

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

I. Définition et caractérisation des *Escherichia coli* pathogènes

Les *Escherichia coli* (*E. coli*) ont été isolés et caractérisés pour la première fois par Theodor Escherich en 1885 dans des selles d'enfant. Ces bactéries appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et possèdent donc les caractéristiques communes à cette famille : bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatives, oxydase négative et catalase positive (Croxen *et al.*, 2013). Ces bactéries, jouant un rôle important dans le système digestif de l'Homme et des animaux, représentent 80% de la flore commensale intestinale humaine. Dans ce cas, il s'agit de bactéries non pathogènes. Cependant, les bactéries ont la capacité de s'échanger des gènes par transferts horizontaux d'éléments génétiques mobiles comme des bactériophages, des transposons, des séquences d'insertion et des plasmides. Cette capacité, pouvant causer la perte ou/et le gain de nouveaux gènes, est susceptible d'entraîner l'apparition de bactéries pathogènes (Frost *et al.*, 2005, Leimbach *et al.*, 2013). Ainsi, ce phénomène a permis à une souche d'*E. coli* d'acquérir le déterminant génétique d'une toxine nommée Shiga-toxine et de créer le groupe des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), mis en évidence en 1982 aux Etats-Unis. Parmi les STEC, il existe un sous-groupe constitué par les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) qui ont comme particularité d'être isolés de cas humains.

I.1. Classification des *E. coli* pathogènes en pathovars

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 intestinaux. La majorité des pathovars connus ont la capacité d'adhérer aux cellules hôtes permettant ainsi à la bactérie d'être internalisée dans la cellule ou de lui injecter des protéines. Il existe actuellement huit pathovars d'*E. coli* pathogènes qui peuvent être classés en deux groupes, les *E. coli* intestinaux (ou « *diarrheagenic* ») et les *E. coli* extra-intestinaux. Les *E. coli* intestinaux comprennent sept pathovars responsables des troubles intestinaux : les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), les STEC (y compris les EHEC), les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC ou EA_gEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) et le dernier pathovar, identifié récemment, les *E. coli*

adhérents invasifs (AIEC). Le second groupe, les *E. coli* extra-intestinaux, est constitué de deux pathovars, les *E. coli* associés à des méningites néonatales (NMEC) et les *E. coli* uropathogènes (UPEC). D'un point de vue phylogénétique, les pathovars peuvent être classés dans cinq grands phylogroupes : A, B1, B2, D et E. Les *E. coli* commensaux (non pathogènes) sont généralement dans le phylogroupe A. En revanche, un pathovar n'est pas relié à un phylogroupe particulier (Croxen *et al.*, 2013, Croxen & Finlay, 2010, Nataro & Kaper, 1998).

1.1.1. Les *E. coli* intestinaux

Les *E. coli* entérotoxinogènes (EPEC) est le premier pathovar identifié dans le groupe des *E. coli* intestinaux. Il est responsable de la majorité des cas de diarrhée sévère chez les enfants issus de pays en voie de développement (Nataro & Kaper, 1998). Les EPEC ont pour particularité de provoquer des lésions d'attachement/effacement (A/E) sur les entérocytes intestinaux. Les lésions A/E sont codées par le locus d'effacement des entérocytes (LEE), incluant le gène *eae*, et se caractérisent par l'effacement des microvillosités intestinales puis par un détournement de l'actine de la cellule hôte pour former un piédestal sous le site d'attachement (Nataro & Kaper, 1998). En revanche, les bactéries de ce pathovar n'ont pas la capacité de produire la Shiga-toxine. Les EPEC sont classés en sous-groupes dits typiques et atypiques se différenciant respectivement par la présence ou l'absence du plasmide codant les facteurs d'adhésion des EPEC (pEAF). Après adhésion à la cellule, les EPEC injectent des facteurs de virulence par le biais d'un système de sécrétion de type III (T3SS). Ces facteurs de virulence permettent de détourner des processus propres à la cellule tels que le réarrangement du cytosquelette afin de former le piédestal, et la modulation de la réponse immunitaire qui contribue à l'apparition de la diarrhée (Croxen *et al.*, 2013, Nataro & Kaper, 1998).

Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) sont les principaux responsables de la « diarrhée du voyageur » (plus connue sous le nom de « *turista* ») mais aussi de diarrhée infantile pouvant être fatale chez les moins de cinq ans. Les ETEC adhèrent aux cellules de l'intestin grêle grâce à des facteurs de colonisation (CFs) et sécrètent des entérotoxines thermostables (ST) et des entérotoxines thermolabiles (LT) à l'origine des diarrhées. Les deux entérotoxines peuvent agir seules ou combinées (Croxen *et al.*, 2013, Nataro & Kaper, 1998).

Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) provoquent des diarrhées sanglantes et des dysenteries bacillaires. Ils possèdent le même mécanisme de pathogénicité que *Shigella*. Les EIEC sont des bactéries intracellulaires obligatoires. Par définition, elles doivent donc obligatoirement rentrer dans la cellule pour être pathogènes puisqu'elles ne possèdent pas de flagelle ni de facteur d'adhésion. Les EIEC traversent la barrière intestinale par transcytose au travers des cellules M et pénètrent dans les macrophages entraînant ainsi leur mort cellulaire. Les EIEC peuvent aussi coloniser les cellules du côlon, se multiplier puis traverser transversalement une cellule pour aller dans une cellule adjacente par l'intermédiaire d'un bras d'actine et entraîner ainsi une lyse cellulaire (Croxen *et al.*, 2013, Nataro & Kaper, 1998).

Les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC ou EAaggEC) sont la cause de diarrhées persistantes chez les enfants et les personnes atteintes du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ils sont considérés comme la deuxième cause responsable de la « diarrhée du voyageur ». Les EAEC colonisent les muqueuses de l'intestin grêle et du gros intestin par des mécanismes d'adhésions agrégatives entraînant la formation de « briques empilées » grâce à des adhésines fimbriaires ou « *aggregative adherence fimbriae* » (AAFs) codées par le plasmide pAA et forment ainsi un biofilm compact. Les EAEC sont aussi responsables de dommages au niveau de la muqueuse intestinale par l'intermédiaire de cytotoxines qu'ils sécrètent (Croxen *et al.*, 2013, Nataro & Kaper, 1998).

Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) sont responsables de diarrhées aqueuses chez les jeunes enfants (de 18 mois à 5 ans) et peuvent être associés à des infections urinaires. Les DAEC colonisent l'intestin grêle en se fixant aux cellules par adhésion diffuse et interagissent avec le facteur DAF (« *decay-accelerating factor* ») entraînant des lésions au niveau des bordures en brosse et notamment des pertes de microvillosités (Croxen *et al.*, 2013, Nataro & Kaper, 1998).

Les *E. coli* adhérents invasifs (AIEC) sont un des agents causaux de la maladie de Crohn, causant l'inflammation de l'intestin grêle. Les AIEC ont la particularité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales grâce à l'interaction entre leurs pili et des protéines de surface. Ils ont aussi la capacité de pénétrer dans les macrophages et de s'y répliquer (Croxen *et al.*, 2013, Nataro & Kaper, 1998).

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables d'épidémies de gastroentérites sévères chez l'Homme pouvant évoluer vers une colite hémorragique (CH) et/ou un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les EHEC possèdent plusieurs facteurs de virulence comme la Shiga-toxine et, pour les EHEC typiques, le locus d'effacement des entérocytes (LEE), incluant le gène *eae*, que l'on retrouve aussi chez les EPEC et qui provoque des lésions A/E. Le sérotype O157:H7, souvent impliqué dans les épidémies de gastroentérites chez l'Homme appartient à ce pathovar. Les EHEC ont notamment la particularité d'injecter environ deux fois plus de facteurs de virulence (dont la plupart sont redondants) que les EPEC. Ils possèdent ainsi un avantage compétitif sur les autres bactéries. D'autre part, le mécanisme de formation du piédestal à la surface des cellules est légèrement différent de celui des EPEC mais la finalité est similaire. Pour finir, les EHEC peuvent utiliser des hormones de la cellule telles que l'adrénaline et la noradrénaline ainsi que des molécules du quorum-sensing pour réguler leur motilité et l'expression de leurs T3SS (Croxen *et al.*, 2013, Nataro & Kaper, 1998).

Il existe donc une très grande et complexe diversité d'*E. coli* responsables de troubles intestinaux avec des mécanismes d'adhésion et d'action plus ou moins différents selon les pathovars (Figure 1). 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.

