *in vitro* and *in vivo* for specific classic serotypes, such as O26:H11, after extraction of the phage from the donor bacterium [9, 16]. Over the last ten years, a novel serotype of STEC, O80:H2, has emerged as a cause of STEC-HUS [17]. This serotype has been isolated from patients with STEC-HUS presenting multi-organ failure, and extensive thrombotic microangiopathy [18]. STEC O80:H2 has been described as a hybrid pathotype that combines the diarrhoeagenic *E. coli* virulence factors (VFs) Stx, Eae (intimin) and EhxA (enterohaemolysin), with extra-intestinal VFs [19].

Initially described in France [20], serotype O80:H2 emerged in the 2010s to become one of the three leading serotypes involved in HUS cases [21]. Moreover, this serogroup has also been isolated from cattle in Spain [22], humans and cattle in Belgium [23-25], human in Switzerland [26] and the Netherlands [18]. It now represents the third most frequent serotype isolated from HUS cases in Europe, responsible for 9% of European HUS in 2019 [27].

It has been hypothesized that EPEC O80 is ancestor of STEC O80 [28]. According to this hypothesis, the acquisition of *stx2* by EPEC O80 gave rise to globally distributed toxigenic STEC O80. Historically, epidemiological studies have focused on *stx2*-harboring strains because they are typically associated with more severe clinical outcomes [29-30].

A recent study highlighted the circulation of EPEC strains of the same serotype in diarrheic calves [25]. Genomic analysis showed that the bovine O80:H2 EPEC are closely associated to human O80:H2 STEC but contain neither the *stx* genes nor the Stx phages. It is therefore possible that the bovine EPEC strains were AE-STECS that lost the Stx phage or represent precursors of AE-STECS which have acquired the Stx phage.

The objective of this work was to isolate and characterize the Stx2d phage from STEC O80:H2, to study the STX phage transfer in non-STECS strains and to assess the virulence of the newly converted strains *in vivo* in a *Galleria mellonella* larvae model.

2. Results

2.1. Isolation, host range analysis of Stx2d phages and horizontal transfer of *stx2d* gene from O80:H2 *E. coli* to non-pathogenic *E. coli*

Three temperate phages were induced and isolated from three bovine O80:H2 STEC strains by UV radiation. Lysis plaque formation was analyzed to assess the ability of Stx2d phages to infect a range of host strains (Table 1). The host range analysis showed that the three Stx2d phages isolated from O80:H2 donor strains EH3155, EH3160 and EH3320 produced plaque lysis on strains K12-MG1655, K12-DH5 α , O80:H26 and O80:H2.

The three phages were used to transduce these four positively lysed strains. Three transduced strains (K12-MG1655, K12-DH5a, O80:H26) were confirmed by PCR targeting the *stx2d* gene. A stability study indicated that the phage isolated from the strain EH3320 was stable in the new STEC strains after three successive subculturing steps unlike the other two others (EH3155 and EH3160). This phage was therefore selected for further analysis.

2.2. Genome-based characterization of vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d confirms this phage as a temperate lambda-like virus

This Stx2d phage was analysed by whole genome sequencing, revealing a dsDNA genome of 40,147 bp (Figure 1). The phage was named according to the standardized phage nomenclature vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d, belongs to the *Caudoviricetes* class and a yet unclassified family and genus (Supplementary Figure 1). The closest similar virus is phage Stx2_112808 (LC567830.1, 88% query coverage, 98.03% sequence identity) and vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d shares >95% identity with seven other phages according to BLASTn analysis. Homology detection by BLASTp and structure prediction by HHpred analysis [31] revealed that the two phages encode several lysogeny associated proteins including an integrase (Int), excisionase (Xis) and different repressors like CI, CII and the antirepressor Cro involved in maintaining the lysogenic cycle. Comparison of phage genomes are shown in Figure 1. The “stx region,” defined as the phage’s genome region encompassed by the genes Q and S and containing the Stx-coding genes was localized. Noteworthy, the presence of nanS-p gene exclusively in the “stx region” of the phage identified (Figure 1). Sequencing was submitted to NCBI GenBank under accession number ON416862.

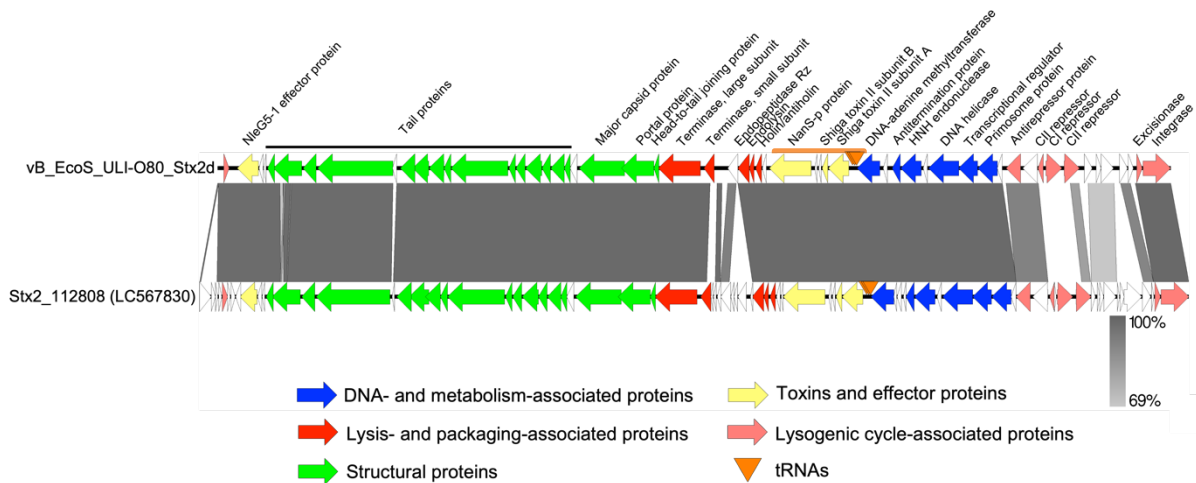


Figure 1. Comparative genomics of phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d and Stx2_112808. Each arrow represents a coding sequence. In red, genes coding packaging and lysis-associated proteins are displayed; in green, structural proteins; in blue, DNA and metabolism-associated proteins; in pink, lysogenic-associated proteins. The *stx* region is highlighted in a box with toxins and effectors proteins like the two Shiga toxin II subunit A and B and the the *nanS-p* gene represented in yellow.

2.3. Bacteriophage characterization

The phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d isolated from the EH3320 strain was first characterized for its pH and temperature stability. This one remained stable (<1 ge/mL) at temperatures of 25°C, 37°C and 45°C. At 60°C, the phage showed a 1 ge/mL reduction (Figure 2a). Concerning the pH stability, the phage remained stable between pH 2 and pH 8 and began to decrease with 1 ge/mL at pH 10 and 2 ge/mL at pH 12 (Figure 2b). This phage presented resistance to moderate temperature (45°C) and a broad pH spectrum (2-8).

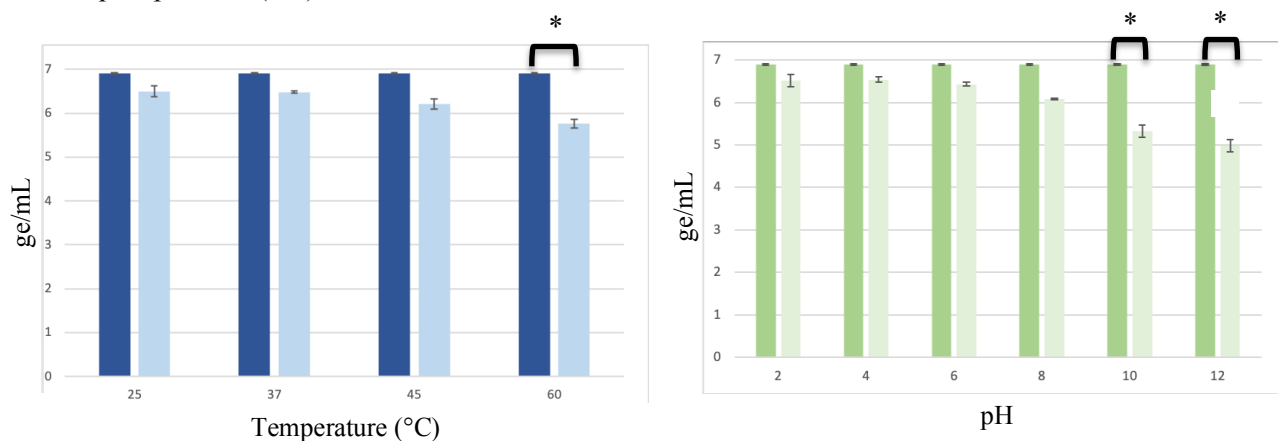


Figure 2. a) Temperature **b)** pH stability results of phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d after 1h. The means of three experiments ($\pm\sigma$) are represented and the concentrations measured before testing are represented by the dark bars. p-value (*) ≤ 0.05 . ge = genomic copies

The vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d morphology was also characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM). This phage presented an icosahedral symmetric non-enveloped head, with a diameter of approximately 60 nm, and a non-contractile and flexible tail of approximately 245 nm in length corresponding to a siphovirus morphology (Figure 3).

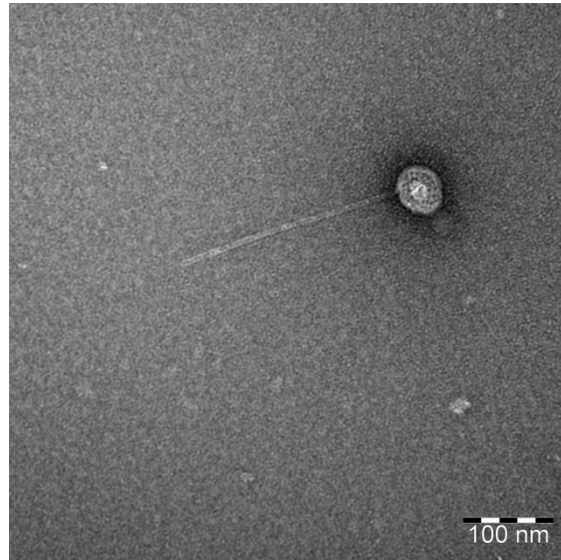


Figure 3. Negative staining transmission electron microscopic image of the phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d.

2.4. Insertion sites of the phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d

Bacterial genomic analyses were performed in order to highlight the presence and the type of insertion sites. The identified insertion site of vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d into the chromosome of the three transduced strains was the same than withing the donor strains: the *yecE* gene (Figure 4).

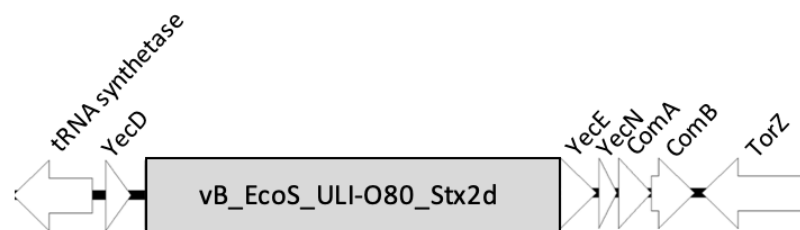


Figure 4. Insertion site *yecE* of the three convertant strains. tRNA synthetase: Aspartyl-tRNA synthetase, YecD: isochorismatase-family protein, YecN: Inner membrane protein YecN, ComA: Carboxy-S-adenosyl-L-methionine synthase, ComB: tRNA ho5U(34) carboxymethyltransferase, TorZ: Trimethylamine-N-oxide reductase

2.5. Assessing the *in vivo* virulence properties of the prophage in the *Galleria mellonella* larvae model

To assess the virulence of the *stx2d* gene, *G. mellonella* larvae were inoculated with transduced and host bacterial strains. The optimal inoculation dose for the strain EH3320 causing a lethality between 90-100% after four days was 10^5 CFU/10 μ L. The larvae survival rates were lower in the infected groups compared to the PBS control group (0–60% vs. 90% of survival at 96 hours post infection (HPI)) (Figure 5a). The non-converted strain K12-DH5 α showed a larvae mortality <10% for all concentrations, whereas converted K12-DH5 α strain showed a larvae mortality of 60-70% in 10^5 CFU/10 μ L after four days and of 90% at 10^6 CFU/10 μ L after one day (Figure 5b). For the non-converted K12-MG1655 strain, the larvae mortality was also below 10% for all concentrations, whereas the converted strain showed a larvae mortality rate of 90-100% after four days at 10^5 CFU/10 μ L and of 90-100% after one day at 10^6 CFU/10 μ L (Figure 5c). The converted O80:H26 strain showed a larvae mortality of 100% after 2 days (Figure 5d).

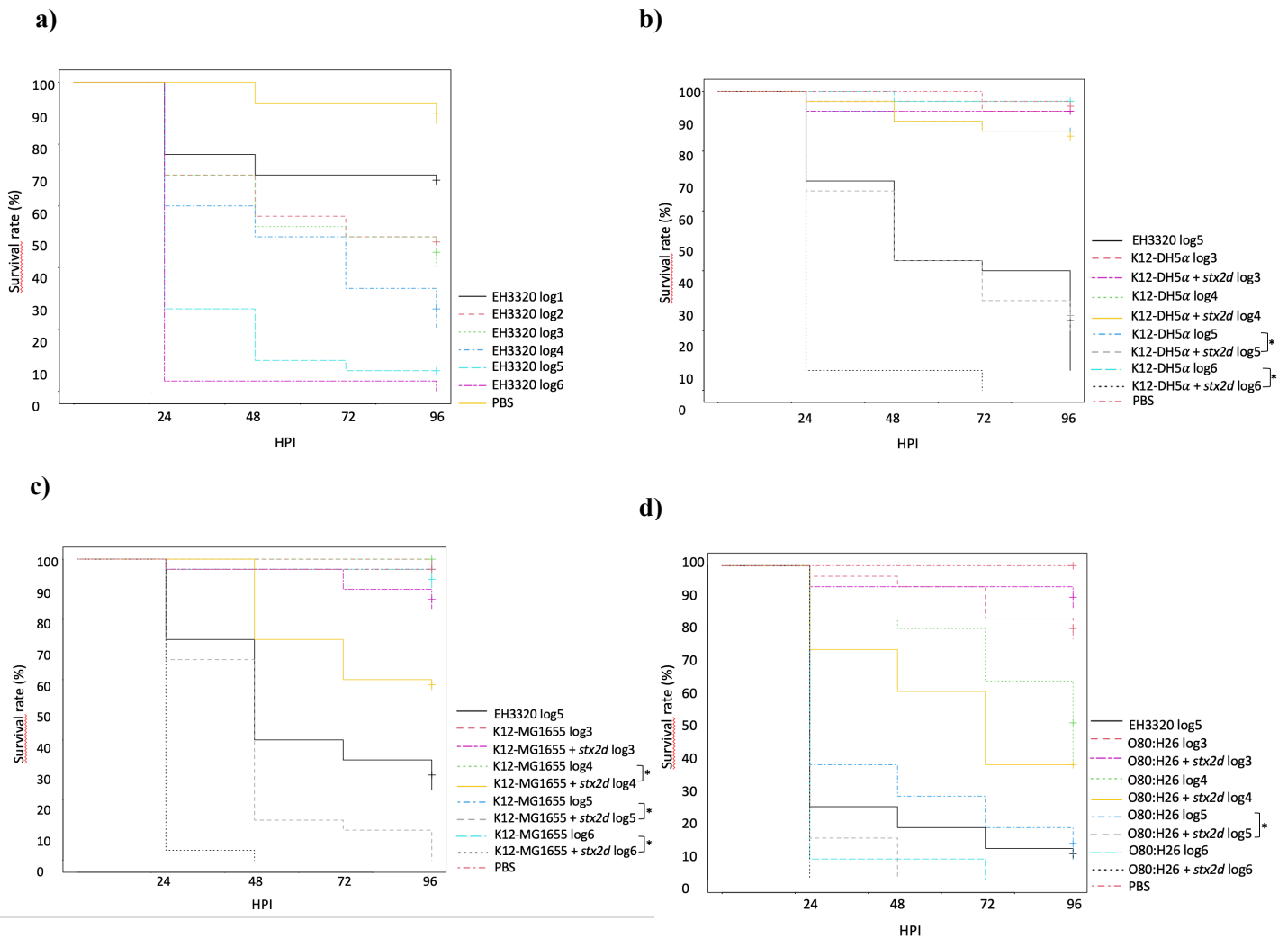


Figure 5: Kaplan-Meier survival curves of the experiments with *G. mellonella* larvae inoculated with **a)** EH3320 at different concentrations **b)** K12-DH5α with or without vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d **c)** K12-MG1655 with or without vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d **d)** O80:H26 with or without vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d. Each group contained 30 larvae separated in three groups of 10 larvae. HPI: hours post inoculation. * p<0,05

3. Discussion

Lysogenic phage conversion constitutes an efficient mechanism for rapid dissemination of phage-encoded virulence genes [32]. While *in vitro* phage-mediated transmission of the *stx2* gene between different laboratory bacterial strains and *E. coli* O157:H7 has already been described [33], studies providing information on transduction in the O80:H26 strain and the identification of the insertion sites of this *stx2d* gene were lacking. The choice to limit this study to the phage encoding Stx2d was due to the observation that this toxin type is associated with the most severe forms of the infections in humans [34].

After being challenged with Stx2d phage stock solutions, the K12-MG1655, K12-DH α 5, O80:H2 and O80:H26 *E. coli* strains produced lysis areas, but the O18-K1 and ATCC 25922 *E. coli* strains failed to produce any visible lysis. Many factors may contribute to the inability of this phage to infect these bacterial strains, including the lack of the correct receptor for the Stx2d phages or the presence of glucose moieties instead of galactose residues in the terminal position of cell wall lipopolysaccharides [35]. Systems such as Crispr-Cas9 [36] or BREX could also inhibit the phage infection [37].

The stability of transduced *stx* genes based on the ability of the lysogenized strains to retain the acquired genes up to three subculturing steps in LB broth was determined. The phage Stx2d from the EH3320 strain was stably maintained in all lysogenized hosts as confirmed by PCR. Conversely, the Stx2d phages originating from EH3155 and EH3160 *E. coli* strains were less stable and appeared to be carried transiently in subcultured cells consistent with what was already described by Tozzoli et al. 2014 [38].

Several non-O157 AE-STEC serogroups are important causes of human disease, one of the most common being O80:H2 for which hypotheses of *stx* genes transduction were already discussed in the literature [39, 40]. This study demonstrates that *stx2d*-harboring phages from STEC O80:H2 can transduce EPEC O80:H26 and non-pathogenic strains and convert them to stable lysogens unlike the O80:H2 strain. Even if this O80:H2 strain is phylogenetically related to the donor strains [23], several hypotheses can explain this observation. For instance, strain O80:H2 could contain active defense systems like nucleic acid interference, abortive infection or even chemical defense [41]. Conversely, O80 STEC can lose *stx* genes at appreciable frequencies, thereby reverting to being EPEC as showed in this study. STEC O80 and EPEC O80 represent a dynamic system in which bidirectional conversion yields different pathotypes. Stx-encoding bacteriophages are the major elements facilitating this conversion. The ability of STEC O80 strains to cause HUS indicates that such organisms are more virulent than EPEC strains lacking the *stx* gene.

If this is true, a change in the pathotype of the infecting *E. coli* O80 strain during an infection by the lost or acquisition of an Stx-encoding bacteriophage might have clinical implications. For instance, using the paradigm that Stx causes HUS, the loss of a *stx* gene during the early infection, before Stx production, might prevent the development of HUS for the patient.

Genome analysis revealed that the phage belongs to a currently unclassified genus and family within the *Caudoviricetes* class. It shares 98% identity with Stx2_112808 phage (isolated from an *E. coli* O145:H28 strain isolated in Japan and represent 20,3% of HUS cases in Argentina [42]) and >95% identity with seven other phages (Supplementary Figure 1). Homology detection and structure prediction showed that the phage encodes different lysogenic cycle-associated proteins like an integrase, an excisionase, the different repressors CI, CII and the antirepressor Cro. The integrase gene plays an important role in the lysogenic cycle of temperate phages [43]. It is an enzyme associated with phage genome insertion within the bacterial chromosomes at certain attachment sites (*attP* and *attB*) by a site-specific recombination process [44]. Shiga toxin containing prophages can convert the host strain since they integrate their genome using specific gene insertion sites. In these three convertant strains, the encoded gene present was the unknown function *yecE*, which is consistent with results from Nyambe et al., 2017 [45, 46]. A previous study indicated that the genetic diversity of the integrase-encoding genes among various Stx prophages is related to the different insertion sites of these prophages within the bacterial chromosome [47]. The excisionase controls integrase-mediated DNA rearrangements. It is strongly associated with the Stx prophage regulation induction process, triggering a lytic cycle of Stx prophages to lyse bacterial host and release Stx-converting phages in the environment [3,33]. The different repressors enable the entry of the phage into the lysogenic cycle. The *nanS-p* gene present in the Stx region is the phage homologue of the bacterial gene *nanS*, which encodes an esterase involved in the metabolization of sialic acids produced by submaxillary glands of bovines and present in great quantities in their gastrointestinal tract [48].

In vivo experiments with *G. mellonella* larvae showed decreased survival rates in larvae treated with the convertant *E. coli* strains. Indeed, only a few hours after bacterial inoculation, some larvae already showed visible signs of infection (decreased activity, melanization). The bacterial dose used (10^6 CFU/larvae) resulted in a very high mortality within 24 HPI in the infected group. *In vivo* experiments support the *in vitro* results with the fact that the phage Stx2 harboring *stx2* genes bring at least a part of the virulence. The difference is less obvious between the two O80 *E. coli* strains because the EPEC O80:H26 *E. coli* strain already possess virulence factors like intimine (*eae*), enterohemolysin (*hly*) and genes present on the pS88 plasmid (*iron*, *iss*, *iha*).

In conclusion, the vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d phage is stable and can resist to moderate pH and temperature conditions, which may be interesting for its survival in various environments. Our data demonstrate that UV radiation cause induction of lambdoid prophages carrying *stx* genes which can convert non-pathogenic *E. coli* into STECs. This result is in line with the hypothesis that EPEC O80:H2 can become AE-STECC by acquisition of the *stx* phage presented in a recent study [23].

These findings provide insights into the role of Stx-converting phage in the bacterial pathogenicity evolution through lysogenization in STEC strains. The consequences of this HGT over extended periods of time (frequency of gene acquisition upon transduction, gene stability) may result in a great clinical concern. Moreover, this study showed that newly converted strains are significantly more virulent than the non-converted ones suggesting the important role of the Stx2d phage in the pathogenicity.

Further studies are needed to analyze the Stx production of newly converted STEC and to attempt the transduction between different serotypes strains. Comparison of the genome structure and morphology of all Stx2d phages and *stx2d* genes would allow a better understanding of their epidemiology in the different STEC serotypes. Additional studies are needed to confirm the predicted protein functions of the Stx-converting phages and the coevolution of Stx-converting phages with their STEC hosts.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial strains

The three *stx2d* positive EH3155, EH3160 and EH3320 strains used in this study are listed in Table 1. These three strains are phylogenetically very close based on previous work [23]. They were provided by ARSIA (Regional Association for Animal Health and Identification) and were used as the donor strains for the phage transduction experiments. Recipient strains for lysogenization experiments were selected based on their avirulent background (*E. coli* K12-MG1655, *E. coli* K12-DH5 α , *E. coli* ATCC O18-K1 and *E. coli* ATCC 25922) and their seropathotype (EPEC *E. coli* O80:H26 and EPEC *E. coli* O80:H2).

Table 1. *Escherichia coli* strains used in this study

Bacterial strains	<i>stx</i> gene	Serotype	Reference
<i>Donor strains</i>			
EH3155	<i>stx2d</i>	O80:H2	
EH3160	<i>stx2d</i>	O80:H2	
EH3320	<i>stx2d</i>	O80:H2	[23]
<i>Host (recipient) strains</i>			
K12-MG1655	-	-	Laboratory strain
K12-DH5 α	-	-	Laboratory strain
ATCC700973	-	O18:K1	ATCC
ATCC25922	-	-	ATCC
O80:H2	-	O80:H2	Laboratory strain
O80:H26	-	O80:H26	[25]

Strains were routinely grown overnight in Lysogeny Broth (LB) broth at 37°C with shaking at 150 rpm or on LB agar plates. Prior to infection experiments, the absence and the presence of *stx2d* was verified by colony PCR in the host and donor strains, respectively.

4.2. Induction of Stx2d phages

E. coli EH3155, EH3160 and EH3320 (harboring Stx2d encoding prophage) were grown from frozen cryogenic vial stocks, streaked on LB agar plates, grown from single colonies overnight at 37°C in LB broth and then 1:100 was inoculated into fresh LB medium. The inoculum was incubated at 37°C, 250 rpm to an OD_{600nm} of 0.6. For UV induction, 10 mL of the three STEC strains cultures were placed in a petri dish with open lid and exposed for 1 min to UV radiation (0.5 kJ/m²). Following UV radiation, cultures were maintained for 6h at 37°C with gentle shaking. Then, the cultures were centrifuged (10 min at 10,000xg) and the supernatants were filtered through a sterile 0.22 μ m filter (VWR international) to completely remove bacteria [33]. The three phages were stored at 4°C.

