

---

*Deuxième partie :*

*Objectifs du travail*

## Objectifs

Parmi les étapes de la pathogénèse des souches entérohémorragiques (EHEC) et vérotoxinogènes (VTEC) humaines et de ruminants, les connaissances sur les structures bactériennes permettant l'accomplissement de la première étape, la colonisation initiale de l'intestin, étaient inconnues au début des travaux et sont loin d'être complètes aujourd'hui encore. La connaissance de ces adhésines permettra la reconnaissance de la véritable spécificité d'hôte de ces souches et l'évaluation de leur potentiel zoonotique suite au développement d'outils appropriés. Cet objectif est basé sur l'hypothèse de l'existence dans au moins certains sérogroupes/types de souches EHEC et VTEC de souches à tropisme humaine, bovin ou ovin. En d'autres termes toutes les souches EHEC ou VTEC appartenant à un sérogroupe/type déterminé ne seraient pas capables d'infecter et de coloniser indifféremment l'intestin humain et l'intestin des ruminants, que ces derniers soient des porteurs sains à l'âge adulte ou des jeunes veaux diarrhéiques. Il a ainsi été démontré par des techniques d'épidémiologie moléculaire que, parmi les souches EHEC O157:H7 isolées de bovins, certains clones ne se retrouvent pas, ou extrêmement rarement chez l'homme (Caprioli *et al.*, 2005).

Notre hypothèse de travail est l'existence d'une situation similaire dans d'autres sérogroupes, dont le sérogroupe O26 : certaines souches EHEC O26 pourraient présenter un tropisme humain, d'autres un tropisme pour le jeune veau, et/ou d'autres encore un tropisme pour les ruminants adultes.

L'objectif de notre travail était donc d'identifier des structures bactériennes impliquées dans l'adhérence aux entérocytes et, donc, dans la colonisation intestinale par des souches EHEC O26, qui représenteraient une base de la spécificité d'hôte de ces souches. La recherche de tels facteurs impliqués dans le processus d'adhérence initiale peut se faire en suivant trois méthodologies: les approches cellulaire, immunologique et génétique. Les approches immunologique et génétique ont été suivies pendant ce travail.

L'approche immunologique suppose l'existence d'un antigène de surface commun à certaines souches EHEC et VTEC étudiées. L'identification de cet antigène commun peut aboutir à la reconnaissance d'un facteur impliqué dans le processus d'adhérence initiale après clonage et séquençage. Cette démarche a été suivie dans les années 1960 et 1970 pour les souches ETEC porcines et bovines (Nataro et Kaper , 1998 ; Qadri *et al.*, 2005).

L'approche génétique passe par la recherche dans une collection de souches EHEC et VTEC de séquences homologues aux opérons codant pour des adhésines reconnues pour d'autres colibacilles, et espèces bactériennes pathogènes. Après clonage et séquençage, l'identité exacte du produit du gène présent peut être déterminée.

Le travail dans l'approche immunologique repose sur la production d'un anticorps monoclonal à partir d'une souris immunisée avec des extraits protéiques de membrane externe et fimbriaires d'une souche EHEC bovine de sérotype O26 (Kerr *et al.*, 1999). Cet anticorps (2F3) réagit en test ELISA avec les souches EPEC et EHEC du groupe O26 et partiellement avec celles du sérogroupe O111, mais pas avec les souches non-AEEC appartenant aux mêmes sérogroupes, ni avec d'autres souches d'*E. coli*. Il est très possible que l'antigène détecté soit une alternative aux pili BFP pour l'attachement initial. Cette partie du travail suivra une double orientation :

- a) étudier l'anticorps monoclonal 2F3 en tant qu'outil d'épidémiologie moléculaire et confirmer la relation privilégiée qu'il présente avec les souches EPEC et EHEC des sérogroupes O26 et O111 ;
- b) identifier l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3 et déterminer sa base génétique.

Le travail dans l'approche génétique consiste à rechercher la présence de gènes d'opérons qui codent pour différents fimbriae de type I, II, III et IV par des épreuves de PCR et d'hybridation sur colonies, dans une collection des souches EHEC, VTEC et EPEC d'origine bovine et humaine. Dans le cas de résultats positifs, ces séquences homologues seront clonées et séquencées, afin de déterminer leur identité exacte. Par la suite, le rôle de ces facteurs nouvellement identifiés dans l'adhérence sur cellules eucaryotes et dans la colonisation de l'intestin pourra être recherché *in vitro* et *in vivo* après production de mutants par échange allélique.