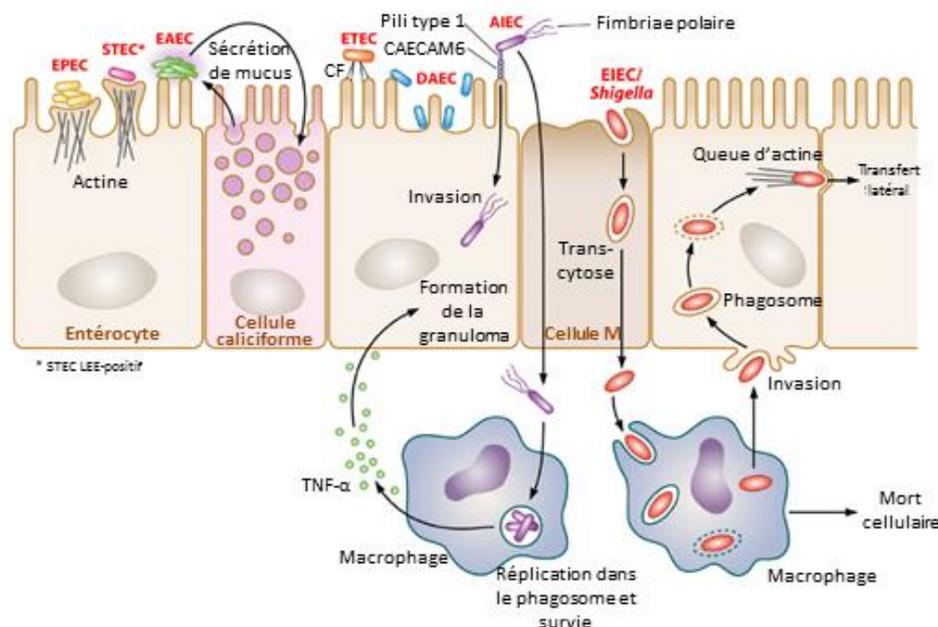


Figure 1. Les sept pathovars d'*E. coli* intestinaux et leurs mécanismes d'action
(Adaptée de Croxen *et al.*, 2013)

I.1.2. Les E. coli extra-intestinaux

Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont la cause de cystites dans la vessie et de pyélonéphrites aiguës dans les reins. L'adhésion et l'invasion des cellules de l'épithélium urinaires entraînent l'apoptose et l'exfoliation des cellules de la vessie (Croxen & Finlay, 2010).

Les *E. coli* associés à des méningites néonatales (NMEC) sont capables de passer la barrière intestinale pour se retrouver dans la circulation sanguine et ainsi rejoindre le système nerveux central. Ils peuvent alors provoquer des inflammations, des œdèmes et des dommages neuronaux. La colonisation initiale se fait par acquisition périnatale par l'intermédiaire de la mère (Croxen & Finlay, 2010).

I.2. Classification des *E. coli* en sérogroupes et sérotypes

Une autre classification des *E. coli* est basée sur la caractérisation des antigènes de surfaces décrits par Kauffman en 1944, et plus particulièrement sur les antigènes somatiques O et les antigènes flagellaires H (Nataro & Kaper, 1998). Les antigènes O définissent le séroroupe d'une souche. Ils peuvent être caractérisés par des méthodes de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) basées sur l'amplification des gènes *wzx* et *wzy*. Les antigènes H, quant à eux, permettent d'obtenir le sérotype d'une souche. Ils sont caractérisés par l'amplification des allèles du gène *fliC*. Il existe au total 184 antigènes O et 53 antigènes H (Croxen *et al.*, 2013, Iguchi *et al.*, 2015).

1.2.1. Les antigènes somatiques O

Les antigènes somatiques O sont un des trois constituants du lipopolysaccharide (LPS) ancré dans la membrane externe des bactéries Gram-négatif (Figure 2). Les deux autres constituants du LPS sont le lipide A, considéré comme toxique et très conservé chez *Escherichia coli*, et la région cœur. L'antigène O, lié à la région cœur, est constitué de 10 à 25 unités de répétitions composées de 2 à 7 résidus de sucres (Stenutz *et al.*, 2006).