4.3. Host range and infectivity of Stx2d phages

A total of 200 μL aliquots of the exponential phase ($\text{OD}_{600} \cong 0.3$) cultures of each host strain were mixed with 100 μL of phage, incubated at 37°C for 20 minutes and 2 mL molten soft LB agar was added and poured onto LB Lennox agar plates, then allowed to solidify at room temperature (RT). Plates were incubated for 24 h at 37°C. If clear lysis zones were observed, results were considered as positive for each Stx2d-phage stock solution

4.4. Horizontal transfer of *stx2d* gene from O80:H2 *E. coli* to non-pathogenic *E. coli*

E. coli strains presenting a clear lysis were grown at 37°C in 3 mL of LB broth to the early exponential phase, from which 100 μL aliquots were mixed with 3 mL of LB broth tubes containing 100 μL of 1M CaCl_2 and 500 μL of each phage stock and incubated overnight at 37°C without shaking. Infected cells were recovered by centrifugation at 6.000 x g (20 min, 4°C) and cell pellets were washed three times with phosphate buffer saline (PBS) to remove non-specifically bound phage particles [49]. The washed pellets were then suspended in 1 mL of LB broth, spread onto STEC agar plates and incubated overnight at 37°C. A colony from each plate was randomly selected and subcultured three times on STEC agar to identify stable lysogenic bacteria. After DNA extraction, a *stx2d* specific PCR [50] was performed to confirm whether the converted cells acquired the gene. Stock cultures were prepared of each strain by centrifugation (8000 x g, 10 min). The pellets were suspended in 1mL of LB broth and 0.5 mL was transferred to 2 mL beads-containing cryogenic vials and stored at -80°C for further use.

4.5. pH and temperature stabilities

To investigate the phage stability at high temperature, 1 mL of 10^8 PFU/mL of filtrate phage solution was added to a 1.5 mL microtube and incubated at 4 different temperatures (25°C, 37°C, 45°C and 60°C) for 1h using a heat block. For pH stability, 100 μL of the phage solution (10^8 PFU/mL) was mixed with 900 μL PBS adjusted to pH 2-4-6-8-10 and 12 with HCl and NaOH and incubated at room temperature for 1h. For all conditions, DNA was extracted with the DNA blood and tissue kit (Qiagen) and a qPCR was realized to compare the genomic copy numbers of each sample [51]. After the investigation of the normality of each distribution (corresponding to the concentration data of the phage and for both incubation condition), (by a histogram, a quantile-quantile plot (QQ-plot), a boxplot, and a Shapiro-Wilk test) a one-way analysis of variance (ANOVA) (with multiple comparisons) was used to assess if the concentration obtained after 1 h incubation was significantly different from the original. All statistical analyses were performed using R (p-value ≤ 0.05) [52].

4.6. STX phage quantification

A quantitative PCR was performed using a customized *stx2d* sequence as a standard curve: -TCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGTGACGCCGG- (Eurogentec).

The qPCR assays were carried out in a 25 μ L volume containing 1 x GoTaq® Master Mix 2.0 (Promega), primers and probe (final concentration 300 nM of each primer and 100 nM probe; Eurogentec) (Table 2) and 5 μ L template DNA. qPCR was performed with the following amplification program: initial activation of the enzyme at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 15s, then 1 min annealing and elongation at 60°C and cooling at 40°C for 30s [53].

Table 2. Primers and probes for qPCR quantification of *stx2d* [53].

Gene	Primer or probe	Sequence (5'-3')	Position (5'-3')	Accession number
<i>stx2</i>	stx2-F	TCA GGC AIA TAC AGA GAG AAT TTC G	578-602	AY443044
	stx2-R _a	CCG GIG TCA TCG TAT ACA CAG	646-626	AY443044
	stx2-P Φ	CAC TGT CTG AAA CTG CT	608-624	AY443044

^Φ Probe tagged with minor groove-binding non-fluorescent quencher (MGBNFQ) and 6-carboxyfluorescein (FAM) fluorescent label (Eurogentec).

4.7. Whole genome sequencing and genomic analysis

The phage genomic DNA was isolated using a phenol-chloroform extraction [54]. Sequencing was performed on an Illumina (San Diego, CA, USA) MiniSeq machine using the Nextera Flex DNA library kit (Illumina). After assembly of the raw sequencing data using Unicycler [55], the most related phages were identified with BLASTn [56] and Viptree v3.0 [57]. VIRIDIC [58] was used for taxonomic classification. Annotation was performed with RASTtk [59] on the PATRIC server [60] followed by a manual curation using BLASTp and HHPred [61] and visualization with Easyfig [62]. The data were submitted to NCBI GenBank under accession number ON416862. For the bacterial samples, total genomic DNA were extracted with the DNA blood and tissue kit (Qiagen). The DNA was subsequently prepared for Illumina sequencing similarly to the phage DNA and sequenced. In parallel, the DNA were also prepared for long read sequencing using the Rapid barcoding kit (Oxford Nanopore Technology, Oxford, UK) and sequenced on a MinION R9.4.1 flowcell (Oxford Nanopore Technology), with Guppy(v3.1.5) as basecaller [63]. The genomes were also constructed using Unicycler. The assemblies were visually inspected using Bandage [64]. A quality control with Quast [65] revealed an N50 of

5,264,684 bp (13 contigs), 3,013,105 bp (43 contigs) and 3,012,995 bp (55 contigs) for K12-MG1655, K12-DH5 α and O80:H26, respectively.

4.8. Transmission electron microscopy

E. coli EH3320 was grown overnight at 37°C in LB broth. The culture was subsequently diluted 50x in 50mL of LB broth. Phage induction was carried out by adding mitomycin C (concentration of 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to the culture bottles at $\text{OD}_{600} \cong 0,2$, which were further incubated until an OD decrease. The culture was centrifuged at 10 000 x g for 10 min at 4°C. The phage was negatively stained and analyzed by transmission electron microscopy (TEM) by the Electron Microscopy unit (ULB, CMMI, Gosselies, Belgique). The grids were stained with 4% uranyl acetate. The sample was placed on the grid using the grid-on-drop method. Observations were made on a Tecnai10 TEM (FEI-TechnoFisher) and images were captured with a Veleta CCD cam.

4.9. *In vivo* assay: *Galleria mellonella* larvae model

A preliminary experiment aimed to determine the optimal inoculation dose was realized. Six groups of 10 *G. mellonella* larvae (Animal Confort, Loncin, Belgique) were inoculated using an automatic injector (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) with 10 μL of EH3320 at six different concentrations, ranging from 10 CFU/10 μL to 10^6 CFU/10 μL . Each larva was inoculated in the last left proleg with a BD Plastipak™ 1 mL sterile syringe (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and a sterile 30-gauge needle (Terumo corporation, Tokyo, Japan). The optimal inoculation dose was expected to cause a lethality of 90-100% after four days.

The principal experiments were carried out in technical triplicate to compare the survival of *G. mellonella* larvae with the non-STEC strains converted or not with the Stx2d phage. For each experiment (three transduced strains), 270 larvae were divided into nine groups (Table 3). Each larvae was inoculated as previously described. The larvae were incubated at 37°C and mortality was evaluated every 24h. Kaplan-Meier survival curves were generated to assess the survival of the different groups using R-commander (Rcmdr v2.6-0). Logrank tests were performed to highlight any significant difference in survival rates between the groups ($p < 0,05$). Back-titration of bacteria was realized to verify the inoculated doses.

Table 3. Summary table of the *G. mellonella* larvae groups inoculated in triplicate for the main experiments (survival and titration)

Groups	Experiments		
	1 (CFU/10 μ L)	2 (CFU/10 μ L)	3 (CFU/10 μ L)
1	PBS	PBS	PBS
2	K12-DH5 α (10^3)	K12-MG1655 (10^3)	O80:H26 (10^3)
3	K12-DH5 α (10^4)	K12-MG1655 (10^4)	O80:H26 (10^4)
4	K12-DH5 α (10^5)	K12-MG1655 (10^5)	O80:H26 (10^5)
5	K12-DH5 α (10^6)	K12-MG1655 (10^6)	O80:H26 (10^6)
6	K12-DH5 α + <i>stx2d</i> (10^3)	K12-MG1655 + <i>stx2d</i> (10^3)	O80:H26 + <i>stx2d</i> (10^3)
7	K12-DH5 α + <i>stx2d</i> (10^4)	K12-MG1655 + <i>stx2d</i> (10^4)	O80:H26 + <i>stx2d</i> (10^4)
8	K12-DH5 α + <i>stx2d</i> (10^5)	K12-MG1655 + <i>stx2d</i> (10^5)	O80:H26 + <i>stx2d</i> (10^5)
9	K12-DH5 α + <i>stx2d</i> (10^6)	K12-MG1655 + <i>stx2d</i> (10^6)	O80:H26 + <i>stx2d</i> (10^6)

5. References

1. Mcallister, L. J. *et al.* Genomic comparison of two O111:H- enterohemorrhagic *Escherichia Coli* isolates from a historic hemolytic-uremic syndrome outbreak in Australia. *Infect Immun.* **84**, 3, 775–81; 10.1128/IAI.01229-15 (2016).
2. Bloch, S. *et al.* UV-sensitivity of Shiga toxin-converting bacteriophage birions Φ 24B, 933W, P22, P27 and P32. *Toxins.* **7**, 9, 3727–39; 10.3390/toxins7093727 (2015).
3. Smith, D. L. *et al.* Comparative genomics of Shiga toxin encoding bacteriophages. *BMC Genomics.* 13:311; 10.1186/1471-2164-13-311 (2012).
4. Scheutz, F. *et al.* Multicenter evaluation of a sequence-sased protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin Microbiol.* **50**, 9, 2951–63; 10.1128/JCM.00860-12 (2012).
5. Bai, X., Scheutz, F., Dahlgren, H.M., Hedenström, I., Jernberg, C. Characterization of clinical *Escherichia coli* strains producing a novel Shiga toxin 2 subtype in Sweden and Denmark. *Microorganisms.* **17**, 9:2374; 10.3390/microorganisms9112374 (2021).
6. Paul, J. H. & Weinbauer, M. Detection of lysogeny in marine environments. *Manual of Aquatic Viral Ecology.* **4**, 30-33; 10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.30 (2010).
7. Imamovic, L. & Muniesa, M. Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One.* **7**, 2; 10.1371/journal.pone.0032393 (2012).
8. Allison, H. E. *et al.* Immunity profiles of wild-type and recombinant Shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect. Immun.* **71**, 6, 3409–18; 10.1128/IAI.71.6.3409 (2003).
9. Toth, I. *et al.* 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**, 12, 7242–47; 10.1128/AEM.69.12.7242 (2003).
10. Fang, Y., Mercer, R. G., McMullen, L. M. & Gänzle, M.G. Induction of Shiga toxin-encoding prophage by abiotic environmental stress in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, 19, 1–13; 10.1128/AEM.01378-17 (2017).
11. Plunkett, G III., Rose, D. J., Durfee T. J. & Blattner F. R. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.* **181**, 1767–1778; 10.1128/jb.181.6.1767-1778.1999 (1999).
12. Creuzburg, K. *et al.* The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J. Bacteriol.* **187**, 8494–8498; 10.1128/JB.187.24.8494-8498 (2005).
13. De Greve, H., Qizhi, C., Deboeck, F. & Hernalsteens, J. P. The Shiga-toxin VT2-encoding bacteriophage phi297 integrates at a distinct position in the *Escherichia coli* genome. *Biochim. Biophys. Acta.* **1579**, 196–202; 10.1016/S0167-4781(02)00539-0 (2002).

14. Wick, L. M., Weihong, Q., Lacher, D. W. & Whittam, T. S. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia Coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **187**, 5, 1783–91; 10.1128/JB.187.5.1783 (2005).
15. Brzuszkiewicz, E. *et al.* Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch. Microbiol.* **193**, 12, 883–91; 10.1007/s00203-011-0725-6 (2011).
16. Bielaszewska, M. *et al.* Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O26 infection in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 10, 3144–50; 10.1128/AEM.02937-06 (2007).
17. Soysal, N. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* hybrid pathotype O80:H2 as a new therapeutic challenge. *Emerg. Infec. Dis.* **22**, 9, 1604–12; 10.3201/eid2209.160304 (2016).
18. Wijnsma, K. L. *et al.* Unusual severe case of hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin 2d-producing *E. Coli* O80:H2. *Pediatr. Nephrol.* **32**, 7, 1263–68; 10.1007/s00467-017-3642-3 (2017).
19. Cointe, A. *et al.* Emerging multidrug-resistant hybrid pathotype Shiga toxin-producing *Escherichia Coli* O80 and related strains of clonal complex 165, Europe. *Emerg. Infec. Dis.* **24**, 12, 2262–69; 10.3201/eid2412.180272 (2018).
20. Mariani-Kurkdjian, P. *et al.* Haemolytic-uraemic syndrome with bacteremia caused by a new hybrid *Escherichia Coli* pathotype. *New. Microbes. New. Infect.* **2**, 4, 127–31; 10.1002/nmi2.49 (2014).
21. Bruyand, M. *et al.* Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia Coli* , an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Euro. Surveill.* **24**, 8; 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800068 (2019).
22. Blanco, M. *et al.* Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin) - producing *Escherichia Coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *J. Clin Microbiol.* **42**, 2, 645–51; 10.1128/JCM.42.2.645-651.2004 (2004).
23. Habets, A. *et al.* Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia Coli* O80:H2 from diarrhoeic and septicaemic calves and relatedness to human Shigatoxigenic *E.Coli* O80:H2. *J. Clin Microbiol.* **42**, 2, 645-651; 10.1111/jam.14759 (2020).
24. De Rauw, K. *et al.* Characteristics of Shiga toxin producing and enteropathogenic *Escherichia Coli* of the emerging serotype O80:H2 isolated from humans and diarrhoeic calves in Belgium. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 1, 23–26; 10.1016/j.cmi.2018.07.023 (2019).

25. Thiry, D. *et al.* Enteropathogenic *Escherichia Coli* O80:H2 in young calves with diarrhea, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 12, 2093–95; 10.3201/eid2312.170450 (2017).
26. Nüesch-Inderbilen, M. *et al.* Serotypes and virulence profiles of Shigatoxin-producing *Escherichia Coli* strains isolated during 2017 from human infections in Switzerland. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 7, 933–39; 10.1016/j.ijmm.2018.06.011 (2018).
27. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union one health 2019 zoonoses report. *EFSA J.* **19**, 2 ; 10.2903/j.efsa.2021.6406 (2021).
28. Donnenberg, M.S. & Whittam T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* **107**, 5, 539:548.
29. Kawano, K., Okada, M., Haga, T., Maeda, K. & Goto, Y. Relationship between pathogenicity for humans and Stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia Coli* serotype O157. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 3, 227–32; 10.1007/s10096-007-0420-3 (2008).
30. Orth, D. *et al.* The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**, 3, 235–42; 10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.013 (2007).
31. Zimmermann, L. *et al.* A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J. Mol. Biol.* **430**, 15, 2237–2243; 10.1016/j.jmb.2017.12.007 (2018).
32. Feiner, R. *et al.* A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. **13**, 10, 641-50; 1038/nrmicro3527 (2015).
33. Yue, W-F. Du, M. & Zhu, M-J. High temperature in combination with UV irradiation enhances horizontal transfer of Stx2 gene from *E.coli* O157:H7 to non-pathogenic *E.coli*. *PLoS One.* **7**, 2; 10.1371/journal.pone.0031308 (2012).
34. Krüger, A. & Lucchesi, P. M. A. Shiga Toxins and Stx phages: highly diverse entities. *Microbiology.* **161**, 3, 1–12; 10.1099/mic.0.000003 (2015).
35. Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S. & Novik, G. I. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol. J. Microbiol.* **59**, 3, 145-55 (2010).
36. Asmamaw M., Zawdie B. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics*, **21**; 15:353-361; 10.2147/BTT.S326422 (2021).
37. Goldfarb, T. *et al.* BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *Embo J*, **34**, 169-183; 10.15252/embj.201489455 (2015).
38. Tozzoli, R. Shiga Toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia Coli*: A world in motion. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, **4**, 80; 10.3389/fcimb.2014.00080 (2014).

39. Cointe, A. *et al.* Emergence of new ST301 Shiga toxin-producing *Escherichia Coli* clones harboring extra-intestinal virulence traits in Europe. *Toxins*. **13**, 10; 10.3390/toxins13100686 (2021).
40. Rodwell, E.V., Vishram, B., Smith, R., Browning, L., Smith-Palmer, A., Allison, L., Holmes, A., Godbole, G., McCarthy, N., Dallman, T.J., Jenkins, C. Epidemiology and genomic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal complex 165 in the UK. *J Med Microbiol*. **70**:001471; 10.1099/jmm.0.001471 (2021).
41. Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P-J. & Brouns, S. J. J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* Vol 46, Issue 1; [10.1093/femsre/fuab048](https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048) (2022).
42. Carbonari, C. C., Miliwebsky, E. S., Zolezzi, G., Deza, N.L., Fittipaldi, N., Manfredi, E., Baschkier, A., D'Astek, B.A., Melano, R.G., Schesi, C., Rivas, M., Chinen, I. The importance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM[H28]/H28 infections in Argentina, 1998-2020. *Microorganisms*. **7**, 10; 10.3390/microorganisms10030582 (2022).
43. Balding, C., Bromley, S. A., Pickup, R. W., & Saunders, J. R. Diversity of phage integrases in *Enterobacteriaceae*: development of markers for environmental analysis of temperate phages. *Environ. Microbiol.* **7**, 1558–1567; 10.1111/j.1462-2920.2005.00845.x (2005).
44. Colavecchio, A. *et al.* Prophage integrase typing is a useful indicator of genomic diversity in *Salmonella enterica*. *Front. Microbiol.* **8**, 1283; 10.3389/fmicb.2017.01283 (2017).
45. Nyambe, S., Burgess, C., Whyte, P. & Bolton, D. An investigation of vtx₂ bacteriophage transduction to different *Escherichia coli* patho-groups in food matrices and nutrient broth. *Food. Microbiol.* **68**, 1-6; 10.1016/j.fm.2017.06.004 (2017).
46. Reckentenwald, J. & Schmidt, H. The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-Encoding Phage φP27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Ameri. Soc. Microbiol.* Vol 70, Issue 4, 1896-1908 (2002).
47. Serra-Moreno, Ruth., Jofre, J., & Munesia, M. Insertion site occupancy by stx₂ bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J. bacterial.* **189**, 18, 6645-54; 10.1128/JB.00466-07 (2007).
48. Saile, N. *et al.* Growth advantage of *Escherichia coli* O104:H4 strains on 5-N-acetyl-9-O-acetyl neuraminic acid as a carbon source is dependent on heterogeneous phage-Borne nanS-p esterases. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 4, 459-468; 10.1016/j.ijmm.2018.03.006. (2018).
49. Khalil, R. K. S., Skinner, C., Patfield, S. & He, X. Phage-mediated Shiga toxin (Stx) horizontal gene transfer and expression in non-Shiga toxigenic Enterobacter and *Escherichia coli* strains. *Pathog. Dis.* **74**, 5; 10.1093/femspd/ftw037 (2016).

50. Iguchi, A. *et al.* *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J. Clin Microbiol*, **53**, 2427-2432; doi.org/10.1128/JCM.00321-15 (2003).
51. Park, D-S. & Park J-H. Characteristics of bacteriophage isolates and expression of Shiga-toxin genes transferred to non Shiga toxin-producing *E.coli* by transduction. *J. Microbiol. Technol.* **31**, 5, :1–7; 10.4014/jmb.2102.02040 (2021).
52. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online: <https://www.gbif.org/fr/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>
53. Verstraete, K. *et al.* A qPCR assay to detect and quantify Shiga toxin-producing *E.coli* (STEC) in cattle and on farms: A potential predictive tool for STEC culture-positive farms. *Toxins*. **6**, 4, 1201–21; 10.3390/toxins6041201 (2014).
54. Eskenazi, A. *et al.* Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*. **13**, 302; 10.1038/s41467-021-27656-z (2022).
55. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *BioRxiv*. 10.1101/096412 (2016).
56. Altschul, S. Basic local alignment search tool (BLAST). *J. Mol Biol.* **215**, 3, 403-410; 10.1006/jmbi.1990.9999 (1990).
57. Nishimura, Y. *et al.* ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics*. **33**, 15, 2379-2380; 10.1093/bioinformatics/btx157 (2017).
58. Moraru, C., Varsani, A. & Kropinski A. M. VIRIDIC-A novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses. *Viruses*. **12**, 11, 1268; 10.3390/v12111268 (2020).
59. Brettin, T. *et al.* RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*. **5**, 8365; 10.1038/srep08365 (2015).
60. Wattam, A. R. *et al.* Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic. Acids. Res.* Vol 45, Issue D1, D535–D542; 10.1093/nar/gkw1017 (2017).
61. Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic. Acids. Res.* **33**, 244-8; 10.1093/nar/gki408 (2005).
62. Sullivan, M. J., Petty, N. K. & Beatson S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. **27**, 7, 1009-10; 10.1093/bioinformatics/btr039 (2011).
63. Wick, R. R., Judd, L. M. & Holt, K.E. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol.* **20**, 1, 129; 10.1186/s13059-019-1727-y (2019).

64. Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J. & Holt K. E. Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*. **31**, 20, 3350-2; 10.1093/bioinformatics/btv383 (2015).
65. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. QUILT: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. **15**, 29, 1072-5; 10.1093/bioinformatics/btt086 (2013).

Acknowledgments

The authors thank David Perez-Morga (CMMI, ULB) for the collaboration for the transmission electron microscopy. The CMMI is supported by the European Regional Development Fund and the Walloon Region. The authors also thank Dr Marc Saulmont from ARSIA for providing O80:H2 *E. coli* strains. The university of Liège provided financial support (‘Fonds Spéciaux de la Recherche Project HYBRID_COLI_O80’).

Author contributions

J.M. and D.T. conceived the project, A.H. conducted the experiments, J.W. and A.H. performed the genomics analysis. A.H. and D.T. wrote the paper, all other authors reviewed and edited the paper. M.V. produced the transmission electron microscopy image, J.D. realized the draft of the manipulations, F.L. performed the statistical analyzes, C.A. gave help and information during some experiments.

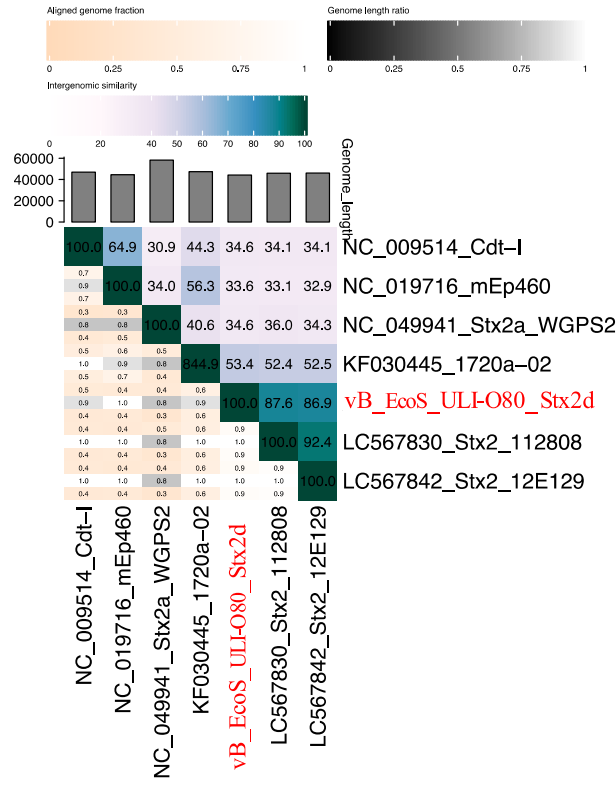
Data availability statement

The data were submitted to NCBI GenBank under accession number ON416862.

Competing interests

The author(s) declare no competing interests.

Figure S1: Intergenomic distance between vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d phage and related bacteriophages.



Discussion - Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis d'observer une certaine proportion du sérotype O80:H2 au sein de souches EPEC et AE-STECS isolées de veaux diarrhéiques ou septicémiques en Belgique, ces dernières étant génétiquement liées aux souches humaines AE-STECS. Par contre, ce sérotype O80:H2 n'a pas été détecté au sein de souches EPEC et AE-STECS isolées de jeunes veaux sains comme observé dans la seconde étude. En effet, ceux-ci appartiennent à d'autres sérotypes O majoritairement encore non identifiés à ce jour mais peuvent cependant être porteurs sains d'EPEC et d'AE-STECS. Après obtention de ces résultats, une question reste en suspens concernant l'origine des EPEC et des AE-STECS appartenant aux mêmes sérotypes. Jusqu'à présent, à notre connaissance, aucune méthode génétique classique n'a été en mesure de faire la distinction entre les véritables EPEC ou AE-STECS de celles ayant perdu ou acquis les gènes *stx* (Bardiau et al., 2009 ; Bugarel et al., 2011). Dans la première étude, une analyse phylogénétique a été réalisée sur environ 50 souches AE-STECS et EPEC O80:H2 isolées d'humains et de veaux diarrhéiques dont les résultats pourraient aider à faire la distinction entre les véritables EPEC et les AE-STECS suspectées d'avoir perdu ou acquis les gènes *stx*. Afin d'étudier encore plus précisément cette question, la troisième étude a permis d'observer que le gène *stx2d* médié par le phage Stx2d provenant d'une souche STEC O80:H2 peut-être transduit à des souches de laboratoire K12-MG1655 et K12-DH5 α et à une souche EPEC O80:H26. Les expériences *in vivo* confortent les résultats *in vitro* avec le fait que le phage Stx2d hébergeant le gène *stx2d* confère une partie de la virulence à ces souches. Les conséquences de ces transferts horizontaux de gènes représentent une forte préoccupation en termes de santé publique.