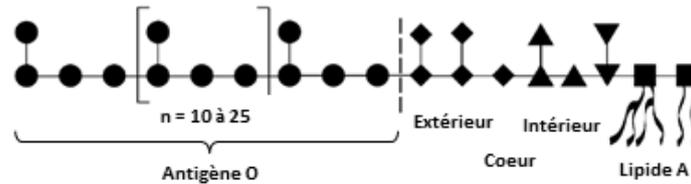


Figure 2. Schéma de la structure d'une molécule de lipopolysaccharide bactérien

Les lipides sont représentés par les lignes courbées et les sucres sont par : Glucosamine (GlcN) (■), acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique (Kdo) (▼), heptose (▲), hexose (◆), composés de l'antigène O (●), plus fréquemment de l'hexose. (Adaptée de Stenutz *et al.*, 2006)

Les gènes nécessaires à la biosynthèse de l'antigène O sont regroupés dans un opéron sur un locus chromosomique flanqué par les gènes de biosynthèse des acides colaniques (gènes *wca*) et de l'histidine (*his*) (Iguchi *et al.*, 2015). Actuellement, il existe un peu plus de 90 types d'opérons de biosynthèse de l'antigène O. La diversité des sérogroupes est liée à des structures génétiques différentes engendrées par des transferts horizontaux ou le remplacement d'une partie ou de la totalité du cluster de gènes de biosynthèse de l'antigène O, mais aussi par l'intermédiaire de mutations ponctuelles (Iguchi *et al.*, 2015).

1.2.1. Les antigènes flagellaires H

Les antigènes flagellaires H font partis de la région centrale de la protéine formant le flagelle de la bactérie, la flagelline. Contrairement aux régions terminales de la flagelline qui sont très conservées, la région centrale, très variable, confère un sérotype spécifique à la bactérie (Wang *et al.*, 2003). Un peu plus de 40 gènes sont impliqués dans l'assemblage, la structure et la fonction du flagelle. Ces gènes sont répartis dans quatre clusters dont un contient le gène *fliC* (Wang *et al.*, 2003).

I.3. Classification des STEC selon leurs sérotypes et séropathotypes

I.3.1. *Les sérotypes majeurs*

Il existe plus de 200 sérotypes de STEC associés à l'apparition de symptômes cliniques sévères chez l'Homme tels que la colite hémorragique (CH) et le syndrome hémolytique et urémique (SHU) (Anses, 2012a). Cependant, selon l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA ou « *European Food Safety Authority* »), les cinq sérotypes majeurs impliqués dans des cas d'infections humaines sont O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 (EFSA, 2009) appelé plus communément le « *top five* ». Les souches appartenant à l'un de ces sérotypes ont été définies par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (Anses) comme souches « EHEC typiques majeures ». Le sérotype O157:H7 est le plus fréquemment retrouvé et concerne 64% des cas de SHU en Europe entre 2002 et 2006 (Anses, 2012a).

Les STEC du sérotype O26:H11 appartiennent au phylogroupe B1 (Croxen *et al.*, 2013) et sont considérés comme le second sérotype majeur associé à des cas sévères en Europe et aux Etats-Unis (Bletz *et al.*, 2013). Ce sérotype a été identifié pour la première fois dans une épidémie de SHU en 1983 par Karmali *et al.* (Karmali *et al.*, 1985, Karmali *et al.*, 1983). Il a ensuite été identifié à plusieurs reprises aussi bien aux Etats-Unis que dans plusieurs pays européens (Bielaszewska *et al.*, 2013, Brooks *et al.*, 2005, Zimmerhackl *et al.*, 2010). Une étude, effectuée en Autriche et en Allemagne sur des patients atteints de SHU durant une période de six ans (entre 1997 et 2002), a montré que 15,4% de tous les EHEC isolés appartenaient au sérotype O26:H11 (Zimmerhackl *et al.*, 2010). Aux Etats-Unis, l'analyse de 940 STEC non-O157 isolés entre 1983 et 2002, a montré que 22% étaient du sérotype O26 (Brooks *et al.*, 2005). Enfin, en Europe, 12% des EHEC isolés en 2012 appartenaient au sérotype O26:H11 (EFSA, 2014).

I.3.2. *Les séropathotypes*

Une classification en séropathotype a été créée pour différencier les STEC selon leur fréquence d'implication dans des épidémies, et en fonction de l'incidence relative des sérotypes dans les infections humaines et de la sévérité de la maladie déclenchée chez l'Homme. Cinq séropathotypes, caractérisés par les lettres A à E, ont été décrits (Tableau 1) (Karmali *et al.*, 2003). Les séropathotypes A et B sont associés à des épidémies, contrairement aux séropathotypes C, D et E qui ne le sont pas ou plus rarement. Le séropathotype A, comprenant les STEC du sérotype O157:H7 et O157:NM (Non Motile), est particulièrement impliqué dans les cas graves (SHU).