Les souches STEC représentent une cause fréquente de SHU chez l'enfant résultant dans plus de la moitié des cas d'une infection au sérotype STEC O157. Cependant, les sérotypes non O157 ont été de plus en plus associés au SHU ces dernières années (Mele et al., 2014) dont notamment le sérotype O80. Ce travail s'est basé sur l'étude du sérotype O80:H2 car il est unique pour plusieurs raisons qui seront décrites au cours de cette discussion. Premièrement, il a récemment émergé en Europe de l'Ouest et plus particulièrement en Espagne, dont il est responsable de nombreux cas de SHU (Joseph et al., 2020). Des souches du sérotype O80:H2 appartenant toutes au ST301, possédant le gène *eae ξ* et environ 80% d'entre elles le gène *stx2d*, ont été identifiées en Espagne (Blanco et al., 2004), aux Pays-Bas (Wijnsma et al., 2017) et en Suisse (Fierz et al., 2017). Deuxièmement, ce sérotype est toujours associé à de multiples résistances aux antibiotiques tels que l'aminopénicilline, les aminoglycosides, l'acide nalidixique, le cotrimoxazole, la tétracycline et les phénicolés alors qu'un phénotype de résistance est habituellement rare parmi les AE-STECS, qui sont généralement totalement sensibles aux antibiotiques, à l'exception de rares clones, comme le clone épidémique allemand O104:H4 (Bielaszewska et al., 2011). De plus, des infections extra-intestinales inhabituelles ont été récemment décrites pour ce sérotype (Mariani-Kurkdjian et al., 2014 ; Soysal et al., 2016), telles que des bactériémies, alors que les AE-STECS sont généralement connues pour être pathogènes strictement au niveau intestinal.

Un cas récent aux Pays-Bas illustre l'extrême pathogénicité potentielle de ce sérotype ; un garçon de 16 mois est décédé d'une défaillance multiorganique et d'une microangiopathie thrombotique cérébrale étendue attribuable à une souche d'*E. coli* O80 productrice de toxines stx2d (Wijnsma et al., 2017). Les humains se contaminent généralement par voie orale en consommant des aliments ou de l'eau contaminés par des matières fécales bovines (Moxley., 2004) mais aucune étude n'a encore jusqu'ici démontré une transmission alimentaire d'une souche EPEC ou AE-STECS O80:H2 à l'homme. Etant donné qu'un traitement ciblé pour les maladies humaines induites par les AE-STECS comme la colite hémorragique et le SHU n'a pas encore fait l'objet d'une application clinique (Muhlen et al., 2020), la prévention de l'infection humaine est une priorité absolue. En effet, le traitement des patients infectés par les STECS est particulièrement difficile car il a été constaté que de nombreux antibiotiques sont de puissants inducteurs de prophages. Les mesures prophylactiques visant à prévenir l'exposition sont un défi, car jusqu'à 82% des bovins dans le monde excrètent des (AE)-STECS dans leurs excréments (Moxley., 2004 ; Geue et al., 2002).

Les AE-STECS O80:H2 comme les EPEC sont présentes chez les jeunes veaux en Belgique, et sont associées à des diarrhées et des septicémies. Néanmoins, bien que plusieurs gènes localisés sur le plasmide pS88 et d'autres gènes liés à l'invasion y soient présents ; l'infection systémique par les AE-STECS ou EPEC chez les veaux semble être un événement rare (Thiry et al., 2017 ; De Rauw et al., 2019). Le sérotype O80:H2 ayant déjà été identifié parmi des AE-STECS provenant de bovins sains auparavant (Blanco et al., 2004 ; Cointe et al., 2018), il s'agit ici à notre connaissance de la première description chez de jeunes veaux diarrhéiques et septicémiques, à l'exception de deux isolats provenant d'un veau unique en 1987 (Thiry et al., 2017). Ce sérotype O80, tout comme d'autres sérotypes non classiques O123/186, O156, O177, O182 et O183 (Annexe) ne faisant pas partie de la liste des AE-STECS les plus fréquentes et les plus pathogènes dans le monde chez l'homme (Karmali et al., 2003 ; Tozzoli et Scheutz, 2014), ne sont pas systématiquement recherchés en médecine humaine et encore moins en médecine vétérinaire.

La première étude a porté sur l'identification et la caractérisation génotypique de souches EPEC et AE-STECS O80:H2 isolées de veaux diarrhéiques et septicémiques et de leur comparaison génomique. Au vu du grand nombre d'isolats O80:H2 détectés au sein de veaux diarrhéiques, il nous a semblé important et nécessaire d'étudier la parenté génique des AE-STECS et EPEC bovines entre elles et avec des AE-STECS humaines. Le sérotype O80 semble avoir émergé indépendamment des autres sérotypes, formant un groupe distinct dans la phylogénie des AE-STECS. En effet, il appartient au phylogroupe A (Cointe et al., 2018) alors que les autres appartiennent au phylogroupe E (O157:H7 et O55:H7) ou B1 (sérotypes non O157/O55:H7) (Denamur et al., 2021). Une étude récente a montré que sur un faible nombre d'isolats, les EPEC bovines et les AE-STECS humaines semblent génétiquement apparentées (De Rauw et al., 2019). Les résultats de la première étude de ce travail qui porte sur 53 *E. coli* O80:H2

confirment non seulement ces résultats mais montrent également que les AE-STECS bovines isolées depuis 2009 sont phylogénétiquement plus étroitement apparentées aux AE-STECS humaines qu'aux EPEC bovines. Ces souches appartiennent également à la même lignée phylogénétique majeure L1 comprenant deux sous-lignées avec des distributions différentes des souches d'*E. coli* O80:H2. La lignée SL1-1 comprend la majorité des EPEC bovines avec quelques AE-STECS contenant différents gènes *stx* tandis que la lignée SL1-2 comprend la majorité des AE-STECS bovines et humaines hébergeant le gène *stx2d* (Etude 1, Figure 1). La plupart de ces AE-STECS *stx2d* se regroupent à l'exception des AE-STECS *stx1a* comme déjà observé (Nüesch-Inderbinnen et al., 2018). Ces résultats suggèrent que les AE-STECS O80:H2 seraient issues d'EPEC par acquisition du gène *stx* (Toth et al., 2003 ; Bielaszewska et al., 2007) et que les EPEC O80:H2 dériveraient des AE-STECS par délétion du gène *stx*, comme déjà observé ou suggéré (Bielaszewska et al., 2007 ; Cointe et al., 2018). Néanmoins, une instabilité des phages Stx1a, Stx2a ou Stx2d ne peut être exclue comme conséquence de la perte des phages Stx par toutes ces AE-STECS bovines comme cela a déjà été observé auparavant (Cointe et al., 2018). Cette hypothèse nécessite davantage d'études phylogénétiques pour être confirmée.

Point de vue clonalité, à part deux AE-STECS bovines isolées en 1987, toutes les souches provenant de bovins O80:H2 EPEC et AE-STECS appartiennent au même clone ST301, comme précédemment publié (Soysal et al., 2016 ; Fierz et al., 2017 ; Ingelbeen et al., 2018 ; Nüesch-Inderbinnen et al., 2018).

Ce sérotype est également unique point de vue de sa virulence. En effet, l'AE-STECS O80 est un pathotype hybride qui combine des facteurs de virulence intestinaux classiques (présence des gènes *stx*, *eae* et *ehxA*) et des déterminants de virulence extra-intestinaux portés par un plasmide tels que les systèmes d'absorption du fer : l'aérobactine (*iucC*) et la salmocheline (*iroN*), une protéine de résistance au sérum (*iss*), un système de sécrétion I putatif (*etsC*), l'omptine (*ompTp*), l'hémolysine aviaire (*hlyF*), et 2 bactériocines (*cia* et *cva*), suggérant la présence d'un plasmide similaire au plasmide pS88 (Peigne et al., 2009). Le pS88 est un plasmide ColV, déterminant clé de la virulence des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux chez la volaille et l'homme (Cointe et al., 2018). Ce plasmide est impliqué dans les méningites néonatales (Peigne et al., 2009) et pourrait expliquer l'occurrence de la dissémination extra-intestinale des infections aux AE-STECS. Comme une majorité de ces gènes sont bien détectés après séquençage des souches O80:H2, nous pouvons conclure que des plasmides pS88-like sont bien présents dans ces souches. La confirmation finale devrait avoir recours à un séquençage de l'ADN plasmidique qui permettrait d'identifier la présence de plasmides.

Il faut également noter la présence des gènes *etsC/iucC* dans les AE-STECS humaines *stx2d* mais leur absence dans les AE-STECS humaines *stx2a*, ceci ayant déjà été observé dans les *E. coli* O80:H2 françaises et suisses (Cointe et al., 2018 ; Nüesch-Inderbinnen et al., 2018). Ces données suggèrent une plasticité génétique des STECS O80 concernant l'acquisition de facteurs de virulence extra-intestinaux.

Deux autres gènes *cm*a*/i*h*a* non associés au pS88 localisés sur le chromosome et liés à la colicine M et à la régulation du fer ont également été détectés. Le profil génétique des AE-STE_C est positif pour les gènes *etsC/iucC* et négatif pour les gènes *cm*a*/i*h*a*, tandis que le profil des EPEC est positif pour les gènes *cm*a*/i*h*a* mais négatif pour les gènes *etsC/iucC*. Une étude sur le rôle putatif de ces gènes dans la pathogénicité des AE-STE_C et EPEC O80:H2 ainsi qu'une caractérisation plus poussée de ces isolats permettrait d'établir tout trait de virulence commun entre les souches humaines et celles des veaux.

Un autre point intéressant à élucider serait l'origine des AE-STE_C O80:H2 en les comparant avec des *E. coli* O80 provenant de différents pays, espèces animales et sérotypes H (Cointe et al., 2018). Les AE-STE_C humaines et bovines étant codistribuées dans les deux principales sous-lignées et bien que les AE-STE_C O80:H2 chez les bovins sains soient rares ou absentes (Blanco et al., 2004 ; Cointe et al., 2018 ; Thiry et al., 2018), il est nécessaire de réaliser des études supplémentaires pour évaluer les bovins adultes sains comme source potentielle de contamination des humains par des souches AE-STE_C O80:H2 puisque les bovins sont considérés comme le principal réservoir des STE_C (Kim et al., 2020). Les différentes caractéristiques telles que : l'émergence récente en Europe de ce sérotype O80:H2, le fort potentiel de pathogénicité extra-intestinale et la multirésistance de ce pathotype hybride nous conduisent à caractériser davantage ces souches qui pourraient représenter un problème majeur de santé publique.

Les résultats de cette seconde étude ont été obtenus en utilisant une première étape d'enrichissement suivie d'une croissance sur quatre milieux gélosés (semi-)sélectifs. Les milieux McConkey's (MC) et Chromocult Coliform (ES) sont sélectifs pour les entérobactéries et les coliformes en général, respectivement. Le milieu Chromocult Coliform ES supplémenté de tellurite (ESTe) ainsi que le milieu CHROMagar (STECB) sont sélectifs pour les coliformes résistants au tellurite, y compris la plupart, sinon la totalité, des "gang-of-seven" et plusieurs "non-gang-of-seven" (AE-)STE_C et EPEC, contrairement à la majorité des souches non-STE_C et non-EPEC (Mainil et al., 2005 ; Verhaegen et al., 2015).

Après observation d'une certaine prévalence du sérotype O80:H2 chez des veaux diarrhéiques, il a été nécessaire d'étudier la prévalence de ce sérotype chez des veaux sains. Pour cela, grâce aux prélèvements RAMS, des veaux laitiers âgés de moins de 6 mois provenant de trois fermes en Belgique ont été identifiés comme porteurs sains non seulement de sérotypes AE-STE_C mais aussi d'EPEC. Cependant, le sérotype O80 n'a pas été identifié, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment en Belgique (Thiry et al., 2018 ; Pohl et al., 1997) et en Europe en général (EFSA, 2019) selon lesquels ce sérotype serait absent ou très rare chez les veaux sains et les bovins adultes. Cette situation est très différente de celle des jeunes veaux diarrhéiques de la première étude. Une première hypothèse qui pourrait justifier cette absence serait le fait que ce sérotype O80 est présent en très faible quantité, sous. En effet, le prélèvement a été fait au niveau de la jonction recto-anale et au niveau du contenu du

gros intestin pour les veaux sains et bovins adultes alors que pour les veaux diarrhéiques il a eu lieu dans l'intestin grêle. La troisième hypothèse serait que les jeunes veaux sains ne soient pas porteurs d'*E. coli* O80:H2 et que l'origine d'infection chez les humains et les veaux diarrhéiques soit différente. En effet, si l'origine des infections humaines à *E. coli* O80:H2 était de source bovine, une prévalence de ce sérotype serait plus élevée. Par conséquent, si l'on considère l'origine réelle des *E. coli* O80:H2 pathogènes, cette souche pourrait provenir d'animaux sauvages ou de « l'environnement de la ferme » (Murphy et al., 2021 ; Nguyen et al., 2021).

Dans cette seconde étude, des variations au niveau du nombre de souches EPEC ou (AE)-STEC entre les trois fermes ont été détectées. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer celles-ci. Une première serait qu'il existe une différence de contamination entre les différentes fermes par ces souches. Une seconde hypothèse serait que les gènes *stx* soient moins stable *in vivo* ou *in vitro* dans les isolats d'*E. coli* d'une ferme à l'autre. Il existe également des variations au niveau du nombre de souches EPEC et (AE)-STEC selon le moment de l'échantillonnage. Ceci pourrait être dû à l'introduction de nouveaux veaux porteurs sains et/ou par une augmentation de l'excrétion des (AE)-STEC et EPEC dans les fèces de jeunes veaux ou d'adultes suite à un certain stress. La propagation d'un sérotype (AE)-STEC ou EPEC au sein d'une exploitation a été observée dès qu'un veau devient un sujet contaminant et que l'âge et le nombre de sujets augmentent (Browne et al., 2018). Une dernière hypothèse serait l'apparition de diarrhées associées aux EPEC ou aux AE-STEC chez certains de ces jeunes veaux. Cependant, cette dernière supposition a une très faible probabilité puisqu'un seul des 11 veaux diarrhéiques échantillonnés excrétaient des EPEC et aucun des (AE)-STEC.

Outre l'étude de la prévalence, un autre objectif de cette étude était de suivre la persistance des différents virulotypes et sérotypes chez les mêmes veaux. Les résultats confirment non seulement qu'un veau non contaminant peut le devenir quelques semaines plus tard, probablement après avoir été contaminé par un autre veau mais peut-être aussi par le fait que les EPEC, les AE-STEC et les STEC appartenant à différents virulotypes et sérotypes peuvent être excrétés à différents moments par un même veau, illustrant ainsi la possibilité d'événements de contamination multiples. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Rice et collaborateurs (Rice et al., 2003) qui ont pu différencier les bovins colonisés par *E. coli* O157:H7 de ceux qui l'excrétaient de manière transitoire. Par conséquent, il est recommandé de procéder à plus d'un échantillonnage sur une période de plusieurs semaines lors de la réalisation d'une étude, quelle que soit l'exploitation.

Les AE-STEC contiennent des gènes *stx* différents mais avec une prédominance pour le gène *stx2d* souvent déjà retrouvé dans des souches *E. coli* O157:H7. Les associations privilégiées entre sérotypes et gènes *stx* sont assez souvent observées mais peuvent changer au cours du temps.

En effet, il est connu que les AE-STEC O26:H11 ont pendant longtemps été associées au gène *stx1* (Ishii et al., 2005). Cependant, le gène *stx2* est de plus en plus retrouvé au niveau des souches d'*E. coli* comme les souches O26 qui sont de plus en plus détectées dans le monde, provoquant des SHU (Bielaszewska et al., 2013). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cela comme le fait que la production de Stx par les STEC peut être considérablement augmentée par certains agents antimicrobiens et endommageant d'ADN, tels que la ciprofloxacine et la mitomycine C, respectivement (Scheutz et al., 2016). Il a également été constaté que la production de Stx était stimulée par les neutrophiles et la norépinéphrine dans le tractus gastro-intestinal, ce qui indique que l'inductibilité de la toxine de Shiga joue un rôle dans la pathogenèse *in vivo* (Dowd et al., 2007). Des différences dans la composition de la séquence nucléotidique d'un certain nombre de bactériophages portant le gène codant pour Stx2 pourrait avoir une influence par rapport à la spécificité à l'hôte bactérien et sur la production des toxines (Schimizu et al., 2009 ; Sato et al., 2003).

Bien que de nombreux prophages Stx aient été étudiés et se soient révélés être l'un des éléments clés de diverses séquences génomiques de souches STEC, nous savons peu de choses sur la caractérisation génomique des phages induits à partir de souches STEC (Plunkett et al., 1999 ; Smith et al., 2012 ; Grande et al., 2014 ; Duan et al., 2018). Divers prophages sont présents dans les génomes bactériens contenant certains gènes critiques associés à la pathogenèse bactérienne et sont considérés comme des éléments génétiques mobiles qui jouent des rôles importants dans l'évolution bactérienne (Castillo et al., 2018). Les prophages Stx intégrés dans les génomes bactériens sont fortement liés à la pathogénicité humaine des souches STEC, entraînant un SHU avec de graves complications après l'infection (Krüger et Lucchesi, 2015). En raison de l'avancement de la technologie de séquençage du génome entier, plusieurs études ont révélé les preuves génomiques indiquant que l'acquisition de prophages Stx supplémentaires contribue à la pathogénicité accrue de nombreuses souches STEC associées à des épidémies (Quirós et Muniesa, 2017 ; Bai et al., 2019). Des études antérieures ont confirmé que les phages Stx, en tant que phages libres provenant de souches STEC par induction, présentaient un risque d'infecter des souches d'*E. coli* sensibles et de transférer des gènes *stx* pour former de nouveaux lysogènes (Muniesa et al., 2004 ; Smith et al., 2012 ; Zhang et al., 2020). Par conséquent, l'étude des phages induits, tels que les phages permettant le transfert de gènes *stx*, est importante pour comprendre la pathogénicité bactérienne médiée par les phages et l'émergence de nouvelles bactéries pathogènes STEC qui jouent des rôles importants dans l'évolution bactérienne (Castillo et al., 2018). Il est important de noter que les souches STEC produisant différents sous-types de Stx2 peuvent être associées à différents réservoirs animaux. Les souches d'*E. coli* produisant Stx2a, Stx2c et Stx2d, sont principalement isolées du réservoir bovin (Dehdashti et al., 2019). En général, il est concevable que les souches STEC produisant des sous-types Stx2 distincts aient acquis des avantages facilitant leur survie dans le réservoir spécifique. Dans cette étude, un phage Stx2d induit à partir d'une souche d'*E. coli* O80:H2 a été soumis à un séquençage du génome entier et à une caractérisation génomique pour mieux comprendre le rôle de ce phage Stx2d dans la pathogénicité et dans l'évolution de ces souches. Le choix

de restreindre cette étude au phage codant pour Stx2 est dû à l'observation que ce type de toxine est associée aux formes les plus sévères des infections chez l'homme (SHU) (Krüger et Lucchesi 2015). Une comparaison des génomes a montré que les EPEC bovines O80:H2 sont proches des STEC humaines O80:H2 mais ne renferment ni les gènes *stx*, ni les phages Stx (données non publiées). Il est donc possible que les souches EPEC bovines soient des souches AE-STECS ayant perdu les phages STX et les gènes *stx* ou bien représentent des précurseurs de souches AE-STECS qui acquerront les phages STX et les gènes *stx* dans le futur. Par conséquent, la troisième étude a porté sur l'étude de trois phages tempérés qui ont été induits et isolés de trois souches STEC bovine O80:H2 par rayonnement UV. La capacité des phages Stx2d à infecter une gamme de souches hôtes (O18:K1, K12-MG1655, K12-DH5 α , O80:H26, O80:H2 et l'ATCC25922) a été analysée et quatre de ces six souches hôtes : K12-MG1655, K12-DH5 α , O80:H26 et O80:H2 ont formé des plages de lyse. Le gène de la toxine de Shiga médié par le phage Stx2d a été transduit dans ces trois souches non-STECS. Ces transferts ont été confirmés par une PCR ciblant le gène *stx2d*. Un de ces phages (vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d) était stable dans les nouvelles souches STEC après trois repiquages successifs et présentait des résistances à température modérée (45°C) et à des conditions étendues de pH (pH2 à pH8).

Les souches STEC O80:H2 portant le gène de la toxine de Shiga *stx2d* médié par le phage pouvaient transduire la souche EPEC O80:H26 et des souches non-pathogènes telles que K12-MH1655 et K12-DH5 α , les convertissant en lysogènes stables. Cette transduction n'a par contre pas été concluante avec le sérotype EPEC O80:H2. Cette souche O80:H2 étant une souche sauvage peut développer un certain nombre de mécanismes de résistance pour contrecarrer l'action des bactériophages comme (1) des vésicules appelées « Outer Membrane Vesicles » (OMVs) qui permettent de détourner l'action des bactériophages (Grenier et al., 1995). Ces vésicules qui sont formées après la lyse de la bactérie par assemblage de certaines parties de la membrane décomposée vont agir comme leurre contre les bactériophages (Chattopadhyay et Jagannadham, 2015) (2) une altération du récepteur spécifique de la bactérie inhibant l'adsorption du phage (Seed, 2015) (3) des systèmes de surproduction de polysaccharides capsulaires ou d'immunoglobulines protéiques de la paroi cellulaire empêchent l'entrée de l'ADN phagique dans la cellule hôte, conférant ainsi une immunité bactérienne contre les phages surinfectants (Kim et al., 2015) (4) un système de défense inné impliquant 2 enzymes qui vont soit méthyler ou cliver d'ADN (Labrie et al., 2010) (5) des répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées (CRISPR) et les gènes associés aux CRISPR (cas) qui sont de nouveaux sujets fascinants. Les systèmes CRISPR-Cas bactériens confèrent une immunité contre l'entrée d'ADN étranger tel que les génomes de phages (Egido et al., 2022).

A l'inverse, les STEC O80 peuvent perdre des gènes *stx* à des fréquences appréciables, redevenant ainsi EPEC. En effet, les souches transduites avec les deux autres phages induits des souches STEC O80:H2 ont perdu le phage Stx2d après deux repiquages successifs. Les STEC/EPEC O80 représentent un système dynamique dans lequel la conversion bidirectionnelle produit des pathotypes différents ;

les bactériophages possédant les gènes codant pour les gènes *stx* sont les principaux éléments facilitant cette conversion. La capacité des souches STEC O80 à provoquer le SHU indique que ces organismes sont plus virulents que les souches EPEC dépourvues du gène *stx*. Si cela est vrai, une modification du pathotype de la souche infectante *E. coli* O80 au cours d'une infection par la perte ou l'acquisition d'un gène codant pour la toxine Stx pourrait avoir des implications cliniques. Par exemple, en utilisant le paradigme selon lequel la toxine Stx provoque le SHU, la perte d'un gène *stx* au début de l'infection, avant que la Stx ne soit produite, pourrait empêcher le développement du SHU chez le patient infecté. Il est bien connu que la capacité des bactéries productrices de Stx à provoquer des maladies graves chez l'homme est étroitement liée à la production des toxines Stx. La présence de plusieurs copies du gène *stx* chez le même hôte peut conduire à la production d'une plus grande quantité de Stx lors de la lyse, ce qui entraîne une pathologie grave. Il est donc nécessaire d'étudier la capacité des nouvelles souches lysogènes à produire les toxines Stx par ELISA et Western Blot afin de savoir si la quantité de toxines produites peut varier selon l'hôte comme observé par Khalil et ses collaborateurs (Khalil et al., 2016).

Concernant les analyses génomiques et la caractérisation du phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d, son ADN a été extrait puis son génome a été séquencé. Ce phage fait partie de la classe des *Caudoviricetes* et d'une famille et genre actuellement non identifiés. Le phage le plus proche du phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d est le phage Stx2_112808 (LC567830.1, 88% couverture, 98,03% séquence d'identité) et partage >95% d'identité avec sept autres phages. Les deux phages vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d et Stx2_112808 ont été comparés et cette comparaison montre une forte homologie au niveau des protéines de structure, de lyse, de métabolisme mais également au niveau des protéines intervenant dans la lysogénie. Il serait intéressant de réaliser une comparaison génomique d'une collection variée de phages Stx2d permettant ainsi de mieux en comprendre leur épidémiologie dans les différents sérotypes de souches STEC dont O80. D'autres résultats concernant la caractérisation du phage ont montré que le phage vB_EcoS_ULI-O80_Stx2d peut résister à des conditions modérées de température et de pH ce qui peut-être intéressant en terme de survie dans certains environnements spécifiques.

La détection d'homologie et la prédiction de structure par l'analyse HMM-HMM HHpred (Zimmerman et al., 2017) a révélé des protéines associées au cycle lysogénique comme une intégrase, une excosiniase et plusieurs protéines répresseur CI, CII et un antirépresseur. Le gène de l'intégrase joue un rôle important dans le cycle lysogène du phage tempéré (Balding et al., 2005). L'intégrase du phage est une enzyme associée à l'intégration du génome du phage dans les chromosomes bactériens au niveau de certains sites d'attachement (*attP* et *attB*) par un processus de recombinaison spécifique au site (Groth et Calos., 2004 ; Colavecchio et al., 2017). Les résultats de cette étude ont montré que le prophage Stx2d était intégré dans le site *yecE* du génome bactérien des trois souches transduites comme déjà décrit dans Nyambe et al., 2017 dont la fonction reste inconnue (Recktenwald et al., 2002). Une étude indique que la diversité génétique des gènes codant pour l'intégrase parmi les différents prophages Stx est liée aux

différents sites d'insertion de ces prophages dans le chromosome bactérien (Smith et al., 2007b). Dans le futur, il serait intéressant de transduire différents phages provenant de souches STEC O80:H2 dans ces mêmes souches hôtes afin de connaître le lien entre les gènes codants pour l'intégrase des différents prophages et le site d'insertion au niveau de ces bactéries.