Le sérotypage B, moins fréquemment associé à des SHU, contient notamment les sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 et O145:NM. Généralement, les STEC, ne possédant pas le locus d'effacement des entérocytes (LEE), sont dans le sérotypage C impliqué dans des cas sporadiques de SHU. Il contient les sérotypes O91:H21, O104:H21, O113:H21, O5:NM, O121:NM and O165:H25. Le sérotypage D, qui concernent plusieurs sérotypes, est à l'origine de diarrhée sans aggravation vers un SHU. Le sérotypage E, quant à lui, concernent plusieurs sérotypes de STEC qui n'ont jamais été associés à des maladies chez l'Homme et qui ont seulement été isolés chez les animaux (Karmali *et al.*, 2003, Croxen *et al.*, 2013, EFSA, 2013).

Tableau 1. Classification des STEC en sérotypages

(Adapté de Karmali *et al.*, 2003)

Sérotypage	Incidence relative	Fréquence d'implication dans des épidémies	Association avec des maladies graves ^a	Sérotypes
A	Haute	Commune	Oui	O157:H7, O157:NM
B	Modérée	Exceptionnelle	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Faible	Rare	Oui	O91:H21, O104:H21, O113:H21 ; autres
D	Faible	Rare	Non	Multiples
E	Non humaine seulement	NA ^b	NA	Multiples

^a Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) ou Colites Hémorragiques (CH)

^b Non Applicable

Cette classification est toutefois un peu controversée selon un rapport plus récent de l'EFSA suite aux épidémies qui ont eu lieu en Europe entre 2007 et 2010 (EFSA, 2013). L'EFSA propose une nouvelle approche de classification où les STEC, ayant été impliqués dans des cas de SHU et pour lesquels le sérotypage a été entièrement réalisé, pourraient être automatiquement classés dans le sérotypage HAS pour « *HUS-associated serotype(s)* ». Ce nouveau sérotypage inclurait donc la majorité des souches responsables de décès, d'hospitalisations, de cas de diarrhées sanglantes, ainsi que la totalité des cas de SHU (EFSA, 2013).

I.4. Relation entre les STEC, EHEC, EPEC et les AEEC

Un autre groupe différent des pathovars décrits précédemment a été mis en évidence sous l'appellation d'*E. coli* attachant et effaçant (AEEC ou « Attaching and Effacing *E. coli* ») (Bielaszewska *et al.*, 2008). Les AEEC ont la particularité de provoquer des lésions d'attachement/effacement (A/E) et ne possèdent pas le gène *stx* codant la Shiga-toxine. Ils

peuvent aussi bien correspondre à des EPEC, typique ou atypique (marqué par l'absence du plasmide pEAF), qu'à des EHEC ayant perdus leur gène *stx* (Figure 3) (Bielaszewska *et al.*, 2008, Afssa, 2010). La parenté des AEEC avec les EHEC a été démontrée par Bielaszewska *et al.*, grâce à la comparaison des profils MLST (multilocus sequence typing). Il a ainsi été montré que les AEEC et les EHEC du même sérotype se retrouvaient dans le même complexe clonal indiquant une proche parenté entre eux (Bielaszewska *et al.*, 2008).

La figure 3 représente les relations entre les STEC, les EHEC et les AEEC. Elle permet de mettre en évidence que, selon un rapport de l'Afssa, l'ensemble des souches d'*E. coli* possédant le LEE, incluant le gène *eae*, peuvent être regroupées sous le terme d'AEEC. De plus, toutes les souches possédant le gène *stx* appartiennent au groupe des STEC, quelques soient les signes cliniques associés. Les EPEC, ne possèdent pas le gène *stx* et constituent un sous-groupe des AEEC, responsable de diarrhée sévère chez l'Homme. Les EHEC ont des caractéristiques communes aux AEEC et STEC car ils possèdent le LEE et le gène *stx* (Figure 3) (Afssa, 2010, Anses, 2012a, Kaper *et al.*, 2004). Toutefois, les EHEC se caractérisent selon trois sous-groupes, (i) les EHEC typiques concernent les EHEC qui possèdent le LEE, (ii) les EHEC typiques majeurs possèdent le LEE et appartiennent au « top five » (sérogroupes O157, O26, O103, O111 et O145) généralement responsable de SHU, et enfin (iii) les EHEC atypiques désignent les souches qui ne possèdent pas le gène *eae* et qui ont donc l'incapacité de produire des lésions A/E ; c'est la cas de la souche O104:H4 responsable de l'épidémie de 2011 impliquant des graines germées (Anses, 2012a, Afssa, 2010).