Le phage Stx2d contient trois ARNt (deux ARNt-Arg et un ARNt-Met). Des études antérieures ont indiqué que les ARNt dans le génome des phages pourraient compenser les différences dans l'utilisation des codons et/ou des acides aminés entre les virus et les hôtes pour favoriser une synthèse efficace des protéines (Bailly-Bechet et al., 2007 ; Morgado et Vicente, 2019). Ainsi, les ARNt portés par les phages lysogènes présenteraient probablement un biais d'utilisation des codons proche de celui des hôtes, contribuant à la synthèse des protéines des prophages et à l'acquisition de caractéristiques des hôtes (Bailly-Bechet et al., 2007). La présence de gènes régulateurs comme le répresseur CI et l'antirépresseur dans les phages a été fortement associée à la régulation du processus d'induction des prophages Stx, déclenchant un cycle lytique des prophages pour lyser l'hôte bactérien et libérer les phages induits dans l'environnement (Smith et al., 2012 ; Steyert et al., 2012 ; Krüger et Lucchesi, 2015). L'excisionase Xis, si produite en quantité suffisante, va entraîner l'excision du phage du génome de l'hôte en se liant aux sites X1 et X2 en pliant l'ADN de manière significative et en recrutant l'intégrase codée par le phage au site P2. Le gène *nanS-p* présent dans la région Stx comme déjà observé (Zuppi et al., 2020) est l'homologue du gène bactérien *nanS*, qui code pour une estérase impliquée dans la métabolisation des acides sialiques produits par les glandes sous-maxillaires des bovins et présents en grande quantité dans leur tractus gastro-intestinal (Saile et al., 2018). Saile et al. ont suggéré que l'activité de l'estérase NanS supplémentaire pourrait fournir un avantage évolutif à la bactérie en facilitant l'utilisation des acides sialiques comme source d'ATP. Par conséquent, ce gène pourrait favoriser la colonisation du réservoir bovin par la dégradation et l'utilisation des acides sialiques de la mucine sous-maxillaire bovine. Les gènes *nanS-p* pourraient également provoquer, comme effet secondaire, une colonisation améliorée du tractus gastro-intestinal humain (Saile et al., 2018), facilitant l'apparition des formes les plus sévères des infections chez les humains.

Bien que l'on connaisse peu de choses sur les facteurs qui influencent la transduction des phages *in vivo*, le stress bactérien et l'induction de la réponse SOS pourraient faciliter le déplacement des phages, comme cela a déjà été observé *in vitro* (Khalil et al., 2016 ; cette étude). Les expériences *in vivo* dans les larves de *Galleria mellonella* ont montré que les souches transduites provoquaient des taux de mortalité significativement plus élevés que les souches non transduites respectives montrant que c'est le gène *stx2d* qui code pour la toxine de Shiga qui est en partie responsable de la virulence. La différence est moins flagrante entre les deux souches O80 car la souche *E. coli* O80:H26 possède des facteurs de virulence comme l'intimine (*eae*), l'entérohémolysine (*hly*) et des gènes présents sur le pS88 (*iron*, *iss*, *iha*).

Dans le futur, il serait intéressant de tester le transfert du gène médié par le phage Stx2d en injectant les souches EPEC et AE-STECS telles quelles dans les larves de *G. mellonella* mais également de tester le transfert de ce phage entre souches de sérotypes différents comme d'autres sérotypes non-classiques O123/186, O156, O177 et O182 étudiés en annexe. Aussi, afin de confirmer que les larves de *G. mellonella* sont bien mortes par toxicité due à la toxine produite par la bactérie et non par septicémie due à la multiplication de la bactérie, il serait nécessaire par la suite, de réaliser une titration des bactéries provenant de chaque groupe de larves afin d'en connaître leur concentration.

Malgré que leur système immunitaire présente certaines similarités à celui des humains, les larves de *G. mellonella* représentent un modèle assez préliminaire, le passage à des modèles mammifères tel que la souris permettrait d'approfondir les résultats obtenus dans ce modèle pour ensuite passer aux bovins. La capacité des phages codant pour les gènes *stx* provenant d'isolats cliniques d'AE-STECS O26 et O157 à transduire les souches de laboratoire K-12 d'*E. coli*, des *E. coli* commensaux et des EPEC de diverses origines dans le tractus gastro-intestinal a été démontrée *in vivo* chez les souris (Zhang et al., 2000), les moutons (Cornick et al., 2006) et les mouches domestiques (*Musca domestica*) (Petridis et al. 2006) et dans des boucles iléales ligaturées de porc (Toth et al., 2003). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle une interconversion entre les EPEC et AE-STECS O26 peut se produire dans l'intestin humain au cours d'une infection. Cependant, les conditions favorisant le transfert ou la perte lysogénique *in vivo* sont mal connues (Toth et al., 2003 ; Zhang et al., 2000) et nécessitent des études supplémentaires.

Pour conclure, cette étude a permis de montrer que les EPEC et les AE-STECS O80:H2 sont présents chez les veaux diarrhéiques et présentent une relation génétique étroite avec les souches humaines du même sérotype. Ce dernier est cependant absent chez les veaux sains, mais il est nécessaire de contrôler cette absence en vérifiant la prévalence de ce sérotype dans d'autres abattoirs. Ces veaux sains peuvent par contre être porteurs sains d'AE-STECS et d'EPEC et donc pourraient être responsable de contamination humaine. La transduction du gène *stx2d* médiée par le phage Stx2d a donné des débuts de réponse concernant l'évolution des EPEC et des AE-STECS O80:H2. En effet, le gène *stx2d* peut-être transduit à d'autres souches non-STECS, ceci permet de confirmer qu'une souche non pathogène peut le devenir facilement suite à l'induction d'un bactériophage par un stress environnemental tel que les UV. Ce résultat rejoint l'hypothèse émise dans l'analyse phylogénétique de la première étude où les EPEC O80:H2 peuvent devenir AE-STECS par acquisition du phage Stx et donc du gène *stx*. De plus, cette étude a montré que les souches nouvellement transduites sont significativement plus virulentes que les souches non transduites, ce qui suggère le rôle important du phage Stx2d dans la pathogénicité.

L'émergence du sérotype O80:H2 est à surveiller car la contamination des STECS O80:H2 due à des événements de transduction du phage Stx pourrait malheureusement devenir un phénomène courant et

des infections médiées par les STEC et sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques (Martínez-Castillo et Muniesa, 2014). Malgré les importantes améliorations apportées à la compréhension du mécanisme d'infection des STEC, il n'existe actuellement aucune prise en charge explicite et efficace. Un nouveau concept pour le contrôle de l'infection aux STEC a été étudié grâce à des données *in vivo* et *in vitro* et des essais cliniques chez l'homme qui ont permis de déterminer l'efficacité d'un traitement symbiotique (probiotique + prébiotique). Une méthodologie simple, économique et fiable a également été déterminée pour comprendre et différencier le mécanisme des infections aux STEC et non-STEC (Hwang et al., 2021). Des études récentes ont également utilisé des cribles génomiques médiés par CRISPR-Cas9 pour identifier les facteurs de la cellule hôte nécessaire à l'action des Stx. La compréhension moléculaire de la biosynthèse de Gb3 a fourni de nouvelles cibles pour le développement d'inhibiteurs capables de protéger les cellules contre les toxines Stx. Il est intéressant de noter que la protéine thérapeutique à base de toxines Stx est entrée en phase d'essais cliniques, ce qui ouvrira la voie à des applications biomédicales plus larges des outils et des thérapeutiques à base de toxines (Liu et al., 2021).

Malgré les énormes progrès réalisés dans les études sur divers aspects des STEC et des phages Stx, il semble que nous soyons encore loin de comprendre les détails de leur diversité, de leur évolution, de leur distribution et des mécanismes moléculaires de leur fonctionnement. La gestion efficace des maladies causées par les STEC nécessite une compréhension détaillée des mécanismes de pathogénicité et de l'épidémiologie, ainsi que le développement de méthodes de diagnostic rapides et précises (Paletta et al., 2020).

Annexe :

Etude sur cinq autres
sérogroupe

Préambule

Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) des bovins ont reçu peu d'attention, bien que plusieurs appartiennent aux sérotypes O les plus notoires d'AE-STECS, comme O26:H11 responsable de nombreuses infections chez les bovins et les humains. Néanmoins, les sérotypes O et les virulotypes de la grande majorité des EPEC bovines restent non identifiés. Cette étude a recherché 5 sérotypes O non classiques (O123/186, O156, O177, O182 et O183) par PCR parmi trois collections d'EPEC bovines, une de jeunes veaux diarrhéiques, une de jeunes veaux sains dans des fermes laitières et une de bovins sains à l'abattoir. Les virulotypes obtenus par séquençage du génome entier de plusieurs EPEC bovines O156, O177 et O182 étaient étroitement apparentés aux virulotypes de 10 AE-STECS bovines et humaines du même sérotype. Ces résultats ont permis d'identifier de nouveaux sérotypes O:H d'EPEC chez les bovins et de spéculer sur leur évolution vers des ou leur origine à partir d'AE-STECS par acquisition ou perte de phages Stx.








Identification of five serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrheic calves and healthy cattle in Belgium and comparative genomics with Shigatoxigenic *E. coli*

Veterinary Sciences

Audrey Habets¹, Pierrick Lucas², Fabrice Touzain², Nguyen Thi Thu Huong³, Atsushi Iguchi³, Florence Crombé⁴, Nicolas Korsak⁵, Denis Piérard⁴, Marc Saulmont⁶, Eric Cox⁷, Frederik Engelen⁷, Jacques G. Mainil¹, Damien Thiry^{1,*}

Article

Identification of Five Serotypes of Enteropathogenic *Escherichia coli* from Diarrheic Calves and Healthy Cattle in Belgium and Comparative Genomics with Shigatoxigenic *E. coli*

Audrey Habets ¹, Fabrice Touzain ², Pierrick Lucas ², Nguyen Thi Thu Huong ³, Atsushi Iguchi ³, Florence Crombé ⁴, Nicolas Korsak ⁵, Denis Piérard ⁴, Marc Saulmont ⁶, Eric Cox ⁷, Frederik Engelen ⁷, Jacques Mainil ¹ and Damien Thiry ^{1,*}

- ¹ Bacteriology, Department of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Centre for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège, Quartier Vallée II, Cureghem Avenue 6, B-4000 Liège, Belgium
 - ² Viral Genetics and Bio-Security Unit, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), 22440 Ploufragan, France
 - ³ Department of Environment and Resource Sciences, University of Miyazaki (UoM), Miyazaki 889-2192, Japan
 - ⁴ Belgian National Reference Center STEC, Universitair Ziekenhuis Brussel (UZ Brussel), Vrije Universiteit Brussel (VUB), B-1090 Brussels, Belgium
 - ⁵ Food Microbiology, Department of Food Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Centre for Fundamental and Applied Research in Animals and Health (FARAH), University of Liège (ULiège), B-4000 Liège, Belgium
 - ⁶ Regional Agency for Animal Health and Identification (ARSIA), B-5590 Ciney, Belgium
 - ⁷ Laboratory of Immunology, Department of Virology, Parasitology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium
- * Correspondence: damien.thiry@uliege.be



Citation: Habets, A.; Touzain, F.; Lucas, P.; Huong, N.T.T.; Iguchi, A.; Crombé, F.; Korsak, N.; Piérard, D.; Saulmont, M.; Cox, E.; et al. Identification of Five Serotypes of Enteropathogenic *Escherichia coli* from Diarrheic Calves and Healthy Cattle in Belgium and Comparative Genomics with Shigatoxigenic *E. coli*. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 492. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090492>

Academic Editor: László Fodor

Received: 30 June 2022

Accepted: 7 September 2022

Published: 10 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from cattle receive little attention, although some belong to the most notorious O serotypes of attaching/effacing Shigatoxigenic *Escherichia coli* (AE-STEC) responsible for the uremic and hemolytic syndrome in humans, such as O26. Nevertheless, the O serotypes and virulotypes of the large majority of bovine EPEC remain unidentified. This study aimed to identify five non-classical O serotypes (O123/186, O156, O177, O182, and O183) by a polymerase chain reaction (PCR) among three collections of bovine EPEC from young diarrheic calves, healthy cattle at slaughterhouses, and healthy calves in dairy farms. The virulotypes and sequence types (STs) obtained after the whole genome sequencing of several O156, O177, and O182 bovine EPEC were closely related or identical to the virulotypes and STs of ten bovine and the human AE-STEC of the same O:H serotype. This study allows us to identify more EPEC O serotypes from cattle and to speculate on their evolution.

Abstract: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) produce attaching/effacing (AE) lesions and cause non-bloody diarrhea in mammals. A minority of bovine EPEC belong to one of the ten classical serotypes of human and bovine AE-STEC. The purpose of this study was to identify five non-classical O serotypes (O123/186, O156, O177, O182, and O183) among bovine EPEC and to characterize their virulence repertoires by whole genome sequencing. Around 40% of the 307 EPEC from 307 diarrheic calves, 368 EPEC from 47 healthy cattle, and 131 EPEC from 36 healthy calves in dairy farms were analyzed. Serotype O177 was the most frequent among EPEC from diarrheic and healthy calves, while the O156 was the most frequent in healthy cattle. The genomic analysis identified different H serotypes, MLSTypes, and/or *eae* gene subtypes among the O156 and O177 EPEC, while the O182 was homogeneous. The virulence gene profiles of bovine EPEC were closely related to each other and to the profiles of ten bovine and human AE-STEC. These results emphasize the need for additional studies to identify more O:H serotypes of bovine EPEC and to elucidate their origin and evolution of EPEC with regard to AE-STEC belonging to the same O:H serotypes.

Keywords: *Escherichia coli*; EPEC; AE-STEC; diarrheic calves; healthy cattle; healthy calves

1. Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) are responsible for non-bloody diarrhea in humans and several animal species. They produce “Attaching/Effacing” (AE) histological lesions and harbor a pathogenicity island (the Locus of Enterocyte Effacement, or LEE), carrying genes coding for a type-3-secretion-system (T3SS), different type-3-secreted-effectors (T3SE), and the intimin adhesin (*eae*). EPEC are subdivided into “typical (t) EPEC,” producing the “Bundle Forming Pili” (BFP), type 4 fimbriae, and “atypical (a) EPEC” not producing the BFP. tEPEC are associated with humans, while aEPEC are isolated from humans and from different animal species, including young diarrheic calves and healthy cattle [1,2].

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are also important human pathogens responsible for hemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uraemic syndrome (HUS). Since EHEC produce both AE lesions and Shiga toxins (Stx) and harbor the *eae* gene and one or more *stx* genes located on lambdoid phages (Stx phages) [2], they will be called “Attaching/Effacing Shigatoxigenic *E. coli*” (AE-STEC) in this manuscript [3]. The most frequent and pathogenic human AE-STEC belong to the “gang of seven” serotypes (O26:H11, O103:H2, O111:H-, O121:H9, O145:H-, O157:H7, and O165:H25), while the majority of AE-STEC isolated from diarrheic calves belong to a few serotypes (O5:H-, O26:H11, O103:H2, O111:H-, and O118:H16) [1–4].

EPEC can belong to host-specific (such as O127 in humans or O15 in rabbits) or to host-non-specific serotypes, including the “gang-of-seven” serotypes, such as O26:H11 and O111:H- in calves [1,2]. However, bovine EPEC have received little attention compared to bovine and human AE-STEC, and the serotypes of the majority of bovine EPEC remain unidentified. Following genetic serotyping results of a dozen of unidentified AE-STEC and EPEC from diarrheic calves [4], six new serotypes were identified: O80, O123/186, O156, O177, O182, and O183 (Iguchi and Mainil, unpublished).

Studies on the O80 serotype have been published elsewhere [5]. The purpose of this study was, therefore, to (i) identify the other five new O serotypes amongst EPEC isolated from diarrheic calves, healthy calves, and healthy adult cattle; (ii) genetically compare these bovine EPEC with human and bovine AE-STEC belonging to the same serotypes.

2. Material and Methods

2.1. Previous Studies

The EPEC, from healthy cattle and calves, but not all from diarrheic calves, had already been tested with all PCRs for the “gang of seven” and three other O serotypes (O5, O80, and O118) [4,6,7], the ten most frequent and pathogenic STEC serogroups in humans and animals [8,9]. Therefore, a new list of priority serotypes of human and calf AE-STEC is proposed in this paper: the “gang of ten” (O5:H-, O26:H11, O80:H2, O103:H2, O111:H-, O118:H16, O121:H19, O145:H-, O157:H7, and O165:H25).

2.2. *Escherichia coli* Collections

EPEC, AE-STEC, and STEC were identified by a PCR for the *eae*, *stx1*, and *stx2* genes amongst 3 collections of *Escherichia coli* isolated from 307 diarrheic calves between 2009 and 2018 [4], from 368 healthy cattle at slaughterhouses between 2014 and 2015 [6], and from 131 healthy calves in dairy farms between June and October 2018 [10,11]. The strains from diarrheic calves were isolated from feces or intestinal contents of diarrheic and/or septicemic calves following the routine diagnostic procedure at ARSIA (Regional Agency for Animal Health and Identification), as reported elsewhere [4]. The other strains were isolated from intestinal samples of healthy cattle [6] and by the recto-anal mucosal swabbing of healthy calves [7].

2.3. Genomic O Serotyping

The first step was, therefore, to complete the PCR for the “gang of ten” O serotypes for the strains isolated from diarrheic calves. The “gang of ten” negative EPEC were

subsequently tested with a PCR for the newly identified O serotypes (O123/186, which cannot be differentiated by the PCR), O156, O177, O182, and O183), according to the published O serotype PCR scheme [8].

All O serotyping PCRs were carried out in a 25 µL volume containing a 1 × FastGene Optima HotStart Ready Mix (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland), primers (final concentration 10 µM, Eurogentec) (Table 1), and a 1 µL template DNA. The PCR was performed with the following amplification program: initial denaturation at 94 °C for 1 min followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, then annealing at 58 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 2 min [7].

Table 1. Primers used for the different PCRs.

Gene	Primer	Sequence 5'-3'	Amplicon Size (bp)	Reference
O123/186	O123/186-F	TITCAACAGGTTTCGAATGCC	362	[8]
	O123/186-R	CCCACCAATACCACTGGAATA		
O156	O156-F	GGAAAATGGAACATTTAGCGG	236	[8]
	O156-R	TCGGAGTGCCAACCAAAAATA		
O177	O177-F	CCGATACACCGGATGGATTAT	427	[8]
	O177-R	AAGCCAGTACCCAGAACAGGA		
O182	O182-F	CGGTGATGGTTCTATTCTTGG	502	[8]
	O182-R	TGCTTGCACCAACTGTGTTA		
O183	O183-F	CGTGGTAACCAATTCGCAA	666	[8]
	O183-R	GGGAATAACGAACGGTTTACA		

2.4. Whole Genome Sequencing

Genomic DNA was extracted (DNeasy[®] Blood & Tissue kit, Qiagen, Venlo, Belgium) after overnight growth on Luria-Bertani (LB) agar plates from a single colony of different EPEC that tested positive for one of the newly identified O serotypes. The genomes of 6 bovine AE-STEC (5 from diarrheic calves and 1 from healthy cattle) and of 4 human AE-STEC (from the National Reference Center for STEC) belonging to the newly identified O serotypes were also sequenced for comparison.

Genomic libraries were prepared according to the Nextera XT kit (Illumina) and sequenced on an Illumina Novaseq 6000 (ANSES, Unité génétique virale et Biosécurité, Ploufragan, France) with an SP flowcell and a Reagent Kit v1.5 Kit (300 cycles). The length of the raw read was 151. The raw read sequences were assembled into scaffolds using the SPADes and Shovill genome assembler version 3.13.0 [12]. The genomic sequences are available via the Bioproject PRJNA607625 and the GenBank accession numbers (see Supplementary Table S1a–c)

The O:H serotype encoding genes and different LEE-located and non-LEE-located virulence-associated genes were identified in the sequenced isolates using two databases of the Centre of Genomic Epidemiology (CGE) tools (www.genomicsepidemiology.org, accessed on 1 November 2021): SerotypeFinder 2.0 [13] and VirulenceFinder 2.0 [14]. The virulence genes were compared with Patric and Victors software [15]. The scaffolds of each isolate were tested with these tools with an identity threshold of 90% and a minimum length of 60%. The *eae* subtypes were detected with MyDb Finder 2.0 (see Supplementary Table S2) [16].

2.5. Phylogenetic Tree

The seven housekeeping genes (*adk*, *fumC*, *icd*, *gyrB*, *mdh*, *purA*, and *recA*) present in the sequenced strains were identified using the MLST Server 2.0 database [17], also available via the Centre for Genomic Epidemiology (CGE) website. In order to study the phylogenetic relationship of the sequenced *E. coli* strains, the concatenated sequences of the 7 genes were aligned with the sequences of related reference genes from GenBank [4], maintaining a length of 3424 nucleotides using Muscle in MEGA11 software. The phylogenetic relationships of all sequences were analysed with MEGA11 software using the Maximum

Likelihood method based on the Tamura–Nei model [18]. The statistical confidence for the tree was set by a bootstrap of 1000 replicates.

3. Results

3.1. Genomic O Serotyping

The “gang of ten” negative EPEC present in the three collections were subsequently tested by applying one triplex PCR for the O123/186, O156, and O177 serotypes and one duplex PCR for the O182 and O183 serotypes: 22% of EPEC isolated from the diarrheic calves, 22% of EPEC isolated from the healthy cattle, and 13% of EPEC isolated from the healthy calves tested positive. Serotypes O123/186, O177 (the most frequent), and O182 were detected amongst EPEC from the diarrheic calves and healthy calves compared to serotypes O156 (the most frequent), O177, and O182 amongst EPEC from the healthy cattle. No EPEC was positive with the PCR for the O183 serotype (see Supplementary Table S3a–c).

3.2. Identification of O:H Serotypes, MLSTypes, and Eae Gene Subtypes by WGS

Whole Genome Sequencing (WGS) was performed on thirty-four bovine EPEC and ten bovine or human AE-STECS for comparison. It included thirteen O156 (from the healthy cattle) along with two human and bovine AE-STECS, fifteen O177 (ten from the diarrheic calves, one from the healthy cattle, and four from the healthy calves) along with four human and bovine AE-STECS, six O182 (two from the diarrheic calves, two from the healthy cattle, and two from the healthy calves) along with four bovine and human AE-STECS.

Ten of the thirteen O156 EPEC, together with the two bovine and human AE-STECS, belonged to the O156:H25 serotype and carried the *eae* ζ gene subtype. However, the bovine EPEC and AE-STECS belonged to ST300 and the human AE-STECS to ST4942. The remaining three EPEC from the healthy cattle belonged to the O156:H8 serotype and ST327 and harbored the *eae* θ gene subtype (see Supplementary Table S1a).

Thirteen of the fifteen O177 EPEC belonged to the O177:H11 serotype and ST765, similarly to two bovine AE-STECS. The remaining two EPEC from the diarrheic calves belonged to the O177:H11 serotype and ST29 and to the O177:H25 serotype and ST342, like the human and the third bovine AE-STECS, respectively. Nevertheless, all 19 *eae* genes identified belonged to the *eae* β gene subtype (see Supplementary Table S1b).

All six O182 EPEC and four bovine and human AE-STECS belonged to the O182:H25 serotype and ST300 and carried the *eae* ζ gene subtype (see Supplementary Table S1c).

3.3. Identification of Virulotypes by WGS

Using VirulenceFinder 2.0 with an identity threshold of 90% and a minimum length of 60%, different LEE-located T3SS- and T3SE-encoding genes, non-LEE-located T3SE-encoding genes, and genes coding for other virulence-associated factors were detected (Table 2).

Four LEE-located (*espA/espB/espF/tir/espP*) and four non-LEE-located genes (*nleA/B/C/espI*) were detected in all or most of the EPEC. Conversely, the *cif/espI* genes were detected in all O177:H11/ST765 and in some O177:H11/ST29 and O177:H25/ST342 EPEC. The *cif* and *espI* genes were also detected in the three O156:H8/ST327 EPEC.

Similarly, different genes coding for other virulence-associated factors were detected in all of the EPEC, such as *gad*, *lpfA*, and *ehxA*, while other genes were associated with one or two serotypes, such as *etpD* with the O182:H25 and O156:H25 serotypes. Three genes (*katP*, *iha*, and *celb*) were detected in only a few of the EPEC (Table 2). The BFP type 4 fimbriae-encoding genes were not detected in any sequenced EPEC. The bovine and human AE-STECS had gene profiles identical or very similar to the gene profiles of the bovine EPEC belonging to the same serotype/ST, regardless of the *stx* subtype (Table 2).

Table 2. Comparison of the type 3 secretion system (T3SS)-, type 3-secreted effector (T3SE)-encoding genes and other virulence-associated-encoding genes identified by WGS in the bovine EPEC and bovine and human AE-STEC belonging to the O156, O177, and O182 O serotypes.

O:H Serotype (Nr. Isolates)	MLST (Nr. Isolates)	Host (Nr. Isolates)	Virulotype (Nr. Isolates)	LEE-Located T3SS- and T3SE-Encoding Genes: Nr. +Ve Isolates		Non-LEE-Encoded T3SE-Encoding Genes: Nr. +Ve Isolates			Other Virulence Genes: Nr. +Ve Isolates					
				<i>espA/espF/tir/espP</i>	<i>espB</i>	<i>nleA/B/C/espJ</i>	<i>cif</i>	<i>espI</i>	<i>gad/lpfA/ehxA</i>	<i>etpD</i>	<i>iss/tccP</i>	<i>efa1/astA</i>	<i>katP/iha/celB</i>	
O156:H8 (3)	ST327 (3)	HC (3)	<i>eaeθ</i> (3) ^b	0 to 3	3 ^o	0 to 3	3	0	3	0	0 to 3	0–1	0	
O156:H25 (12)	ST300 (11)	HC (11)	<i>eaeζ</i> (10) ^{c,d} <i>eaeζ, stx2g</i> (1) _c	10 1	10 ^o 1 ^o	10 1	0 0	0 0	10 1	10 1	6 1	0 0	0 0	
	ST4942 (1)	HU (1)	<i>eaeζ, stx1a</i> (1)	1	1 ^o	1	0	0	1	1	1	0–1	0	
O177:H11 (17)	ST765 (15)	DC (8)	<i>eaeβ</i> (8)	8	8	2 to 8	8	8	7	0	4 to 7	7	0–1	
		HC (1)	<i>eaeβ</i> (1)	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
		HCS (6)	<i>eaeβ, stx1a</i> (1)	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
			<i>eaeβ, stx2c</i> (1), <i>stx2c</i> (1)	1	1	1	1	1	1	4	0	1	1	0
	ST29 (2)	DC (1)	<i>eaeβ</i> (4) ^e	4	4	2 to 4	4	4	1	0	0–1	1	0–1	
HU (1)	<i>eaeβ</i> (1)	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0–1			
			<i>eaeβ, stx1a</i> (1)	1	1	1	0	0						
O177:H25 (2)	ST342 (2)	DC (2)	<i>eaeβ</i> (1)	0–1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	
			<i>eaeβ, stx2c</i> (1)	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	
O182:H25 (10)	ST300 (10)	DC (4)	<i>eaeζ</i> (2)	2	2 ^o	2	0	0	2	2	2	1	0	
			<i>eaeζ, stx1a</i> (2)	2	2 ^o	2	0	0	2	2	2	0–2	0–1	
		HC (2)	<i>eaeζ</i> (2)	2	2 ^o	2	0	0	2	2	2	2	0	
		HCS (2)	<i>eaeζ</i> (2) ^f	2	2 ^o	0–2	0	0	2	2	1–2	2	1–2	0
HU (2)	<i>eaeζ, stx1a</i> (2)		2	2 ^o	1–2	0	0	2	2	0–2	0	0		

DC = diarrheic calf; HC = healthy cattle; HU = human; HCS = healthy calves. ^b Two of these three EPEC were isolated from a single animal. ^c Three of these eleven EPEC and the AE-STEC were isolated from a single animal. ^d Four of these ten EPEC were isolated from another single animal. ^e These 4 EPEC were isolated from 2 different animals. ^f These 2 EPEC were isolated from 1 single animal. ^o Only detected by Patric/Victors.

3.4. Comparison of Serotypes, ST, and Virulotypes of EPEC from Diarrheic Calves, Healthy Cattle, and Healthy Calves

Differences between the three collections of EPEC were already present in the identified serotypes (ST1, 3). For instance, the serotypes O177:H11/H25 were more frequent in EPEC from calves that were either diarrheic or healthy than in healthy cattle, while the serotypes O156:H8/H25 were only present in EPEC from healthy cattle.

Five STs (ST29, ST300, ST327, ST342, and ST765) were identified in the sequenced EPEC (Figure 1): four in EPEC from the diarrheic calves (ST29, ST300, ST342, and ST765), three in EPEC from the healthy cattle (ST300, ST327, and ST765) and two in EPEC from the healthy calves (ST300 and ST765). ST342 and ST29 were only present in the diarrheic calves, and ST327 was only present in the healthy cattle.

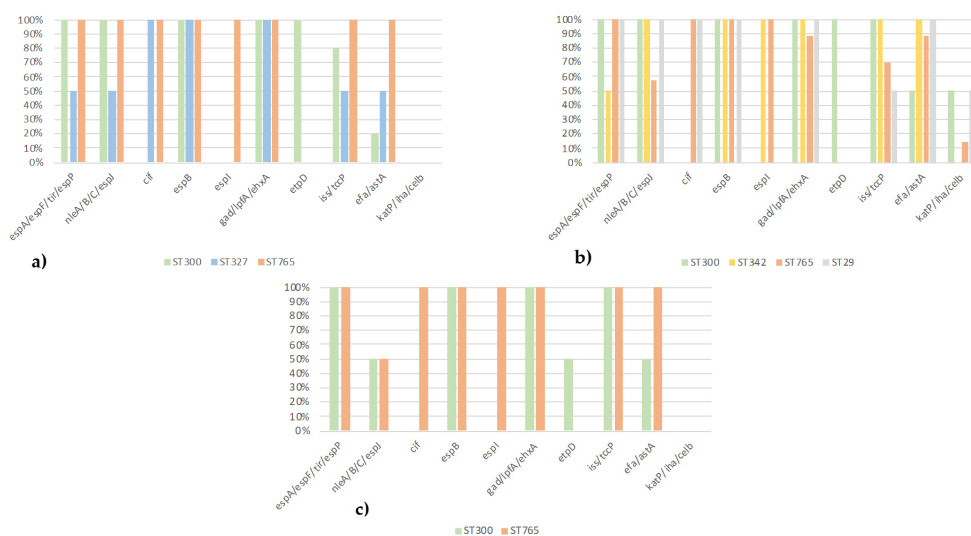


Figure 1. MLST prevalence by virulotyping in EPEC; (a) healthy cattle, (b) diarrheic calves, and (c) healthy calf strains.

Concerning the virulotyping, the EPEC from the diarrheic calves harbored the most virulence genes (Figure 1). In the EPEC ST765 of serotype O177:H11 from the diarrheic calves, healthy cattle, and healthy calves, not only all of the LEE-located T3SS- and T3SE-encoding genes and different non-LEE-located T3SE-encoding genes were detected, but also different other genes coding for virulence-associated factors, except the *etpD* gene (Table 2). This *etpD* gene was detected only in EPEC ST300 of serotypes O156:H25 and O182:H25 in the three collections. The *efa1/astA* genes were preferentially associated with EPEC O177:H11/ST765 and O182:H25/ST300, while the other genes (*iss/tccP/katP/ihfA/celb*) were not associated with a serotype or STs or collection.

Finally, the *eae* gene subtypes were associated with some STs (*eae*ζ and ST300, for instance) and to a lesser extent with the O:H (*eae*β and O177:H11/H25, for instance), but with none of the three collections (ST1).

3.5. Phylogenetic Analysis

A phylogenetic tree was constructed based on the seven housekeeping genes (*adhk*, *fumC*, *icd*, *gyrB*, *mdh*, *purA*, and *recA*) of all the genome-sequenced O156, O177, and O182 bovine and human EPEC and AE-*STEC*. Strains of different serogroups, laboratory strains, or other bacterial strains were used to build the tree in order to know where the sequenced strains were located.

With very few exceptions, all bovine and human EPEC and AE-STECS belonging to the same ST grouped together, while a second grouping basis was the H serotype. For instance, the EPEC and AE-STECS belonging to ST 29 (serotypes O177:H11), ST765 (serotype O177:H11), and ST327 (serotype O156:H8) were more closely related to each other than to those belonging to ST300 (serotypes O156:H25 and O182:H25).

Exceptions were (Figure 2): (i) the three bovine O156:H8/ST327 EPEC that were distantly related to the O156:H25/ST300 EPEC; (ii) the human AE-STECS O156:H25/ST4942 that grouped with all O182:H25/156:H25/ST300.

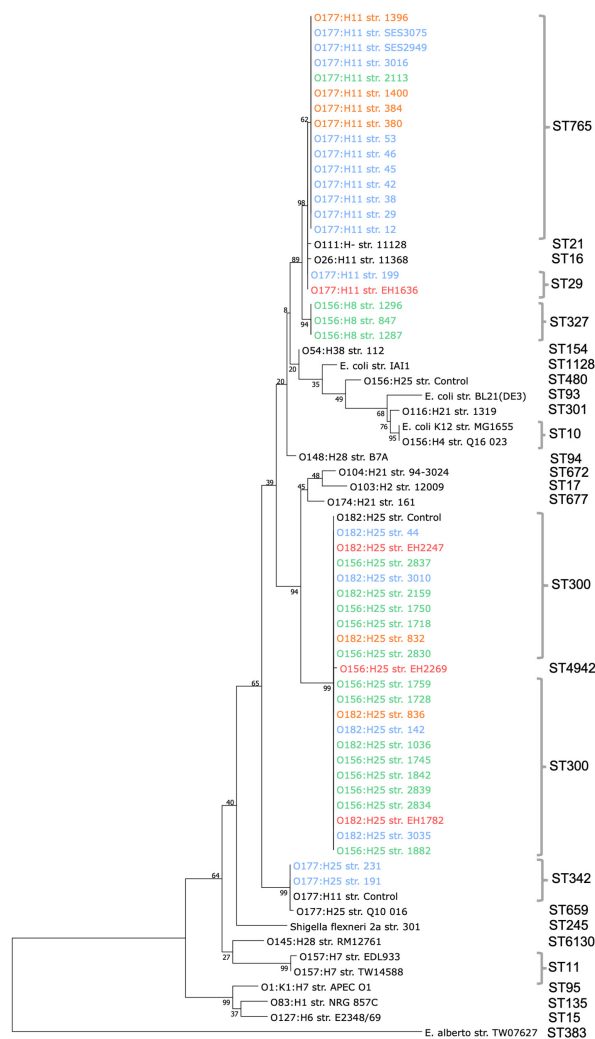


Figure 2. Phylogenetic tree of concatenated MLST gene alleles (*adh*, *fumC*, *icd*, *gyrB*, *mdh*, *purA*, and *recA*) extracted from the O156, O177, and O182. ■ healthy cattle, ■ diarrheic calves, ■ dairy calves, and ■ humans whose sequences of 3424 were compared to other strains based on [4,19]. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura–Nei model and 1000 bootstrap replicates [18]. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches.

4. Discussion

If the large majority of bovine and human AE-STECS belong to one of the “gang of ten” O serotypes, this is not the case for the bovine EPEC, whose majority remain unidentified [1,2]. Indeed, only 31% of EPEC from the diarrheic calves, 11% from the healthy cattle at slaughterhouses, and 29% from the healthy calves in dairy farms are PCR positive for one of the “gang of ten” O serotypes in Belgium (ST3) ([4,6,7,16] and this study). The first purpose of this study was, therefore, to identify and compare, by PCR and WGS, additional serotypes (O123/186, O156, O177, O182, and O183) in these three collections of bovine EPEC.

Of the “gang of ten” negative EPEC, 11%, 23%, and 17%, respectively, belong to one of these serotypes (ST1, 3): serotypes O177:H11/H25 and O123/186 are (almost) exclusively associated with EPEC from calves, whether diarrheic or healthy, while serotypes O156:H8/H25 are exclusively present amongst EPEC from cattle at slaughterhouses. Conversely, serotype O182:H25 is present in EPEC of all three collections, and no EPEC tested positive for the O183 serotype. Some of these “non-classical” serotypes have already been detected, though infrequently, among human AE-STECS in Belgium [19] and abroad [20–23] in association with diseases. In 2006, an infection caused by an AE-STECS O177 was described in Canada in a child suffering from bloody diarrhea and HUS [21]. In 2018, in the USA, three AE-STECS isolated from diarrheic calves belonged to the O177:H25 serotype and harbored the *stx2* gene [22]. In Germany, the serotype O156:H25 is present among AE-STECS from humans with diarrhea [23].

From a clonality point of view, the STs are related to the serotypes of the EPEC, especially to the H antigen (Figure 2), and not to their origins. They are also present in bovine and/or human AE-STECS belonging to the same serotypes (ST1). The most frequent STs are ST300 and ST765, exclusively associated with serotypes O156:H25 and O182:H25 and with serotype O177:H11, respectively. In a recent study, ST300 and ST765 have also been detected in bovine AE-STECS strains belonging to serotypes O156:H25 and O182:H25 and to serotype O177:H11, respectively [24]. On the other hand, *E. coli* diarrheic strains, ST300, are more rarely found in humans [25]. In these same studies, ST342 and ST327 were identified among the bovine AE-STECS strains of serotypes O177:H25 and O156:H8, as were the four bovine EPEC and AE-STECS in this work [24], and ST29 among human EPEC [26], as is the case of one bovine EPEC and one human AE-STECS in this work (ST1).

The second purpose of this study was to compare the virulence-associated gene repertoires of the genome-sequenced EPEC (Table 2) of the three collections belonging to serotypes O156, O177, and O182. Three *eae* gene subtypes are present, but here, too, are associated with the O:H serotype and not with the collections. They are also present in bovine and/or human AE-STECS belonging to the same serotypes: *eae* θ in the O156:H8 serotype, *eae* ζ in the O156:H25 and O182:H25 serotypes, and *eae* β in the O177:H11/H25 serotypes. It is noteworthy that the *eae* gene subtype of O156 EPEC is linked to the H serotype and ST, whereas this is not the case for O177 EPEC.

Several LEE-located and non-LEE-located T3SS- and T3SE-encoding genes and different other virulence-associated genes are present in all 34 EPEC whose genomes were sequenced, some of which are ST-associated (Table 2a,b, Figure 1). Although the *espB* gene is present in all the strains, this gene was not detected with the Virulence Finder in 25 strains of the serotypes O156:H8, O156:H25, and O182:H25 (Table 2a). Since different *espB* variants can be present in EPEC and AE-STECS [26,27], we can hypothesize a lack of sensitivity of this software to detect all variants. Strains isolated from diarrheic calves have more potential virulence factors, such as *katP/iha/celB*, than those of the other two collections, suggesting that these genes would intervene at the level of the disease. The question that arises is: “is it a coincidence or did these strains emerge in these diarrheic calves as a result of a predisposing cause?”. The *iss* gene, which is a plasmid-located gene, a.o. on the pS88 plasmid of the invasive neonatal meningitis-associated *E. coli* (NMEC), and avian pathogenic *E. coli* (APEC) [28], is present in a large majority of the strains. However, the other pS88 plasmid-located genes were not detected, nor were other invasive-associated genes. The

actual invasive capacity of these EPEC cannot be confirmed at this stage. Moreover, these 34 bovine EPEC are aEPEC since the BFP type 4 fimbriae-encoding genes were not detected.

With regard to the *stx* genes, the *stx1a* gene is present in eight of the ten genome-sequenced bovine and human AE-STEC of different serotypes: the *stx2c* gene in one O177:H25 AE-STEC from a diarrheic calf and the *stx2g* in one bovine O156:H25 AE-STEC from the healthy cattle (ST1). The *stx2c* and *stx1a* genes are frequently detected in AE-STEC from cattle and humans, while the *stx2g* gene described in 2003 [29] is much rarer and is more frequently associated with cattle (healthy adults and diarrheic calves) and the environment than with humans [30–32].

Two questions need to be answered in the future: (i) Are the “non-gang of ten” EPEC really pathogenic in calves and/or in humans? (ii) Are they derivatives or precursors of AE-STEC? With regard to the former question, no or only a few data on these serotypes are available in the literature [16,21–23] to the authors’ knowledge, although some of them are clearly associated with diarrhea in calves in this study, such as O177:H11 (ST3a and 1b). As for the latter question, the 10 O156, O177, and O182 bovine and human AE-STEC, whose genomes were also sequenced, harbor identical to closely related virulence-associated gene repertoires compared to bovine EPEC belonging to the same serotypes (ST1 and Table 2). The presence of different *stx* genes in the 10 AE-STEC and the presence in a single animal of O156:H25 EPEC and AE-STEC (Table 2a) are also noteworthy. In the future, it would also be interesting to construct a phylogenetic tree based on the complete genomes, such as a single nucleotide polymorphism (SNP) [7], including even more sequences present in the Genbank.

5. Conclusions

Of the five newly identified serogroups, O177 was the most frequent among EPEC from diarrheic and healthy calves, while O156 was the most frequent in healthy cattle. The genomic analysis identified different H serotypes, MLSTypes, and/or *eae* gene subtypes among the O156 and O177 EPEC, while the O182 was homogeneous. The virulence gene profiles of bovine EPEC were closely related to each other and to the profiles of 10 bovine and human AE-STEC.

Although this study was conducted on a limited number of strains, the results emphasize that bovine EPEC, not only of the AE-STEC “gang of ten” but also of other serotypes, deserve more attention in epidemiological surveys and in genetics studies to identify: (i) all EPEC serotypes in cattle; (ii) the origin of the infection in calves, the calves themselves, or the cows in the farms; (iii) their actual role in calf diarrhea; (iv) the transmission routes to humans, if any, in order to prevent their spread; and (v) their evolution and relationship to bovine and human AE-STEC belonging to the same O:H serotypes. Increasing the knowledge of these rarer not only EPEC but also AE-STEC serotypes can help to anticipate and/or rapidly react to their emergence in humans, such as the O104:H4 STEC in Germany in 2011 [33] and the O80:H2 AE-STEC in France and Switzerland [34] more or less recently.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vetsci9090492/s1>, Table S1a: Serotypes, MLST and *eae* gene subtypes of the O156 EPEC and AE-STEC from diarrheic calves, healthy cattle, healthy calves and humans; Table S1b: Serotypes, MLST and *eae* gene subtypes of the O177 EPEC and AE-STEC from diarrheic calves, healthy cattle, healthy calves and humans; Table S1c: Serotypes, MLST and *eae* gene subtypes of the O182 EPEC and AE-STEC from diarrheic calves, healthy cattle, healthy calves and humans; Table S2: Sequences included in the databases to identify *eae* subtypes; Table S3a: O serotypes of 126 EPEC isolated from calves with diarrhea; Table S3b: O serotypes of 122 EPEC isolated from healthy cattle at slaughterhouse; Table S3c: O serotypes of 60 EPEC isolated from healthy calves in dairy farms.

Author Contributions: Conceptualization, J.M., D.T. and A.H.; Methodology, A.H., F.T., P.L., N.T.T.H., A.I., F.C., D.P., N.K., F.E. and M.S.; Investigation, A.H.; Writing—Original Draft Preparation, A.H. and J.M.; Writing—Review & Editing, F.T., N.T.T.H., F.C., D.P., E.C. and D.T.; Supervision, D.T. and J.M.; Project Administration, J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the University of Liège (“Fonds Spéciaux de la Recherche, 2016–2018 and 2018–2020”).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data were submitted to the NCBI GenBank under accession number PRJNA607625.

Acknowledgments: The authors wish to thank Yannick Blanchard from ANSES, Ploufragan, France, for the helpful discussions on the genomic analysis, Klara de Rauw from AZ Sint-Lucas, Gent, Belgium for the database of the *ea*e variants, and Jean-Noël Duprez from ULiège, Belgium, for the helpful discussions on the PCR results.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mainil, J.G.; Fairbrother, J.M. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*; Morabito, S., Ed.; Horizon Scientific Press and Caister Academic Press: Norwich, UK, 2014; pp. 19–43.
2. Tozzoli, R.; Scheutz, F. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. In *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*; Morabito, S., Ed.; Horizon Scientific Press and Caister Academic Press: Norwich, UK, 2014; pp. 1–18.
3. Piérard, D.; De Greve, H.; Haesebrouck, F.; Mainil, J.G. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Respective role of cattle and humans. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fakhri, I.; Thiry, D.; Duprez, J.N.; Saulmont, M.; Iguchi, A.; Piérard, D.; Jouant, L.; Daube, G.; Ogura, Y.; Hayashi, T.; et al. Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. *Vet. Microbiol.* **2017**, *202*, 16–22. [[CrossRef](#)]
5. Habets, A.; Crombé, F.; Nakamura, K.; Guérin, V.; De Rauw, K.; Piérard, D.; Saulmont, M.; Hayashi, T.; Mainil, J.G.; Thiry, D. Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 from diarrheic and septicemic calves and relatedness to human Shigatoxigenic *E. coli* O80:H2. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *130*, 258–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Thiry, D.; De Rauw, K.; Takaki, S.; Duprez, J.N.; Iguchi, A.; Piérard, D.; Korsak, N.; Mainil, J.G. Low prevalence of the “gang of seven” and absence of the O80:H2 serotypes among Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in intestinal contents of healthy cattle at two slaughterhouses in Belgium in 2014. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 867–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Habets, A.; Engelen, F.; Duprez, J.N.; Devleeschauwer, B.; Heyndrickx, M.; De Zutter, L.; Thiry, D.; Cox, E.; Mainil, J.G. Identification of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes in healthy young dairy calves in Belgium by recto-anal mucosal swabbing. *J. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 167. [[CrossRef](#)]
8. Iguchi, A.; Iyoda, S.; Seto, K.; Morita-Ishihara, T.; Scheutz, F.; Ohnishi, M. The pathogenic *E. coli* working group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: A comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2427–2432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Mekata, H.; Iguchi, A.; Kawano, K.; Kirino, Y.; Kobayashi, I.; Misawa, N. Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 1269–1274. [[CrossRef](#)]
10. Engelen, F.; Thiry, D.; Devleeschauwer, B.; Heyndrickx, M.; Mainil, J.; De Zutter, L.; Cox, E. Pathogenic potential of *Escherichia coli* O157 and O26 isolated from young Belgian dairy calves by recto-anal mucosal swab culturing. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 964–972. [[CrossRef](#)]
11. Engelen, F.; Thiry, D.; Devleeschauwer, B.; Mainil, J.; De Zutter, L.; Cox, E. Occurrence of ‘gang of five’ Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups on Belgian dairy cattle farms by overshoe sampling. *Lett. Appl. Microbiol.* **2021**, *72*, 415–419. [[CrossRef](#)]
12. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its application to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)]
13. Joensen, K.G.; Tetzschner, A.M.M.; Iguchi, A.; Aarestrup, F.M. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2410–2426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Joensen, K.G.; Scheutz, F.; Lund, O.; Hasman, H.; Kaas, R.S.; Nielsen, E.M.; Aarestrup, M. Real-time whole genome sequencing for routine typing, surveillance and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1501–1510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Brettin, T.; Davis, J.J.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Gerdes, S.; Olsen, G.J.; Olson, R.; Overbeek, R.; Parrello, B.; Pusch, G.D.; et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8365. [[CrossRef](#)]
16. De Rauw, K.; Thiry, D.; Caljon, B.; Saulmont, M.; Mainil, J.G.; Piérard, D. Characteristics of Shigatoxin producing and enteropathogenic *Escherichia coli* of the emerging serotype O80:H2 isolated from humans and diarrhoeic calves in Belgium. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *25*, 111.e5–111.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Larsen, M.V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-pontén, T.; Ussery, D.W.; Aarestrup, F.M.; et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *52*, 1355–1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.9. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lukjancenko, O.; Wassenaar, T.M.; Ussery, D.W. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb. Ecol.* **2010**, *60*, 708–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. De Rauw, K.; Jacobs, S.; Piérard, D. Twenty-seven years of screening for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a university hospital. Brussels, Belgium, 1987–2014. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199968. [[CrossRef](#)]
21. Gilmour, M.W.; Tabor, H.; Wang, G.; Clark, C.G.; Tracz, D.M.; Olson, A.B.; Mascarenhas, M.; Karmali, M.A.; Mailman, T.; Ng, L. Isolation and genetic characterization of a coinfection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3771–3773. [[CrossRef](#)]
22. Sheng, H.; Duan, M.; Hunter, S.S.; Minnich, S.A.; Settles, M.L.; New, D.D.; Chase, J.R.; Fagnan, M.W.; Hovde, J. High-quality complete genome sequences of three bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O177:H- (*flhC*_{H25}) isolates harboring virulent *stx2* and multiple plasmids. *Genome. Announc.* **2018**, *6*, e01592-17. [[CrossRef](#)]
23. Bielaszewska, M.; Middendorf, B.; Ko, R.; Friedrich, A.W.; Fruth, A.; Karch, H.; Schmidt, M.A.; Mellmann, A. Shigatoxin-negative attaching and affacing *Escherichia coli*: Distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *47*, 208–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Barth, S.A.; Menge, C.; Eichhorn, I.; Semmler, T.; Wieler, L.H.; Pickard, D.; Belka, A. The accessory genome of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* defines a persistent colonization type in cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 5455–5464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yu, F.; Chen, X.; Zheng, S.; Han, D.; Wang, Y.; Wang, B.; Chen, Y. Prevalence and genetic diversity of human diarrheagic *Escherichia coli* isolates by multilocus sequence typing. *Int. J. Infect. Dis.* **2018**, *67*, 7–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bibbal, D.; Loukiadis, E.; Kérouredan, M.; Peytavin de Garam, C.; Ferré, F.; Cartier, P.; Gay, M.; Oswald, E.; Auvray, F.; Brugère, H. 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.* **2014**, *80*, 1177–1184. [[CrossRef](#)]
27. Matussek, A.; Jernber, C.; Einemo, I.M.; Monecke, S.; Ehrlich, R.; Engelmann, I.; Löfgren, S.; Mernelius, S. Genetic makeup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in relation to clinical symptoms and duration of shedding: A microarray analysis of isolates from Swedish children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 1433–1441. [[CrossRef](#)]
28. Peigne, C.; Bidet, P.; Mahjoub-Messai, F.; Plainvert, C.; Barbe, V.; Médigue, C.; Frapy, E.; Nassif, X.; Denamur, E.; Bingen, E.; et al. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2272–2284. [[CrossRef](#)]
29. Leung, P.H.; Peiris, J.S.; Ng, W.W.; Robins-Browne, R.M.; Bettelheim, K.A.; Yam, W.C. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 7549–7553. [[CrossRef](#)]
30. Nguyen, T.D.; Vo, T.T.; Vu-Khac, H. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J. Vet. Sci.* **2011**, *12*, 159–164. [[CrossRef](#)]
31. Dong, H.-J.; Lee, S.; Kim, W.; An, J.-U.; Kim, J.; Kim, D.; Cho, S. Prevalence, virulence potential, and pulsed-field gel electrophoresis profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle. *Gut. Pathog.* **2017**, *9*, 22. [[CrossRef](#)]
32. Okuno, K.; Awasthi, S.P.; Kopprio, G.A.; Iguchi, A.; Hatanaka, N.; Hinenoya, A.; Lara, R.J.; Yamasaki, S. Prevalence, O-genotype and Shiga toxin (Stx) 2 subtype of Stx-producing *Escherichia coli* strains isolated from Argentinean beef cattle. *J. Vet. Med. Sci.* **2021**, *83*, 630–636. [[CrossRef](#)]
33. Navarro-Garcia, F. *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: An enteroaggregative *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Microbiol. Spectr.* **2014**, *6*, 505–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ingelbeen, B.; Bruyand, M.; Mariani-Kurkjian, P.; Le Hello, S.; Danis, K.; Sommen, C.; Bonacorsi, S.; de Valk, H. Emerging Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O80 associated hemolytic and uremic syndrome in France, 2013–2016: Differences with other serogroups. *PLoS ONE* **2018**, *12*, e0207492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Table S1a. Serotypes, MLST and *eae* gene subtypes of the O156 EPEC and AE-STE C from diarrheic calves, healthy cattle, healthy calves and humans.