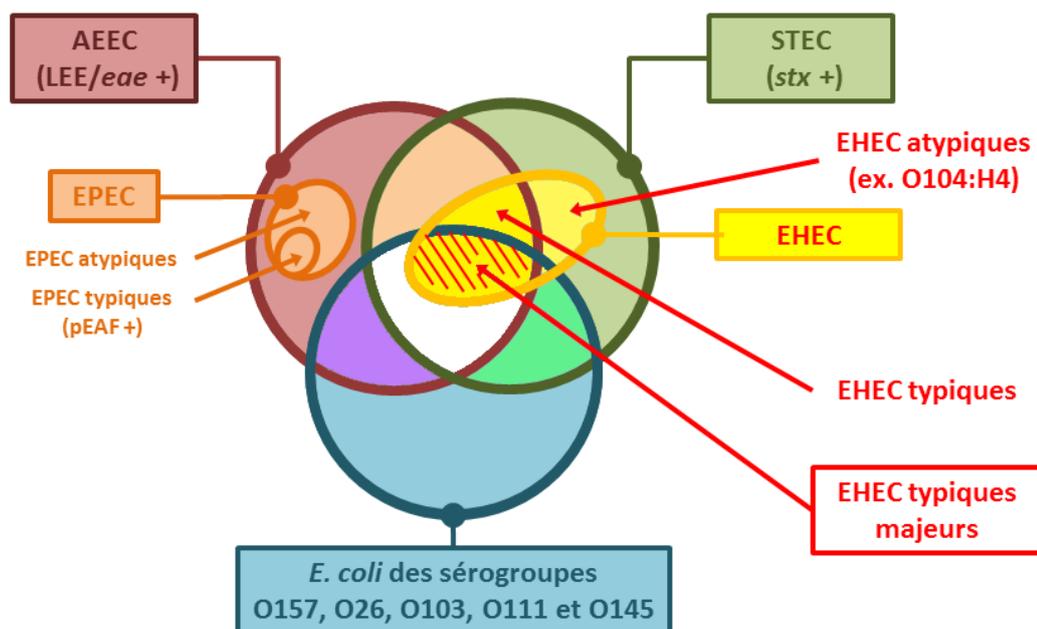


Figure 3. Classification des STEC, EHEC, EPEC et AEEC

STEC : *E. coli* producteurs de Shiga-toxines ; EHEC : *E. coli* entérohémorragiques ; EPEC : *E. coli* entéropathogènes ; AEEC : *E. coli* attachant et effaçant. pEAF : plasmide codant les facteurs d'adhésion des EPEC (Adaptée du rapport Anses de 2012 et de l'avis Afssa de 2010)

II. Aspects épidémiologiques relatifs aux STEC

II.1. Les voies de contamination des STEC

II.1.1. Le portage des STEC

Le principal réservoir des STEC sont les ruminants et plus particulièrement les bovins, qui les hébergent de façon asymptomatique dans leur tube digestif (Caprioli *et al.*, 2005). Plus de 435 sérotypes de STEC ont été recensés dans les bovins (Gyles, 2007). Plusieurs études ont évoqué la prévalence des STEC chez les bovins mais les résultats diffèrent selon le plan d'échantillonnage et la méthode choisie. Cette prévalence varie en effet entre 0 et 71% chez les bovins. En revanche, la prévalence des STEC dans les veaux ne dépasse pas 9,9%. Enfin, l'excrétion (ou la perte) des STEC semble être liée à l'âge et au sevrage des veaux mais aussi aux saisons avec une excrétion plus forte en été qu'en hiver (Gyles, 2007).

De plus, une étude sur la prévalence des STEC O157 dans les fèces de bovins a été menée en France par Andral *et al.* Cette étude, réalisée entre 1998 et 2001 dans trois abattoirs situés dans le Massif Central et dans le Rhône, a mis en évidence la présence de *E. coli* O157 dans cinq échantillons de matières fécales sur 201 soit une prévalence de 2,5% (Andral *et al.*, 2004). Comparé au rapport de l'Anses en 2010, ces résultats sont cohérents avec les prévalences observées dans les autres pays européens comprises entre 0 et 16% dans les matières fécales (Anses, 2010). En France, la prévalence du portage des STEC du « top five » chez les bovins a été estimée à 1,8% (Bibbal *et al.*, 2015).