Isolate (year)	Host ^a	O:H serotype	MLST	<i>eae, stx</i> subtypes	GenBank accession numbers
847 (2014)	HC	O156:H8	ST327	<i>eae</i> _θ	SAMN14278591
1287 (2014) ^b	HC	O156:H8	ST327	<i>eae</i> _θ	SAMN14278592
1296 (2014) ^b	HC	O156:H8	ST327	<i>eae</i> _θ	SAMN14278593
1718 (2014)	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278594
1728 (2014) ^c	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278595
1745 (2014) ^c	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278596
1759 (2014) ^c	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278597
1842 (2014)	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278598
1882 (2014)	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278599
2830 (2014) ^d	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278600
2834 (2014) ^d	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278601
2837 (2014) ^d	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278602
2839 (2014) ^d	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ	SAMN14278603
1750 (2014) ^c	HC	O156:H25	ST300	<i>eae</i> _ζ , <i>stx</i> _{2g}	SAMN14278604
EH2269 (2013)	HU	O156:H25	ST4942	<i>eae</i> _ζ , <i>stx</i> _{1a}	SAMN14278609

^aDC = diarrheic calf; HC = healthy cattle; HU = human

^bthese 2 EPEC were isolated from a single animal

^cthese 3 EPEC and the AE-STE C were isolated from a single animal

^dthese 4 EPEC were isolated from a single animal

Table S1b. Serotypes, MLST and *eae* gene subtypes of the O177 EPEC and AE-STE C from diarrheic calves, healthy cattle, healthy calves and humans

Isolate (year)	Host ^a	O:H serotype	MLST	<i>eae, stx</i> subtypes	GenBank accession numbers
199 (2013)	DC	O177:H11	ST29	<i>eae</i> _β	SAMN14278583
231 (2014)	DC	O177:H25	ST342	<i>eae</i> _β	SAMN14278582
12 (2008)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278574
29 (2009)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278575
38 (2009)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278576
42 (2009)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278577
45 (2009)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278578
46 (2009)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278579
53 (2009)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278580
3016 (2015)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278583
2113 (2014)	HC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN14278590
380 (2018) ^b	HCS	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN29328416
384 (2018) ^b	HCS	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN29328417
1396 (2018) ^c	HCS	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN29328418
1400 (2018) ^c	HCS	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β	SAMN29328419
191 (2013)	DC	O177:H25	ST342	<i>eae</i> _β , <i>stx</i> _{2c}	SAMN14278584
SES2949 (2009)	DC	O177:H11	ST765	<i>eae</i> _β , <i>stx</i> _{1a}	SAMN29328420

SES3075 (2013)	DC	O177:H11	ST765	<i>eaeβ, stx1a</i>	SAMN29328421
EH1636 (2008)	HU	O177:H11	ST29	<i>eaeβ, stx1a</i>	SAMN14278608

^aDC = diarrheic calf; HC = healthy cattle; HU = human; HCS: healthy calves

^bthese 2 EPEC were isolated from a single animal

^cthese 2 EPEC were isolated from a single animal

Table S1c. Serotypes, MLST and *eae* gene subtypes of the O182 EPEC and AE-STEC from diarrheic calves, healthy cattle, healthy calves and humans

Isolate (year)	Host ^a	O:H serotype	MLST	<i>eae, stx</i> subtypes	GenBank accession numbers
44 (2009)	DC	O182:H25	ST300	<i>eaeζ</i>	SAMN14278587
3035 (2014)	DC	O182:H25	ST300	<i>eaeζ</i>	SAMN14278587
1036 (2014)	HC	O182:H25	ST300	<i>eaeζ</i>	SAMN14278605
2159 (2014)	HC	O182:H25	ST300	<i>eaeζ</i>	SAMN14278606
832 (2018) ^b	HCS	O182:H25	ST300	<i>eaeζ</i>	SAMN29328414
836 (2018) ^b	HCS	O182:H25	ST300	<i>eaeζ</i>	SAMN29328415
142 (2012)	DC	O182:H25	ST300	<i>eaeζ, stx1a</i>	SAMN14278588
3010 (2014)	DC	O182:H25	ST300	<i>eaeζ, stx1a</i>	SAMN14278589
EH1782 (2009)	HU	O182:H25	ST300	<i>eaeζ, stx1a</i>	SAMN14278610
EH2247 (2013)	HU	O182:H25	ST300	<i>eaeζ, stx1a</i>	SAMN14278607

^aDC = diarrheic calf; HC = healthy cattle; HU = human; HCS: healthy calves

^bthese 2 EPEC were isolated from a single animal

Table S2: Sequences included in the databases to identify *eae* subtypes

Gene	Accession number	Description
<i>eae</i> subtype α	AF022236.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype α	AF530555.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype β	AF453441.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype β	AF043226.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype Υ	AF071034.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype Υ/θ	AF025311.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype δ/κ	U66102.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype ε	AF116899.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype ζ	AF449417.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype η	AJ308550.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype ι	AJ308551.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype λ	AF530557.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype μ	AJ579305.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype ν	AJ579306.1	Intimin subtype, adhesin
<i>eae</i> subtype ξ	AJ705051.1	Intimin subtype, adhesin

Table S3a. O serotypes of 126 EPEC isolated from calves with diarrhea

O Serotype	Nr. Isolates EPEC (n=307) (%)	Reference
O5	0	4, 5, 16
O26	35 (11%)	This study
O80	54 (18%)	
O103	1 (<1%)	
O111	0	
O118	0	
O121	2 (<1%)	
O145	1 (<1%)	
O157	0	
O165	0	
O123/186	10 (3%)	
O156	0	
O177	21 (7%)	
O182	2 (<1%)	
O183	0	
Total	126 (41%)	

Table S3b. O serotypes of 122 EPEC isolated from healthy cattle at slaughterhouse

O Serotype	Nr. Isolates EPEC (n=368) (%)	Nr. Animals (= 47)	Reference
O5	0	0	7
O26	2 (<1%)	2	This study
O80	0	0	
O103	38 (12%)	7	
O111	0	0	
O118	0	0	
O121	0	0	
O145	0	0	
O157	0	0	
O165	0	0	
O123/186	0	0	
O156	67 (22%)	9	
O177	5 (2%)	1	
O182	10 (3%)	3	
O183	0	0	
Total	122 (40%)	22	

Table S3c. O serotypes of 60 EPEC isolated from healthy calves in dairy farms

O Serotype	Nr. Isolates (n=131) (%)	Nr. Animals (= 36)	Reference
O5	0	0	8
O26	4 (3%)	3	
O80	0	0	
O103	4 (3%)	2	
O111	5 (4%)	4	
O118	0	0	
O121	0	0	
O145	21 (16%)	9	
O157	4 (3%)	1	
O165	0	0	
O123/186	2 (2%)	1	This study
O156	0	0	
O177	17 (13%)	4	
O182	3 (2%)	1	
O183	0	0	
Total	60 (46%)	25	

Bibliographie

Abbani M.A., Papagiannis C.V., Sam M.D., Cascio D., Johnson R.C., Clubb R.T. Structure of the cooperative Xis-DNA complex reveals a micronucleoprotein filament that regulates phage lambda intasome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 13, 104:2109-14. DOI: 10.1073/pnas.0607820104

Ackermann H.-W. and DuBow M.S. *Viruses of Prokaryotes*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1987.

Ackermann H.-W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol*. 2001, 146, 843–857. DOI: 10.1007/s007050170120.

Ackermann H.-W. Classification of bacteriophages. In *The Bacteriophages*; Calendar, R., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2006; pp. 8–17.

Ackermann H.-W. and Eisenstark A. The Present State of Phage Taxonomy. *Intervirology*. 1974, 3, 201–219.

Ackermann H.-W. Bacteriophage classification. In *Bacteriophages: Biology and Applications*; Kutter, E.M., Sulakvelidze, A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.

Adriaenssens E.M., Wittmann J., Kuhn J.H., Turner D., Sullivan M.B., Dutilh B.E., Jang H.B., Van Zyl L.J., Klumpp J., Lobočka M., et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Arch. Virol*. 2018, 163, 1125–1129. DOI: 10.1007/s00705-018-3723-z

Adriaenssens E.M., Sullivan M.B., Knezevic P., Van Zyl L.J., Sarkar B.L., Dutilh B.E., Alfenas-Zerbini P., Lobočka M., Tong Y., Brister J.R., et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018–2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Arch. Virol*. 2020, 165, 1253–1260. DOI: 10.1093/sysbio/syz036

Afset J.E., Bevanger L., Romundstad P., Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiol*. 2004, 53:1137-1144. DOI: 10.1099/jmm.0.45719-0.

Aksenov S.V. Dynamics of the inducing signal for the SOS regulatory system in *Escherichia coli* after ultraviolet irradiation. *Mathematical biosciences*. 1999, 157: 269-286.

Alto N.M., Weflen A.W., Rardin M.J., Yarar D., Lazar C.S., Tonikian R., Koller A., Taylor S.S., Boone C., Sidhu S.S., Schmid S.L., Hecht G.A., Dixon J.E. The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. *J Cell Biol*. 2007, 24, 178:1265-78. DOI: 10.1083/jcb.200705021

Alto N.M., Shao F., Lazar C.S., Brost R.L., Chua G., Mattoo S., McMahon S.A., Ghosh P., Hughes T.R., Boone C., Dixon J.E. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell*. 2006, 13, 124:133-45. DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.031.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Amézquita-López B.A., Quiñones B., Lee B.G., Chaidez C. Virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014, 31,4:7. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00007.

Aminov R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 2010, 8, 1:134. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134.

Association régionale de santé et d'identification animal (ARSIA). Rapport d'activité et résultats de l'ARSIA. 2019. Document lié : <https://www.arsia.be/wp-content/uploads/documents-telechargeables/RA-2020-FR.pdf>

Badea L., Doughty S., Nicholls L., Sloan J., Robins-Browne R.M., Hartland E.L. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microb Pathog.* 2003, 34:205-15. DOI: 10.1016/s0882-4010(03)00026-3.

Bai X., Fu S., Zhang J., Fan R., Xu Y., Sun H., et al. Identification and pathogenomic analysis of an *Escherichia coli* strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype. *Sci Rep.* 2018, 8:6756. DOI: 10.1038/s41598-018-25233-x

Bai X., Scheutz F., Dahlgren H.M., Hedenström I., Jernberg C. Characterization of clinical *Escherichia coli* strains producing a novel shiga toxin 2 subtype in Sweden and Denmark. *Microorganisms.* 2021, 17, 9:2374. DOI: 10.3390/microorganisms9112374

Bailly-Bechet M., Vergassola M., Rocha E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. *Genome Res.* 2007, 17:1486-95. DOI: 10.1101/gr.6649807.

Balding C., Bromley S.A., Pickup R.W., Saunders J.R. Diversity of phage integrases in *Enterobacteriaceae*: development of markers for environmental analysis of temperate phages. *Environ Microbiol.* 2005, 7:1558-67. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00845.x

Baldini M.M., Kaper J.B., Levine M.M., Candy D.C., Moon H.W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1983, 2:534-8. DOI: 10.1097/00005176-198302030-00023.

Bando S.Y., Iamashita P., Guth B.E., Dos Santos L.F., Fujita A., Abe C.M., Ferreira L.R., Moreira-Filho C.A. A hemolytic-uremic syndrome-associated strain O113:H21 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* specifically expresses a transcriptional module containing *dicA* and is related to gene network dysregulation in Caco-2 cells. *PLoS One.* 2017, 12:e0189613. DOI: 10.1371/journal.pone.0189613

Bardiau M., Labruzzo S., Mainil J.G. Putative adhesins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serogroup O26 isolated from humans and cattle. *J Clin Microbiol.* 2009, 47:2090-6. DOI: 10.1128/JCM.02048-08.

Barylski J., Enault F., Dutilh B.E., Schuller M.B., Edwards R.A., Gillis A., Klumpp J., Knezevic P., Krupovic M., Kuhn J.H., et al. Analysis of Spounaviruses as a Case Study for the Overdue Reclassification of Tailed Phages. *Syst. Biol.* 2020, 69, 110–123.

Barylski J., Kropinski A.M., Alikhan N.-F., Adriaenssens E.M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herelleviridae. *J. Gen. Virol.* 2020, 101, 3–4. DOI: 10.1093/sysbio/syz036

Batisson I., Guimond M.P., Girard F., An H., Zhu C., Oswald E., Fairbrother J.M., Jacques M., Harel J. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2003, 71:4516-25. DOI: 10.1128/IAI.71.8.4516-4525.2003

Beghain J., Bridier-Nahmias A., Le Nagard H., Denamur E., Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom.* 2018, 4:e000192. DOI: 10.1099/mgen.0.000192.

Bergan J., Berit A., Lingelem D., Simm R., Skotland T., Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon.* 2012, 60, 1085–1107. DOI : 10.1016/j.toxicon.2012.07.016

Berger C.N., Crepin V.F., Baruch K., Mousnier A., Rosenshine I., Frankel G. EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation. *mBio.* 2012, 2, 3:e00317-12. DOI: 10.1128/mBio.00317-12

Besser T.E., Richards B.L., Rice D.H., Hancock D.D. *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol Infect.* 2001, 127:555-60. DOI: 10.1017/s095026880100615x.

Beutin L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res.* 1999, 30:285-298.

Beutin L. and Fach P. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*; Sperandio V., Hovde C.J., Eds.; ASM Press: Norwich, UK; Washington, DC, USA, 2015; pp. 263–295;

Bidet P., Mahjoub-Messai F, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E and Bonacorsi S. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis.* 2007, 196:297-303.

Bielaszewska M., Stoewe F., Fruth A., Zhang W., Prager R., Brockmeyer J., Mellmann A., Karch H., Friedrich A.W. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *J Clin Microbiol.* 47:2061–2066. DOI: 10.1128/JCM.00201-09

Bielaszewska M., Mellmann A., Bletz S., Zhang W., Köck R., Kossow A., Prager R., Fruth A., Orth-Höller D., Marejková M., Morabito S., Caprioli A., Piérard D., Smith G., Jenkins C., Curová K., Karch H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis.* 2013, 56:1373-81. DOI: 10.1093/cid/cit055

Biemans-Oldehinkel E., Sal-Man N., Deng W., Foster L.J., Finlay B.B. Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2011, 193:5514-9. DOI: 10.1128/JB.05235-11.

Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dahbi G., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin) producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *J Clin Microbiol.* 2004b, 42: 645–651. DOI: 10.1128/JCM.42.2.645-651.2004.

Bläsi U. and Young R. Two beginnings for a single purpose: the dual-start holins in the regulation of phage lysis. *Mol Microbiol.* 1996, 21:675-82. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.331395.x

Bonanno L, Loukiadis E, Mariani-Kurkdjian P, Oswald E, Garnier L, Michel V, et al. 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.* 2015;81(11):3712–21.

Born Y., Bosshard L., Duffy B., Loessner M.J., Fieseler L. Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds. *Bacteriophage.* 2015, 24, 5:e1074330. DOI: 10.1080/21597081.2015.1074330.

Bradley D.E. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 1967, 31, 230–314. DOI: 10.1128/br.31.4.230-314.1967.

Bray, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *Journal of Pathology and Bacteriology.* 1945, 57:239-47.

Breitbart M. Marine viruses: truth or dare. *Ann Rev Mar Sci.* 2012, 4:425-48. DOI: 10.1146/annurev-marine-120709-142805

Browne A.S., Midwinter A.C., Withers H., Cookson A.L., Biggs P.J., Marshall J.C., Benschop J., Hathaway S., Haack N.A., Akhter R.N. et al. Molecular epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on New-Zealand dairy farms: Application of a culture-independent assay and whole-genome sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 84 : e00481-18. DOI: 10.1128/AEM.00481-18

Brunder W., Khan A.S., Hacker J., Karch H. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infect Immun.* 2001, 69:4447-57. DOI: 10.1128/IAI.69.7.4447-4457.2001.

Bruyand M., Mariani-Kurkdjian P., Le Hello S., King L.A., Van Cauteren D., Lefevre S., et al. Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Euro Surveill.* 2009, 24:1800068. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800068

Buchholz U., Bernard H., Werber D., Böhmer M.M., Renschmidt C., Wilking H., Deleré Y., an der Heiden M., Adlhoch C., Dreesman J., et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N. Engl. J. Med.* 2011, 365:1763–1770. DOI: 10.1056/NEJMoa1106482.

Bugarel M., Beutin L., Scheutz F., Loukiadis E., Fach P. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 2275–2281. DOI: 10.1128/AEM.02832-10.

Campellone K.G., Robbins D., Leong J?M. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell.* 2004, 7:217-28. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.07.004.

Casjens S.R. and Hendrix R.W. Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. *Virology.* 2015, 479–480, 310–330. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.010.

Castillo D., Kauffman K., Hussain F., Kalatzis P., Rørbo N., Polz M.F., Middelboe M. Widespread distribution of prophage-encoded virulence factors in marine *Vibrio* communities. *Sci Rep.* 2018, 2, 8:9973. DOI: 10.1038/s41598-018-28326-9

Chattopadhyay M.K., Jagannadham M.V. Corrigendum: Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. *Front Microbiol.* 2015, 10, 6:974. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00974.

Chauthaiwale V.M., Therwath A., Deshpande V.V. Bacteriophage lambda as a cloning vector. *Microbiol Rev.* 1992, 56:577-91. DOI: 10.1128/mr.56.4.577-591.1992.

Chen H.D., Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2005, 29:83-98. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.07.002.

Ching J.C., Jones N.L., Ceponis P.J., Karmali M.A., Sherman P.M. *Escherichia coli* shiga-like toxins induce apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase via in vitro activation of caspases. *Infect Immun.* 2002, 70:4669-77. DOI: 10.1128/IAI.70.8.4669-4677.2002.

Clements A., Smollett K., Lee S.F., Hartland E.L., Lowe M., Frankel G. EspG of enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* binds the Golgi matrix protein GM130 and disrupts the Golgi structure and function. *Cell Microbiol.* 2011, 13:1429-39. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01631.x.

Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013, 5:58-65. DOI: 10.1111/1758-2229.12019.

- Clermont O., Dixit O.V.A, Vangchhia B., Condamine B., Dion S., Bridier-Nahmias A., Denamur E., Gordon D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ. Microbiol.* 2019, 21:3107-3117. DOI: 10.1111/1462-2920.14713
- Cobbold R. and Desmarchelier P. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet. Microbiol.* 2000, 71, 125–137.
- Cointe A., Birgy A., Mariani-Kurkdjian P., Liguori S., Courroux C., Blanco J., et al. Emerging multidrug-resistant hybrid pathotype Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O80 and related strains of clonal complex 165, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2018, 24, 2262–2269. DOI: 10.3201/eid2412.180272
- Colavecchio A., Goodridge L.D. Phage therapy approaches to reducing pathogen persistence and transmission in animal production environments: opportunities and challenges. *Microbiol Spectr.* 2017, 5. DOI: 10.1128/microbiolspec.PFS-0017-2017.
- Cornick N.A., Helgerson A.F., Mai V., Ritchie J.M., Acheson D.W. In vivo transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Appl Environ Microbiol.* 2006, 72:5086–8. DOI: 10.1128/AEM.00157-06
- Cravioto A., Gross R.J., Scotland S.M., Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology.* 1979, 3:95-9.
- Cray Jr W.C. and Moon H.W. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1995, 61:1586-90. DOI: 10.1128/aem.61.4.1586-1590.1995.
- Creuzburg K., Recktenwald J., Kuhle V., Herold S., Hensel M., Schmidt H. The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J Bacteriol.* 2005, 187:8494-8. DOI: 10.1128/JB.187.24.8494-8498.2005.
- Croxen M.A. and Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010, 8:26-38. DOI: 10.1038/nrmicro2265
- Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013, 26:822-80. DOI: 10.1128/CMR.00022-13.

D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol.* 2007, 158:553-4. DOI: 10.1016/j.resmic.2007.07.005.

D'Hérelle F. Le Bactériophage: son rôle dans l'immunité. 1921, Paris, France.

D'Hérelle F. Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. Comptes- rendus l'Académie des Sci. 1918a, 970–972.

D'Hérelle F. Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). Comptes-rendus la Société Biol. 1918b, 1160–1162.

Davis T.K., Van De Kar N.C.A.J., Tarr P.I. Shiga-toxin/Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections : practical clinical perspectives. *Microbiol Spectr.* 2014, 2:EHEC-0025

Dean P., Maresca M., Schüller S., Phillips A.D., Kenny B. Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 7, 103:1876-81. DOI: 10.1073/pnas.0509451103.

De Greve H., Qizhi C., Deboeck F., Hernalsteens J.P. The Shiga-toxin VT2-encoding bacteriophage varphi297 integrates at a distinct position in the *Escherichia coli* genome. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 12, 1579:196-202. DOI: 10.1016/s0167-4781(02)00539-0.

Dehdashti S., Ghanbarpour R., Hajikolaie M.R.H. Molecular detection of Shiga toxin-producing and antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from buffaloes in southwest of Iran. *Trop Anim Health Prod.* 2019, 51:1725-1736. DOI: 10.1007/s11250-019-01869-3.

Denamur E., Clermont O., Bonacorsi S., Gordon D. The opulation genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2021, 19:37–54. DOI: 10.1038/s41579-020-0416-x

Deng W., Li Y., Hardwidge P.R., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Lee S., Gruenheid S., Strynakda N.C., Puente J.L., Finlay B.B. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun.* 2005, 73:2135-46. DOI: 10.1128/IAI.73.4.2135-2146.2005

- Deng W., Yu H.B., de Hoog C.L., Stoyanov N., Li Y., Foster L.J., Finlay B.B. Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. *Mol Cell Proteomics*. 2012, 11:692-709. DOI: 10.1074/mcp.M111.013672.
- De Rauw K., Thiry D., Caljon B., Saulmont M., Mainil J. and Pierard D. Characteristics of Shiga toxin producing and enteropathogenic *Escherichia coli* of the emerging serotype O80:H2 isolated from humans and diarrhoeic calves in Belgium. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, 25:111.e5–111.e8. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.07.023
- Devinney R., Nisan I., Ruschkowski S., Rosenshine I., Finlay B.B. Tir tyrosine phosphorylation and pedestal formation are delayed in enteropathogenic *Escherichia coli* sepZ::TnpA mutant 30-5-1(3). *Infect Immun*. 2001 Jan, 69:559-563. DOI: 10.1128/IAI.69.1.559-563.2001
- Dobrescu L. New biological effect of edema disease principle (*Escherichia coli*-neurotoxin) and its use as an in vitro for this toxin. *Am J Vet Res*. 1983, 44:31-4.
- Donnenberg M.S., Yu J.U.N., Kaper, J.B., 1993. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol*, 175:4670-4680.
- Dorgai L., Sloan S., Weisberg R.A. Recognition of core binding sites by bacteriophage integrases. *J Mol Biol*. 1998, 17, 277:1059-70. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1642.
- Dorgai L., Yagil E., Weisberg R.A. Identifying determinants of recombination specificity: construction and characterization of mutant bacteriophage integrases. *J Mol Biol*. 1995, 15, 252:178-88. DOI: 10.1006/jmbi.1995.0486.
- Doron S., Melamed S., Ofir Get al.. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*. 2018, 359. DOI: 10.1126/science.aar4120
- Doughty S., Sloan J., Bennett-Wood V., Robertson M., Robins-Browne R.M. and Hartland E.L. 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*. 2002, 70:6761–6769. DOI: 10.1128/IAI.70.12.6761-6769.2002
- Dowd S.E. *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS Microbiol Lett*. 2007, 273:214-23. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00800.x.

- Duan M., Hunter S.S., Minnich S.A., Fagnan M.W., New D.D., Hovde C.J., Sheng H. Complete genome sequence of broad-host-range Shiga Toxin-converting bacteriophage SH2026Stx1, isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Genome Announc.* 2018, 21, 6:e00490-18. DOI: 10.1128/genomeA.00490-18
- Dundas S., Todd W.T., Stewart A.I., Murdoch P.S., Chaudhuri A.K., Hutchinson S.J. The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2001, 33:923-31. DOI: 10.1086/322598
- Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventré A., Elion J., Picard B., Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology.* 2001, 147:1671-1676. DOI: 10.1099/00221287-147-6-1671
- Dutta T.K., Roychoudhury P., Bandyopadhyay S., Wani S.A., Hussain I. Detection & characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) & enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in poultry birds with diarrhoea. *Indian J Med Res.* 2011, 133:541-5.
- Dziva F., Mahajan A., Cameron P., Currie C., McKendrick I.J., Wallis T.S., Smith D.G., Stevens M.P. 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 Microbiol Lett.* 2007, 271:258-64. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00724.x.
- Edelman R. and Levine M.M. From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Summary of a workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1983, 147:1108-1118. DOI: 10.1093/infdis/147.6.1108.
- EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 2017, 15, 5077. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5077.
- EFSA; ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union One Health 2018 zoonoses report. *EFSA J.* 2019, 17, e05926.
- Egido J.E., Costa A.R., Aparicio-Maldonado C., Haas P.J., Brouns S.J.J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2022, 9, 46:fuab048. DOI: 10.1093/femsre/fuab048

Elliott S.J., Sperandio V., Girón J.A., Shin S., Mellies J.L., Wainwright L., Hutcheson S.W., McDaniel T.K., Kaper J.B. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2000, 68:6115-26. DOI: 10.1128/IAI.68.11.6115-6126.2000.