En revanche, une étude a montré que lors de la récente épidémie de 2011, les STEC du sérotype O104:H4 (provenant d'un EAEC) n'étaient pas portés par les bovins français (Auvray *et al.*, 2012). Cette observation a été confirmée et étendue à l'ensemble des EAEC (Bibbal *et al.*, 2014).

Outre les bovins, d'autres animaux d'élevage peuvent être porteurs sains de STEC tels que les caprins, les ovins, les porcs, les volailles et les lapins mais aussi des animaux domestiques et sauvages tels que les chiens, les chevaux et les oiseaux (Gyles, 2007). Une récente étude réalisée en Norvège a montré que le mouton serait un important réservoir de STEC du sérotype O26:H11 (Brandal *et al.*, 2012).

II.1.2. La transmission des STEC

Les voies de contamination de l'Homme par les STEC sont assez variées (Figure 4). La plus importante d'entre elles est la consommation d'aliments contaminés d'origine animale, notamment la viande (cru ou pas assez cuite) et les produits laitiers à base de lait cru ou pasteurisé de vache ou de chèvre (Gyles, 2007, Afssa, 2008). Des contaminations par

ingestion de végétaux (comme des légumes crus) ou d'eau contaminés font également parties des voies de contamination de l'Homme. Cette contamination est généralement liée au relargage d'effluents des abattoirs et d'élevage mais aussi des fèces des animaux porteurs de STEC qui contaminent les sols, et qui par le biais de ruissellement et d'irrigation entraînent la contamination de l'eau et des cultures de végétaux (Figure 4). Pour finir, des contaminations par contact direct entre individus (Homme-Homme et Animal-Animal) ou par le biais d'animaux porteurs et excréteurs de STEC (notamment les bovins) sont possibles (Caprioli *et al.*, 2005, Afssa, 2010).

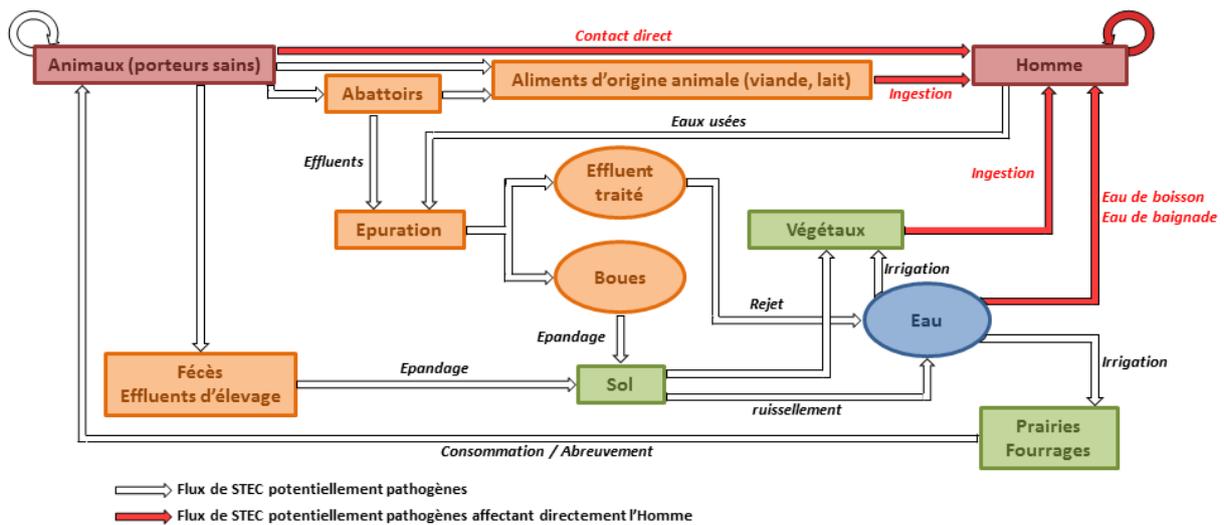


Figure 4. Flux des STEC et voies de contamination de l'Homme par des EHEC
(Adaptée du rapport Anses 2012)

II.2. Manifestations cliniques chez l'Homme

Les infections causées par les STEC constituent un problème majeur en santé publique en raison de la sévérité des manifestations cliniques qu'ils génèrent. Les jeunes enfants et les personnes âgées sont les personnes les plus sensibles à ce danger (Afssa, 2008).