Elliott S.J., O'Connell C.B., Koutsouris A., Brinkley C., Sonnenberg M.S., Hecht G., Kaper J.B. A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infect Immun*. 2002, 70:2271-7. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2271-2277.2002.

Elliott S.J., Krejany E.O., Mellies J.L., Robins-Browne R.M., Sasakawa C., Kaper J.B. EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*. 2001, 69:4027-33. DOI: 10.1128/IAI.69.6.4027-4033.2001.

Engelen F., Thiry D., Devleeschauwer B., Heyndrickx M., Mainil J., De Zutter L., Cox E. Pathogenic potential of *Escherichia coli* O157 and O26 isolated from young Belgian dairy calves by recto-anal mucosal swab culturing. *J Appl Microbiol*. 2021a, 131:964-972. DOI: 10.1111/jam.14909.

Engelen F., Thiry D., Devleeschauwer B., Mainil J., De Zutter L., Cox E. Occurrence of 'gang of five' Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups on Belgian dairy cattle farms by overshoe sampling. *Lett Appl Microbiol*. 2021b, 72:415-419. DOI: 10.1111/lam.13434.

Erez Z., Steinberger-Levy I., Shamir M., Doron S., Stokar-Avihail A., Peleg Y., Melamed S., Leavitt A., Savidor A., Albeck S., Amitai G., Sorek R. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*. 2017, 26, 541:488-493. DOI: 10.1038/nature21049.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J* 19:6406.

European Food Safety Authority and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control, Prevention and Control, 228 pp.

Fakih I., Thiry D., Duprez J.N., Saulmont M., Iguchi A., Piérard D., Jouant L., Daube G., Ogura Y., Hayashi T. et al. Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. *Vet. Microbiol*. 2017, 202, 16–22. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.02.017.

- Farooq S., Hussain I., Mir M.A., Bhat M.A., Wani S.A. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 48:692–697. DOI : 10.1111/j.1472-765X.2009.02594.x
- Feng P.C.H. and Reddy S. Prevalence of Shiga Toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Appl Environ Microbiol.* 2013, 79: 6917–6923.
- Fierz L., Cernela N., Hauser E., Nuesch-Inderbinen M., Stephan R. Characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated during 2010-2014 from human infections in Switzerland. *Front Microbiol.* 2017, 8:1471. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01471
- Fogg P.C.M., Gossage S.M., Smith D.L., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E. Identification of multiple integration sites for Stx-phage Phi24B in the *Escherichia coli* genome, description of a novel integrase and evidence for a functional anti-repressor. *Microbiology.* 2007, 153:4098-4110. DOI: 10.1099/mic.0.2007/011205-0
- Fokine A. and Rossmann M.G. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage.* 2014, 1, 4:e28281. DOI: 10.4161/bact.28281
- Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M., Bernard H., Fruth A., Prager R., Spode A., Wadl M., Zoufaly A., Jordan S., Kemper M.J., Follin P., Müller L., King L.A., Rosner B., Buchholz U., Stark K., Krause G? HUS Investigation Team. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med.* 2011, 10365:1771-80. DOI: 10.1056/NEJMoal106483.
- Friedrich A.W., Zhang W., Bielaszewska M., Mellmann A., Köck R., Fruth A., Tschäpe H., Karch H. Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin–negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clin Infect Dis.* 2007, 45:39–45. DOI: 10.1086/518573
- Fukushima H., Hashizume T., Morita Y., Tanaka J., Azuma K., Mizumoto Y., Kaneno M., Matsuura M., Konma K., Kitani T. Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatr Int.* 1999, 41:213-7. DOI: 10.1046/j.1442-200x.1999.4121041.x.

Furevi A., Stähle J., Muheim C., Gkotzis S., Udekwu K.I., Daley D.O., Widmalm G. Structural analysis of the O-antigen polysaccharide from *Escherichia coli* O188. *Carbohydr Res.* 2020, 498:108051. DOI: 10.1016/j.carres.2020.108051.

Galli L., Torres A.G., Rivas M. Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle in Argentina. *FEMS Microbiol Lett.* 2010, 308:123-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.01996.x.

Gao L., Altae-Tran H., Böhning Fet al.. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science.* 2020, 369:1077–84. DOI: 10.1126/science.aba0372.

Gao X., Wang X., Pham T.H., Feuerbacher L.A., Lubos M.L., Huang M., Olsen R., Mushegian A., Slawson C., Hardwidge P.R. NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- κ B activation. *Cell Host Microbe.* 2013, 16, 13:87-99. DOI: 10.1016/j.chom.2012.11.010

García-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J., Blanch A.R. Genotypic and phenotypic diversity among induced, stx2-carrying bacteriophages from environmental *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2009, 75:329-36. DOI: 10.1128/AEM.01367-08.

Garmendia J., Frankel G., Crepin V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun.* 2005, 73:2573-85. DOI: 10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005.

Garmendia J., Ren Z., Tennant S., Midolli Viera M.A., Chong Y., Whale A., Azzopardi K., Dahan S., Sircili M.P., Franzolin M.R., Trabulsi L.R., Phillips A., Gomes T.A., Xu J., Robins-Browne R., Frankel G. Distribution of tccP in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 2005, 43:5715-20. DOI: 10.1128/JCM.43.11.5715-5720.2005.

Garrido P., Blanco M., Moreno-Paz M., Briones C., Dahbi G., Blanco J., Blanco J., Parro V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem.* 2006, 52:192-201. DOI: 10.1373/clinchem.2005.059766.

- Geue L., Segura-Alvarez M., Conraths F.J., Kuczius T., Bockemühl J., Karch H., Gallien P. A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol Infect.* 2002, 129:173-85. DOI: 10.1017/s0950268802007288.
- Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004, 68:771-95. DOI: 10.1128/MMBR.68.4.771-795.2004.
- Gill R.K., Borthakur A., Hodges K., Turner J.R., Clayburgh D.R., Saksena S., Zaheer A., Ramaswamy K., Hecht G., Dudeja PK. Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl/OH exchange following infection with enteropathogenic *E. coli*. *J Clin Invest.* 2007, 117:428-37. DOI: 10.1172/JCI29625.
- Gill A., Dussault F., McMahon T., Petronella N., Wang X., Cebelinski E., Scheutz F., Weedmark K., Blais B., Carrillo C. Characterization of atypical Shigatoxin gene sequences and description of Stx2j, a new subtype. *J Clin Microbiol.* 2022, 1660:e0222921. DOI: 10.1128/jcm.02229-21.
- Girón J.A., Ho A.S., Schoolnik G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1991,254:710–713.
- Goffaux F., China B. and Mainil J. Organisation and in vitro expression of esp genes of the LEE (locus of enterocyte effacement) of bovine enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2001, 83:275–286 DOI: 10.1016/s0378-1135(01)00418-7
- Goosney D.L., de Grado M., Finlay B.B. Putting *E. coli* on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 1999, 9:11-14. DOI: 10.1016/s0962-8924(98)01418-4
- Gorbalenya A.E., Krupovic M., Mushegian A., Kropinski A.M., Siddell S.G., Varsani A., Adams M.J., Davison A.J., Dutilh B.E., Harrach B., et al. The new scope of virus taxonomy: Partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat. Microbiol.* 2020, 5, 668–674.
- Grant M.A., Weagant S.D., Feng P. Glutamate decarboxylase genes as a prescreening marker for detection of pathogenic *Escherichia coli* groups. *Appl Environ Microbiol.* 2001, 67:3110-4. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3110-3114.2001.

Grande L., Michelacci V., Tozzoli R., Ranieri P., Maugliani A., Caprioli A., Morabito S. Whole genome sequence comparison of vtx2-converting phages from Enteroaggregative Haemorrhagic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*. 2014, 8, 15:574. DOI: 10.1186/1471-2164-15-574

Grenier D., Bertrand J., Mayrand D. Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine. *Oral Microbiol Immunol*. 1995, 10:319-20. DOI: 10.1111/j.1399-302x.1995.tb00161.x.

Groth A.C. and Calos M.P. Phage integrases: biology and applications. *J Mol Biol*. 2004, 16, 335:667-78. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.09.082.

Grys T.E., Siegel M.B., Lathem W.W., Welch R.A. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to host cells. *Infect Immun*. 2005, 73, 1295–1303. DOI: 10.1128/IAI.73.3.1295-1303.2005.

Guttman B., Raya R., Kutter E. Basic Phage Biology in: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. (Ed.), 2005 . pp. 29–66.

Guttman J.A., Li Y., Wickham M.E., Deng W., Vogl A.W., Finlay B.B. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption *in vivo*. *Cell Microbiol*. 2006, 8:634-45. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00656.x

Guttman J.A., Samji F.N., Li Y., Deng W., Lin A., Finlay B.B. Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens. *Cell Microbiol*. 2007, 9:131-141. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00773.x.

Gyles C. *Escherichia coli* in domestic animals. Wallingford, UK: CAB International; 1994.

Habets A., Crombé F., Nakamura K., Guérin V., De Rauw K., Piérard D., Saulmont M., Hayashi T., Mainil J.G., Thiry D. Genetic characterization of Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 from diarrheic and septicemic calves and relatedness to human Shigatoxigenic *E. coli* O80:H2. *J. Appl. Microbiol*. 2021, 130:258-264. DOI: 10.1111/jam.14759

Hankin M.E. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur*. 1896, 10, 511:523. DOI: 10.4161/bact.1.3.16736

Havelaar A.H., Kirk M.D., Torgerson P.R., Gibb H.J., Hald T., Lake R.J., Praet N., Bellinger D.C., de Silva N.R., Gargouri N., Speybroeck N., Cawthorne A., Mathers C., Stein C., Angulo F.J., Devleeschauwer B. World health organization foodborne disease burden epidemiology reference group. World health organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Med.* 2015, 3:12. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001923.

Heimer S.R., Welch R.A., Perna N.T., Pósfai G., Evans P.S., Kaper J.B., Blattner F.R., Mobley H.L. Urease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: evidence for regulation by fur and a trans-acting factor. *Infect Immun.* 2002, 70:1027-31. DOI: 10.1128/IAI.70.2.1027-1031.2002.

Hernandes R.T., Elias W.P., Vieira M.A., Gomes T.A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2009, 297:137–49. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x.

Herold S., Karch H., Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion. *Int J Med Microbiol.* 2004, 294:115–121. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.06.023.

Hodges K., Alto N.M., Ramaswamy K., Dudeja P.K., Hecht G. The enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein EspF decreases sodium hydrogen exchanger 3 activity. *Cell Microbiol.* 2008, 10:1735-45. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01163.x. Epub 2008 Apr 21.

Hoffman M.A., Menge C., Casey T.A., Laegreid W., Bosworth B.T., Dean-Nystrom E.A. Bovine immune response to shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Clin Vaccine Immunol.* 2006, 13:1322-7. DOI: 10.1128/CVI.00205-06.

Hughes A.C., Zhang Y., Bai X., Xiong Y., Wang Y., Yang X., Xu Q., He X. Structural and Functional Characterization of Stx2k, a New Subtype of Shiga Toxin 2. *Microorganisms.* 2019, 8:4. DOI: 10.3390/microorganisms8010004

Hurley B.P., Thorpe C.M., Acheson D.W. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun.* 2001, 69:6148-55. DOI: 10.1128/IAI.69.10.6148-6155.2001.

Hwang S.B., Chelliah R., Kang J.E., Rubab M., Banan-MwineDaliri E., Elahi F., Oh D.H. Role of recent therapeutic applications and the infection strategies of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021, 29, 11:614963. DOI: 10.3389/fcimb.2021.614963.

Imamovic L., Muniesa M. Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One*. 2012, 7:e32393. DOI: 10.1371/journal.pone.0032393.

Ingelbeen B., Bruyand M., Mariani-Kurkjian P., Le Hello S., Danis K., Sommen C., et al. Emerging Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O80 associated hemolytic and uremic syndrome in France, 2013-2016: Differences with other serogroups. *PLoS One*. 2018,13:e0207492. DOI: 10.1371/journal.pone.0207492

Ishii Y., Kimura S., Alba J., Shiroto K., Otsuka M., Hashizume N., Tamura K., Yamaguchi K. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J Clin Microbiol*. 2005, 43:1072-5. DOI: 10.1128/JCM.43.3.1072-1075.2005

Jaros P., Cookson A.L., Reynolds A., Prattley D.J., Campbell D.M., Hathaway S., French N.P. Nationwide prevalence and risk factors for faecal carriage of *Escherichia coli* O157 and O26 in very young calves and adult cattle at slaughter in New Zealand. *Epidemiol Infect*. 2016, 144:1736-47. DOI: 10.1017/S0950268815003209.

Jarvis K.G., Giron J.A., Jerse A.E., Mcdaniel T.K., Donnenberg M.S., Kaper J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92:7996–8000. DOI: 10.1073/pnas.92.17.7996

Jensen C.O. Ueber die Kälberruhr und deren Aetiologie. *Mh. Tierheilk.*, 1893, 4, 97-124.

Joensen K.G., Tetzschner A.M., Iguchi A., Aarestrup F.M., Scheutz F. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol*. 2015, 53:2410-2426. DOI: 10.1128/JCM.00008-15.

Jonsson M.E., Aspán A., Eriksson E., Vågsholm I. Persistence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during the summer months in a Swedish dairy herd. *Int J Food Microbiol*. 2001, 21, 66:55-61. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00492-x

Joseph A., Cointe A., Mariani Kurkdjian P., Rafat C., and Hertig A. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: a narrative review. *Toxins*. 2020, 12, 67. DOI: 10.3390/toxins12020067

Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature. Conservation of the family name *Enterobacteriaceae*, of the name of the type genus, and designation of the type species. 1958, 8:73-74

Kaper J.B., Nataro J.P. and Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004, 2:123-140. DOI: 10.1038/nrmicro818.

Karch H., Tarr P.I., Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005, 295:405–418. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.009.

Karmali M.A., Petric M., Lim C., Fleming P.C., Arbus G.S., Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-Producing *Escherichia coli*, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 151, Issue 5, May 1985, Pages 775–782, DOI: 10.1093/infdis/151.5.775

Kauffmann F. The serology of the coli group. *J Immunol.* 1947, 57:71-100

Kenny B., Jepson M. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol.* 2000, 2:579-90. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2000.00082.x.

Khalil R.K., Skinner C., Patfield S., He X. Phage-mediated Shiga toxin (Stx) horizontal gene transfer and expression in non-Shiga toxigenic *Enterobacter* and *Escherichia coli* strains. *Pathog Dis.* 2016, 74:1–11. DOI: 10.1093/femspd/ftw037.

Khawaskar D.P., Sinha D.K., Lalrinzuala M.V., Athira V., Kumar M., Chhakchhuak L., Mohanapriya K., Sophia I., Abhishek, Kumar O.R.V., Chaudhuri P/, Singh B.R., Thomas P. Pathotyping and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from neonatal calves. *Vet Res Commun.* 2022, 46:353-362. DOI: 10.1007/s11259-021-09857-5.

Koch R. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. 1876, In: Robert Koch . Klassische Texte der Wissenschaft. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-56454-7_2

Koch R. Die Aetiologie der Tuberkulose. Berliner klinische Wochenschrift. 1882, 15, 221-230.

Koonin E.V., Dolja V.V., Krupovic M., Varsani A., Wolf Y.I., Yutin N., Zerbini F.M., Kuhn J.H. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020, 84, e00061-19. DOI: 10.1128/MMBR.00061-19.

- Kim J.S., Lee M.S., Kim J.H. Recent updates on outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020, 4, 10:273. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00273.
- King M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. et al. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012
- Knutton S., Baldini M.M., Kaper J.B., McNeish A.S. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect Immun.* 1987, 55:78-85. DOI: 10.1128/iai.55.1.78-85.1987.
- Kobayashi H., Shimada J., Nakazawa M., Morozumi T., Pohjanvirta T., Pelkonen S., Yamamoto K. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2001, 67:484-9. DOI: 10.1128/AEM.67.1.484-489.2001.
- Koch C., Hertwig S., Appel B. Nucleotide sequence of the integration site of the temperate bacteriophage 6220, which carries the Shiga toxin gene stx(1ox3). *J Bacteriol.* 2003, 185:6463-6. DOI: 10.1128/JB.185.21.6463-6466.2003.
- Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1977, 18:775-9. DOI: 10.1128/iai.18.3.775-779.1977
- Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A., Bover-Cid S., Chemaly M., Davies R., et al. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA J.* 2020, 18:e05967. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.5967
- Kruger D.H., Schneck P., Gelderblom H.R. Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *Lancet.* 2000, 355:1713-1717. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02250-9.
- Krüger A., Lucchesi P.M.A., Parma A.E. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Appl Environ Microbiol.* 2011, 77:73-79. DOI: 10.1128/AEM.01445-10

- Krupovic M., Dutilh B.E., Adriaenssens E.M., Wittmann J., Vogensen F.K., Sullivan M.B., Rumnieks J., Prangishvili D., Lavigne R., Kropinski A.M., et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: Update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch. Virol.* 2016, 161, 1095–1099
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006, 27:95-125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007
- Kudva I.T., Hovde C.J., John M. Adherence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine recto-anal junction squamous epithelial cells appears to be mediated by mechanisms distinct from those used by O157. *Foodborne Pathog. Dis.* 2013, 10, 375–381.
- Kutter E., Raya P., Carlson K. Molecular mechanism of phage infection., in: Bacteriophages: *Biology and Applications.* 2005.
- Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* 2010, 8:317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
- Lacher D.W., Gangiredla J., Patel I., Elkins C.A., Feng P.C. Use of the *Escherichia coli* identification microarray for characterizing the health risks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* isolated from foods. *J. Food Prot.* 2016, 79:1656–1662. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-16-176.
- Lai Y., Rosenshine I., Leong J.M., Frankel G. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2013, 15:1796-1808. DOI: 10.1111/cmi.12179.
- Lathem W.W., Bergsbaken T., Witowski S.E., Perna N.T., Welch R.A. Acquisition of stcE, a C1 esterase inhibitor-specific metalloprotease, during the evolution of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis.* 2003, 15, 187:1907-14. DOI: 10.1086/374719
- Lavigne R., Seto D., Mahadevan P., Ackermann H.-W., Kropinski A.M. Unifying classical and molecular taxonomic classification: Analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools. *Res. Microbiol.* 2008, 159, 406–414. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.03.005
- Lavigne R., Darius P., Summer E.J., Seto D., Mahadevan P., Nilsson A.S., Ackermann H.W., Kropinski A.M. Classification of *Myoviridae* bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol.* 2009, 9, 224. DOI: 10.1186/1471-2180-9-224.

- Lesage, A.A. Contribution à l'étude des entérites infantiles—sérodagnostic des races de *Bacterium coli*. *Comptes Rendues des Societe Biologique (Paris)*.1897, 49 :900-1.
- Levine M.M., Bergquist E.J., Nalin D.R., Waterman D.H., Hornick R.B., Young C.R., Sotman S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*. 1978, 1:1119-1122. DOI: 10.1016/s0140-6736(78)90299-4.
- Licznarska K., Nejman-Faleńczyk B., Bloch S., Dydecka A., Topka G., Gąsior T., Węgrzyn A., Węgrzyn G. Oxidative stress in Shiga toxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 2016:3578368. DOI: 10.1155/2016/3578368.
- Liebana E., Smith R.P., Batchelor M., McLaren I., Cassar C., Clifton-Hadley F.A., Paiba G.A. Persistence of *Escherichia coli* O157 isolates on bovine farms in England and Wales. *J Clin Microbiol*. 2005, 43:898-902. DOI: 10.1128/JCM.43.2.898-902.2005
- Liu Y., Tian S., Thaker H., Dong M. Shiga Toxins: An update on host factors and biomedical applications. *Toxins (Basel)*. 2021, 18, 13:222. DOI: 10.3390/toxins13030222.
- Livny J., Friedman D.I. Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol Microbiol*. 2004, 51:1691-704. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2003.03934.x.
- Lizumi Y., Sagara H., Kabe Y., Azuma M., Kume K., Ogawa M., Nagai T., Gillespie P.G., Sasakawa C., Handa H. The enteropathogenic *E.coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe*. 2007, 13, 2:383-92. DOI: 10.1016/j.chom.2007.09.012.
- Lopatina A, Tal N, Sorek R. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy. *Ann Rev Virol* 2020;7:371–84.
- Lorenz S.C., Son I., Maounounen-Laasri A., Lin A., Fischer M., Kase J.A. 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*. 2013, 79:6301-11. DOI: 10.1128/AEM.02200-13.

- Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn G. Bacteriophages carrying Shiga toxin genes: genomic variations, detection and potential treatment of pathogenic bacteria. *Future Microbiol.* 2011, 6:909-24. DOI: 10.2217/fmb.11.70.
- Łoś M. and Węgrzyn G. Pseudolysogeny. *Adv Virus Res.* 2012, 82:339-49. DOI: 10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4
- Louie M., Read S., Louie L., Ziebell K., Rahn K., Borczyk A., Lior H. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol. Amp. Infect.* 1999, 123:17–24. DOI: 10.1017/S0950268899002551.
- Luna-Gierke R.E., Griffin P.M., Gould L.H., Herman K., Bopp C.A., Strockbine N., Mody R.K. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol. Infect.* 2014, 142:2270–2280. DOI: 10.1017/S0950268813003233
- Luo Y., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Creagh A.L., Knoechel D.G., Haynes C.A., Finlay B.B., Strynadka N.C. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature.* 2000, 29:405:1073-1077. DOI: 10.1038/35016618.
- Ma C., Wickham M.E., Guttman J.A., Deng W., Walker J., Madsen K.L., Jacobson K., Vogl W.A., Finlay B.B., Vallance B.A. *Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption in vivo: role of mitochondrial associated protein (Map). *Cell Microbiol.* 2006, 8:1669-86. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00741.x.
- Mainil J. and Daube G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: Who's who? *J. Appl. Microbiol.* 2005, 98:1332–1344.
- Mainil J.G. and Fairbrother J.M. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In: Pathogenic *Escherichia coli*: Molecular and cellular microbiology. Morabito S. 1ère édition, Horizon Scientific Press et Caister Academic Press, Norwich, England, UK, 2014, 68 pp.
- Malik A., Tóth I., Beutin L., Schmidt H., Taminiâu B., Dow M.A., Morabito S., Oswald E., Mainil J., Nagy B. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of eae+ *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet Microbiol.* 2006, 16, 114:82-93. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.11.044.

- Menge C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. *Toxins*. 2020, 23, 12:345. DOI: 10.3390/toxins12050345.
- Marchès O., Covarelli V., Dahan S., Cougoule C., Bhatta P., Frankel G., Caron E. EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol*. 2008, 10:1104-15. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01112.x
- Mariani-Kurkdjian P., Lemaître C., Bidet P., Perez D., Boggini L., Kwon T., Bonacorsi S. Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. *New Microbes New Infect*. 2014, 2:127–131. DOI: 10.1002/nmi2.49.
- Markey B.K., Leonard F.C., Archambault M., Cullinane A., Maguire D.. Clinical Veterinary Microbiology, 2^{ème} édition, Elsevier Ltd., 2013. 901 pp.
- Marques L.R.M., Moore M.A., Wells J.G., Kaye Wachsmuth I., O'brien A.D. Production of Shiga-Like Toxin by *Escherichia coli*. *J. Infect Dis*. Volume 154, Issue 2, August 1986, Pages 338–341. DOI: 10.1093/infdis/154.2.338
- Martínez-Castillo A., Muniesa M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014, 16, 4:46. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00046.
- Mcdaniel T.K., Jarvis K.G., Donnenbergt M.S., James B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92:1664–1668.
- Mellor G.E., Fegan N., Duffy L.L., McMILLAN K.E., Jordan D., Barlow R.S. National Survey of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in Australian Beef Cattle Feces. *J Food Prot*. 2016, 79:1868-1874. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-507.
- Mills E., Baruch K., Aviv G., Nitzan M., Rosenshine I. Dynamics of the Type III Secretion System Activity of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *mBio*. 2013, 4: e00303-13. DOI: 10.1128/mBio.00303-13
- Molineux, I.J., 2001. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Mol. Microbiol*. 40, 1–8. doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02357.x

- Monteiro R., Ageorges V., Rojas-Lopez M., Schmidt H., Weiss A., Bertin Y., Forano E., Jubelin G., Henderson I.R., Livrelli V., et al. A secretome view of colonisation factors in Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* (STEC): From enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) to related enteropathotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2016, 363:fnw179. DOI: 10.1093/femsle/fnw179.
- Moon H.W., Whipp S.C., Argenzio R.A., Levine M.M., Giannella R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun.* 1983, 41:1340-1351. DOI: 10.1128/iai.41.3.1340-1351.1983.
- Moraru C., Varsani A., Kropinski A.M. VIRIDIC-A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses* 2020, 12, 1268. DOI: 10.3390/v12111268.
- Moxley R.A. *Escherichia coli* O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Anim Health Res Rev.* 2004, 5:15-33. DOI: 10.1079/ahr200463
- Moxley R.A. and Smith D.R. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 2010, 26, 29–56.
- Mühlen S. and Dersch P. Treatment Strategies for Infections With Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020, 6, 10:169. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00169.
- Muniesa M. and Schmidt H. Shiga toxin-encoding phages: Multifunctional gene ferries. *Pathog. Escherichia coli Mol. Cell Mikrobiol.* 2014, 57–77. DOI:10.21775/9781910190210.
- Muniesa M., Blanco J.E., De Simon M., Serra-Moreno R., Blanch A.R., Jofre J. Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology.* 2004a, 150: 2959-2971. DOI: 10.1099/mic.0.27188-0
- Muniesa M., de Simon M., Prats G., Ferrer D., Panella H., Jofre J. Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect immun.* 2003, 71: 4554-4562. DOI: 10.1128/IAI.71.8.4554-4562.2003.
- Murakami K., Etoh Y., Ichihara S., Maeda E., Takenaka S., Horikawa K., Narimatsu H., Kawano K., Kawamura Y., Ito K. Isolation and characteristics of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* among pigeons in Kyushu, Japan. *PLoS One.* 2014, 23, 9:e86076. DOI: 10.1371/journal.pone.0086076.

- Müthing J., Meisen I., Zhang W., Bielaszewska M., Mormann M., Bauerfeind R., Schmidt M.A., Friedrich A.W., Karch H. Promiscuous Shiga toxin 2e and its intimate relationship to Forssman. *Glycobiology*. 2012, 22:849-62. DOI: 10.1093/glycob/cws009
- Nataro J.P., Baldini M.M., Kaper J.B., Black R.E., Bravo N., Levine M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis*. 1985a, 152:560-5. DOI: 10.1093/infdis/152.3.560.
- Nataro J.P., Scaletsky I.C., Kaper J.B., Levine M.M., Trabulsi L.R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1985b, 48:378-383. DOI: 10.1128/iai.48.2.378-383.1985.
- Nataro J.P., Maher K.O., Mackie P., Kaper J.B. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1987, 55:2370-2377. DOI: 10.1128/iai.55.10.2370-2377.1987.
- Nataro J.P. and Kaper, J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 1998, 11:142–201.
- Naylor S.W., Low J.C., Besser T.E., Mahajan A., Gunn G.J., Pearce M.C., McKendrick I.J., Smith D.G.E., Gally D.L. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect. Immun*. 2003, 71, 150–1512.
- Naylor S.W., Gally D.L., Low J.C. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM*. 2005, 295:419–441. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.07.010.
- Neely M.N., Friedman D.I. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol*. 1998, 28:1255-67. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00890.x
- Neter E., Westphal O., Luderitz O., Gino R.M., Gorzynski E.A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics*. 1955, 166:801-8.
- Nicholls L., Grant T.H., Robins-Browne R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol*. 2000, 35:275-88. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01690.x

- Nougayrède J. and Donnenberg M. S. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* 2004, 6, 1097–1111
- Nüesch-Inderbilen M., Cernela N., Wüthrich D., Egli A., Stephan R. Genetic characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* belonging to the emerging hybrid pathotype O80:H2 isolated from humans 2010-2017 in Switzerland. *Int J Med Microbiol.* 2018, 308:534-538. DOI: 10.1016/j.ijmm.2018.05.007.
- Nyambe S., Burgess C., Whyte P., Bolton D. An investigation of vtx₂ bacteriophage transduction to different *Escherichia coli* patho-groups in food matrices and nutrient broth. *Food Microbiol.* 2017, 68:1-6. DOI: 10.1016/j.fm.2017.06.004
- O'Brien A.D. and Holmes R.K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 1987, 51:206-220. DOI: 10.1128/mr.51.2.206-220.1987.
- Ochman H. and Selander R.K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural population. *J. Bacteriol.* 1984, 157:690-693. DOI: 10.1128/jb.157.2.690-693.1984.
- Ochoa T.J., Barletta F., Contreras C., Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008, 102:852–856. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.03.017
- Ogura Y., Ooka T., Iguchi A., Toh H., Asadulghani M., Oshima K., Kodama T., Abe H., Nakayama K., Kurokawa K., Tobe T., Hattori M., Hayashi T. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:17939-44. DOI: 10.1073/pnas.0903585106.
- Pacheco A.R. and Sperandio V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012, 7:2:81. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00081
- Pai C.H., Gordon R., Sims H.V., Bryan L.E. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. Clinical, epidemiologic, and bacteriologic features. *Ann Intern Med.* 1984, 101:738-42. DOI: 10.7326/0003-4819-101-6-738

Paletta A.C.C., Castro V.S., Conte-Junior C.A. Shiga Toxin-Producing and enteroaggregative *Escherichia coli* in animal, foods, and humans: Pathogenicity mechanisms, detection methods, and epidemiology. *Curr Microbiol.* 2020, 77:612-620. DOI: 10.1007/s00284-019-01842-1

Park S., Szonyi B., Gautam R., Nightingale K., Anciso J., Ivanek R. Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: A systematic review. *J. Food Prot.* 2012, 75:2055–2081. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-160.

Pascal J.M. DNA and RNA ligases: structural variations and shared mechanisms. *Curr Opin Struct Biol.* 2008, 18:96-105. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.12.008.

Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C., Paton J.C. 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.* 2001, 69:6999–7009.

Paton A.W., Srimanote P., Talbot U.M., Wang H., Paton J.C. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004, 5, 200:35-46. DOI: 10.1084/jem.20040392. Epub 2004 Jun 28.

Peigne C., Bidet P., Mahjoub-Messai F., Plainvert C., Barbe V., et al. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infect Immun.* 2009, 77:2272–2284. DOI: 10.1128/IAI.01333-08

Perna N.T., Mayhew G.F., Pósfai G., Elliott S., Sonnenberg M.S., Kaper J.B., Blattner F.R. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 1998, 66:3810-7. DOI: 10.1128/IAI.66.8.3810-3817.1998.

Persad A.K., Lejeune J.T. Animal reservoirs of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*; Sperandio V., Hovde C.J., Eds.; ASM Press: Norwich, UK; Washington, DC, USA, 2015; pp. 211–230; ISBN 978-1-555581-878-4.

Petridis M., Bagdasarian M., Waldor M.K., Walker E. Horizontal transfer of Shiga toxin and antibiotic resistance genes among *Escherichia coli* strains in house fly (Diptera: Muscidae) gut. *J Med Entomol.* 2006, 43:288-95. DOI: 10.1603/0022-2585(2006)043[0288:htosta]2.0.co;2.

Piérard D., De Greve H., Haesebrouck F., Mainil J. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Vet Res.* 2012, 13, 43:13. DOI: 10.1186/1297-9716-43-13

Pires S.M., Majowicz S., Gill A., Devleeschauwer B. Global and regional source attribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using analysis of outbreak surveillance data. *Epidemiol Infect.* 2019, 147:e236. DOI: 10.1017/S095026881900116X

Pirro F., Wieler L.H., Failing K., Bauerfeind R., Baljer G. Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle. *Vet Microbiol.* 1995, 43:131-41. DOI: 10.1016/0378-1135(94)00089-f.

Plisson C., White H.E., Auzat I., Zafarani A., São-José C., Lhuillier S., Tavares P., Orlova E.V. Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO J.* 2007, 8, 26:3720-8. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601786.

Plunkett G. 3rd, Rose D.J., Durfee T.J., Blattner F.R. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol.* 1999, 181:1767-78. DOI: 10.1128/JB.181.6.1767-1778.1999

Pohl P., Cleenwerck I., Imberechts H., Jacquemin E., Marin M., China B., Mainil J. Différences entre les pathotypes et les sérogroupes des *Escherichia coli* vérotoxigènes isolées de veaux sains et celles isolées de veaux souffrant de diarrhée. *Ann. Méd. Vét.* 1997, 141:155–159.

Prager R., Fruth A., Busch U., Tietze E. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int J Med Microbiol.* 2011, 301:181–191.

Pruimboom-Brees I.M., Morgan T.W., Ackermann M.R., Nystrom E.D., Samuel J.E., Cornick N.A., Moon H.W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 12, 97:10325-9. DOI: 10.1073/pnas.190329997.

Quainoo S., Coolen J.P.M., van Hijum S.A.F.T., Huynen M.A., Melchers W.J.G., van Schaik W., Wertheim H.F.L. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2017, 30:1015-1063

Quinn P.J., Markey B.K., Leonard F.C., Fitzpatrick E.S., Fanning S. Concise review in veterinary microbiology. John Wiley & Sons Ltd, 2^{ème} édition, 2016. 197 pp.

Quirós P. and Muniesa M. Contribution of cropland to the spread of Shiga toxin phages and the emergence of new Shiga toxin-producing strains. *Sci Rep.* 2017, 10, 7:7796. DOI: 10.1038/s41598-017-08169-6.

Quitard S., Dean P., Maresca M., Kenny B. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. *Cell Microbiol.* 2006, 8:972-81. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00680.x

Rakhuba D.V., Kolomiets E.I., Dey E.S, et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish J. Microbiol.* 2010, 59:145–155.

Ramboarina S., Fernandes P.J., Daniell S., Islam S., Simpson P., Frankel G., Booy F., Sonnenberg M.S., Matthews S. Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2005, 280:40252-60. DOI: 10.1074/jbc.M508099200

Ramisetty B.C.M., Sudhakari P.A. Bacterial 'Grounded' Prophages: Hotspots for genetic renovation and innovation. *Front Genet.* 2019, 12:65. DOI: 10.3389/fgene.2019.00065.

Ravat F., Jault P., Gabard J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters.* 2015, 31, 28:13-2

Recktenwald J., Schmidt H. The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage phiP27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infect Immun.* 2002, 70:1896-908. DOI: 10.1128/IAI.70.4.1896-1908.2002.

Rice D.H., Sheng H.Q., Wynia S.A., Hovde C.J. Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. *J Clin Microbiol.* 2003, 41:4924-9. DOI: 10.1128/JCM.41.11.4924-4929.2003

Ritchie J.M., Wagner P.L., Acheson D.W., Waldor M.K. Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ Microbiol.* 2003, 69:1059-1066. DOI: 10.1128/AEM.69.2.1059-1066.2003.

Rodrigues J., Scaletsky I.C., Campos L.C., Gomes T.A., Whittam T.S., Trabulsi L.R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun.* 1996, 64:1249–1251. DOI: 10.1128/iai.64.7.2680-2686.1996.

Rodwell E.V., Vishram B., Smith R., Browning L., Smith-Palmer A., Allison L., Holmes A., Godbole G., McCarthy N., Dallman T.J., Jenkins C. Epidemiology and genomic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal complex 165 in the UK. *J Med Microbiol.* 2021, 70:001471. DOI: 10.1099/jmm.0.001471.

Rooks, D.J.; Libberton, B.; Woodward, M.J.; Allison, H.E.; McCarthy, A.J. Development and application of a method for the purification of free shigatoxigenic bacteriophage from environmental samples. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *91*, 240–245.

Roxas J.L., Monasky R.C., Roxas B.A.P., Agellon A.B., Mansoor A., Kaper J.B., Vedantam G., Viswanathan V.K. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspH-Mediated Rho GTPase Inhibition Results in Desmosomal Perturbations. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018, 27, 6:163-180. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.007.

Rozanov D.V., D'Ari R., Sineoky S.P. RecA-independent pathways of lambdaoid prophage induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1998, 180:6306-15. DOI: 10.1128/JB.180.23.6306-6315.1998

Salmund G.P., Fineran P.C. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol.* 2015, 13:777-86. DOI: 10.1038/nrmicro3564.

Samba-Louaka A., Taieb F., Nougayrède J.P., Oswald E. Cif type III effector protein: a smart hijacker of the host cell cycle. *Future Microbiol.* 2009, 4:867-77. DOI: 10.2217/fmb.09.60.

Sancak A.A., Rutgers H.C., Hart C.A., Batt R.M. Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *Vet Rec.* 2004, 24, 154:101-6. DOI: 10.1136/vr.154.4.101.

Sapountzis P., Segura A., Desvaux M., Forano E. An Overview of the elusive passenger in the gastrointestinal tract of cattle: The Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Microorganisms.* 2020, 10, 8:877. DOI: 10.3390/microorganisms806087

Sato T., Shimizu T., Watarai M., Kobayashi M., Kano S., Hamabata T., Takeda Y., Yamasaki S. Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages. *Gene*. 2003, 24, 309:35-48. DOI: 10.1016/s0378-1119(03)00487-6.

Salvadori M.I., Sontrop J.M., Garg A.X., Moist L.M., Suri R.S., Clark W.F. Factors that led to the Walkerton tragedy. *Kidney Int. Suppl.* 2009:S33–S34. DOI: 10.1038/ki.2008.616.

Scaletsky I.C., Silva M.L., Trabulsi L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun.* 1984, 45:534-6. DOI: 10.1128/iai.45.2.534-536.1984.

Scheutz F. et al. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill.* 2011, 16:19889.

Scheutz F. Taxonomy Meets Public Health: The case of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2014, 1–15.

Schmidt H. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol.* 2001,152:687- 695. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01249-9.

Seed K.D. Battling phages: How bacteria defend against viral attack. *PLoS Pathog.* 2015, 11, 11:e1004847. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004847.

Sekizaki T., Harayama S., Brazil G.M., Timmis K.N. Localization of stx, a determinant essential for high-level production of shiga toxin by *Shigella dysenteriae* serotype 1, near pyrF and generation of stx transposon mutants. *Infect Immun.* 1987, 55:2208-14. DOI: 10.1128/iai.55.9.2208-2214.1987

Sham H.P., Shames S.R., Croxen M.A., Ma C., Chan J.M., Khan M.A., Wickham M.E., Deng W., Finlay B.B., Vallance B.A. Attaching and effacing bacterial effector NleC suppresses epithelial inflammatory responses by inhibiting NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Infect Immun.* 2011 ,79:3552-62. DOI: 10.1128/IAI.05033-11

Shringi S., Schmidt C., Katherine K., Brayton K.A., Hancock D.D., Besser T.E. Carriage of stx2a differentiates clinical and bovine-biased strains of *Escherichia coli* O157. *PLoS One.* 2012, 7:e51572. DOI: 10.1371/journal.pone.0051572

Simpson N., Shaw R., Crepin V.F., Mundy R., FitzGerald A.J., Cummings N., Straatman-Iwanowska A., Connerton I., Knutton S., Frankel G. The enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system effector Map binds EBP50/NHERF1: implication for cell signalling and diarrhoea. *Mol Microbiol.* 2006, 60:349-363. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05109.x.

Slater S.L., Sågfors A.M., Pollard D.J., Ruano-Gallego D., Frankel G. The Type III Secretion System of Pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018, 416:51-72. DOI: 10.1007/82_2018_116.

Smith B.P., Van Metre D.C., Pusterla N. Large Animal Internal Medicine. 6ème édition. Mosby-Saunders, 2019, 1949pp

Smith D.L., James C.E., Sergeant M.J., Yaxian Y., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E. Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria. *J Bacteriol.* 2007, 189:7223-33. DOI: 10.1128/JB.00824-07

Smith D.L., Rooks D.J., Fogg P.C., Darby A.C., Thomson N.R., McCarthy A.J., Allison H.E. Comparative genomics of Shiga toxin encoding bacteriophages. *BMC Genomics.* 2012, 16, 13:311. DOI: 10.1186/1471-2164-13-311.

Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985, 14, 228:1315-1317. DOI: 10.1126/science.4001944.

Soto E., Espinosa N., Díaz-Guerrero M., Gaytán M.O., Puente J.L., González-Pedrajo B. Functional characterization of EscK (Orf4), a sorting platform component of the enteropathogenic *Escherichia coli* injectisome. *J Bacteriol.* 2016, 13, 199:e00538-16. DOI: 10.1128/JB.00538-16.

Soysal N., Mariani-Kurkdjian P., Smail Y., Liguori S., Gouali M., Loukiadis E., et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hybrid pathotype O80:H2 as a new therapeutic challenge. *Emerg Infect Dis.* 2016, 22:1604-1612. DOI: 10.3201/eid2209.160304.

Sperandio V. and Hovde C.J. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other Shigatoxin-producing *E. coli*. *Clinical Infect Diseases.* 2016, Volume 63, Issue 2, 15 July 2016, Pages 289–290

Stevens M.P. and Frankel G.M. The locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*; Sperandio V., Hovde C.J., Eds.; ASM Press: Norwich, UK; Washington, DC, USA, 2015; pp. 97–130; ISBN 978-1-555581-878-4.

Steyert S.R., Sahl J.W., Fraser C.M., Teel L.D., Scheutz F., Rasko D.A. Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012, 7, 2:133. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00133.

Strockbine N.A., Marques L.R., Newland J.W., Smith H.W., Holmes R.K., O'Brien A.D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157 : H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun.* 1986, 53:135–140. DOI: 10.1128/iai.53.1.135-140.1986

Summers W.C. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage.* 2012, 1, 2:130-133. DOI: 10.4161/bact.20757

Suttle C.A. Viruses in the sea. *Nature.* 2005, 15, 437:356-61. DOI: 10.1038/nature04160

Swennes A.G., Buckley E.M., Parry N.M., Madden C.M., García A., Morgan P.B., Astrofsky K.M., Fox J.G. Enzootic enteropathogenic *Escherichia coli* infection in laboratory rabbits. *J Clin Microbiol.* 2012, 50:2353-8. DOI: 10.1128/JCM.00832-12

Talaro K.P., Chess B. Foundations in microbiology. McGraw-Hill education, New York, 10^{ème} edition, 2018. 879 pp.

Tampakaki A.P., Fadoulglou V.E., Gazi A.D., Panopoulos N.J., Kokkinidis M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* 2004, 6:805-16. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2004.00432.x.

Tarr P.I. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in the Western United States. The 80th Annual Meeting of the Association of Milk. *Food Environ Sanit*, 1993, Atlanta, Georgia, USA.

Tarr P.I., Bilge S.S., Vary J.C., Jelacic S., Habeeb R.L., Ward T.R., Baylor M.R., Besser T.E. Iha : a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun.* 2000, 68:1400–1407.

Tarr P.I., Gordon C.A., Chandler W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005, 19-25, 365:1073-86. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2.

Tatsuno I., Horie M., Abe H., Miki T., Makino K., Shinagawa H., Taguchi H., Kamiya S., Hayashi T., Sasakawa C. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun.* 2001, 69:6660-9. DOI: 10.1128/IAI.69.11.6660-6669.2001.

Tatsuno I., Mundy R., Frankel G., Chong Y., Phillips A.D., Torres A.G., Kaper J.B. The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 2006, 74:265-72. DOI: 10.1128/IAI.74.1.265-272.2006.

Tenaillon O., Skurnik D., Picard B. and Denamur E.. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8:207-217. DOI: 10.1038/nrmicro2298.

Thanabalasuriar A., Koutsouris A., Weflen A., Mimee M., Hecht G., Gruenheid S. The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2010, 12:31-41. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01376.x.

Thiry D., Saulmont M., Takaki S., De Rauw K., Duprez J.N., Iguchi A., Piérard D. and Mainil J.G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 in young calves with diarrhea, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2017, 23:2093-2095. DOI: 10.3201/eid2312.170450.

Thiry D., De Rauw K., Takaki S., Duprez J.N., Iguchi A., Piérard D., Korsak N., Mainil J.G. Low prevalence of the “gang of seven” and absence of the O80:H2 serotypes among Shigatoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in intestinal contents of healthy cattle at two slaughterhouses in Belgium in 2014. *J. Appl. Microbiol.* 2018, 124:867–873. DOI: 10.1111/jam.13677.

Timoney J.F. Oedema disease of swine. *Vet Rec.* 1950, 62:748-756. DOI: 10.1136/vr.62.49.748

Tomasz M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol.* 1995, 2: 575-579. DOI: 10.1016/1074-5521(95)90120-5.

Tomson F.L., Viswanathan V.K., Kanack KJ, Kanteti RP, Straub KV, Menet M, Kaper JB, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. *Mol Microbiol.* 2005 Apr;56(2):447-64. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04571.x.

- Tóth I., Schmidt H., Dow M., Malik A., Oswald E., Nagy B. 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.* 2003, 69:7242-7. DOI: 10.1128/AEM.69.12.7242-7247.2003.
- Touchon M., Perrin A., de Sousa J.A.M., Vangchhia B., Burn S., O'Brien C.L., Denamur E., Gordon D., Rocha E.P.C. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genetic.* 2020, 16:e1008866. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008866
- Tozzoli R., Grande L., Michelacci V., Ranieri P., Maugliani A., Caprioli A. and Morabito S. Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia Coli*: a world in motion. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014, 4:80. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00080.
- Trabulsi L.R., Keller R., Gomes T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Emerg Infect Dis.* 2010, 8:508–513. DOI: 10.3201/eid0805.010385
- Tran S.L., Billoud L., Lewis S.B., Phillips A.D., Schüller S. Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 and O104:H4. *Cell Microbiol.* 2014, 16:1255-66. DOI: 10.1111/cmi.12281.
- Tsai C.J., Loh J.M., Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence.* 2016, 2, 7:214-29. DOI: 10.1080/21505594.2015.1135289.
- Turner D., Kropinski A.M., Adriaenssens E.M. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses.* 2021, 18, 13:506. DOI: 10.3390/v13030506.
- Twort F.W. An investigation on the nature of ultra microscopic viruses. *Lancet.* 1915, 186, 1241–1243. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)20383-3
- Tyler J.S., Beerli K., Reynolds J.L., Alteri C.J., Skinner K.G., Friedman J.H., Eaton K.A., Friedman D.I. Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model. *PLoS Pathog.* 2013, 9:e1003236. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003236.
- Unkmeir A., Schmidt H. Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect Immun.* 2000 , 68:4856-64. DOI: 10.1128/IAI.68.9.4856-4864.2000.

- Varela G., Batthyány L., Bianco M.N., Pérez W., Pardo L., Algorta G., Robino L., Suárez R., Navarro A., Pérez M.C., Schelotto F. Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in Uruguay. *Int J Microbiol.* 2015, 2015:592953. DOI: 10.1155/2015/592953.
- Verhaegen B., De Reu K., Heyndrickx M., De Zutter L. Comparison of six chromogenic agar media for the isolation of a broad variety of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serogroups. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015, 12:6965–6978.
- Verbeke G. Towards an adequate regulatory framework for bacteriophage therapy. KU Leuven. 2015
- Viswanathan V.K., Hodges K., Hecht G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat Rev Microbiol.* 2009, 7:110-9. DOI: 10.1038/nrmicro2053.
- Wagner P.L., Livny J., Neely M.N., Acheson D.W., Friedman D.I., Waldor M.K. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2002, 44:957-70. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02950.x
- Wagner P.L., Neely M.N., Zhang X., Acheson D.W., Waldor M.K., Friedman D.I. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol.* 2001b, 183:2081-5. DOI: 10.1128/JB.183.6.2081-2085.2001.
- Wang L., Rothmund D., Curd H., Reeves P.R. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J Bacteriol.* 2003, 185:2936-43. DOI: 10.1128/JB.185.9.2936-2943.2003.
- Wani S.A., Bhat M.A., Samanta I., Nishikawa Y., Buchh A.S. *Escherichia coli* O4:NM associated with an outbreak of calf diarrhoea. *Vet J.* 2005, 169:300-2. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.01.001.
- Wick L.M., Qi W., Lacher D.W., Whittam T.S. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 2005, 187:1783-91. DOI: 10.1128/JB.187.5.1783-1791.2005
- White A., Cronquist A., Bedrick E.J. and Scallan E. Food source prediction of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks using demographic and outbreak characteristics, United States, 1998-2014. *Foodborne Pathog Dis.* 2014, 13:527–534. DOI: 10.1089/fpd.2016.2140

Whitfield C. and Roberts I.S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1999, 31:1307-1319. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01276.x.

WHO Scientific Working Group. *Escherichia coli* diarrhoea. *Bull World Health Organ.* 1980, 58(1):23-36.

Wilson D.R. and Finlay B.B. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol.* 1998, 44:313-29.

Wijnsma K.L., Schijvens A.M., Rossen J.W.A., Kooistra-Smid A.M.D.M., Schreuder M.F., van de Kar N.C.A.J. Unusual severe case of hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin 2d-producing *E. coli* O80:H2. *Pediatr Nephrol.* 2017, 32:1263-1268 DOI: 10.1007/s00467-017-3642-3.

Würzner R., Riedl M., Rosales A., Orth-Höller D. Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome (eHUS). *Semin Thromb Hemost.* 2014, 40:508-16. DOI: 10.1055/s-0034-1375298

Yang X., Sun H., Fan R., et al. Genetic diversity of the intimin gene (*eae*) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. *Sc Rep.* 2020, 10:3275-3283. DOI: 10.1038/s41598-020-60225-w.

Yokoyama K., Makino K., Kubota Y., Watanabe M., Kimura S., et al. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene.* 2000, 27, 258:127-39. DOI: 10.1016/s0378-1119(00)00416-9.

Yue W.F., Du M., Zhu M.J. High temperature in combination with UV irradiation enhances horizontal transfer of *stx2* gene from *E. coli* O157:H7 to non-pathogenic *E. coli*. *PLoS One.* 2012, 7:e31308. DOI: 10.1371/journal.pone.0031308

Zhang X., McDaniel A.D., Wolf L.E., Keusch G.T., Waldor M.K., Acheson D.W. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis.* 2000, 181:664-70. DOI: 10.1086/315239.

Zhang Y., Liao Y.T., Salvador A., Sun X., Wu V.C.H. Prediction, diversity, and genomic analysis of temperate phages induced from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Front Microbiol.* 2020, 21, 10:3093. DOI: 10.3389/fmicb.2019.03093.

Zimmermann L., Stephens A., Nam S.-Z., Rau D., Kübler J., Lozajic M., Gabler F., Söding J., Lupas A.N., Alva V. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J. Mol. Biol.* 2018, 430:2237–2243. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.12.007.

Zuppi M., Tozzoli R., Chiani P., Quiros P., Martinez-Velazquez A., Michelacci V., Muniesa M., Morabito S. Investigation on the evolution of Shiga toxin-converting phages based on whole genome sequencing. *Front Microbiol.* 2020, 10, 11:1472. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01472

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2022/0480/16

ISBN 978-2-87543-200-1