Quelques soit le mode de transmission, l'infection par des STEC entraîne l'apparition de différents symptômes se traduisant par des diarrhées, des CH pouvant conduire à un SHU et un Purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT). La figure 5 montre la progression de l'infection par les EHEC du sérotype O157:H7 décrite par Tarr *et al.* (Tarr *et al.*, 2005).

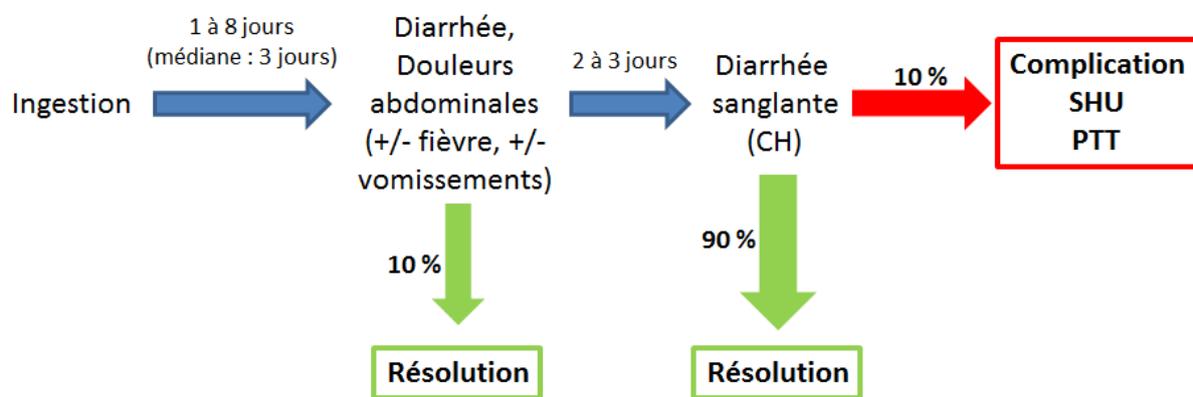


Figure 5. Progression d'infection par les EHEC O157:H7
(d'après Tarr *et al.*, 2005)

II.2.1. Les colites hémorragiques (CH)

Les CH ont été mises en évidence pour la première fois en 1971. Elles sont caractérisées par une manifestation soudaine de crampes abdominales suivies d'une diarrhée aqueuse quelques heures après qui se poursuit rapidement vers une hémorragie gastro-intestinale à l'origine de la diarrhée sanglante avec peu ou pas de fièvre (Riley *et al.*, 1983, Karmali *et al.*, 2010, O'Brien *et al.*, 1983, Karmali, 1989). Dans la majorité des cas, les patients guérissent, mais pour 10% d'entre eux des complications apparaissent tels que le SHU ou le PTT et dans de très rares cas, un rétrécissement de l'intestin (Tarr *et al.*, 2005).

II.2.2. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Le SHU a été décrit pour la première fois en 1955 mais le lien entre le SHU et l'infection par des STEC n'a été établi qu'en 1983 par Karmali *et al.* (Karmali *et al.*, 1983, Karmali, 1989). Le SHU se traduit par trois symptômes caractéristiques : une anémie

hémolytique (taux d'hémoglobine réduit), une thrombocytopénie (diminution des plaquettes) et une insuffisance rénale aiguë (Tarr *et al.*, 2005, Karmali *et al.*, 2010). Le SHU touche particulièrement les jeunes enfants et se déclenche seulement quelques jours après l'apparition d'une diarrhée prodromique aiguë. Suite au développement d'un SHU durant l'enfance, des séquelles peuvent être encore présentes. A long terme, elles concernent surtout des atteintes de la fonction rénale. Lors d'une épidémie en 1993, la majorité des personnes ayant survécu ont retrouvé une fonction rénale normale au bout de cinq ans. Les séquelles à long terme sont généralement associées au degré de sévérité du SHU et du temps de prise en charge pour une première dialyse (Tarr *et al.*, 2005).

II.2.3. Le purpura thrombolique et thrombocytopénique (PTT)

Le PTT, découvert en 1924, est un dérivé du SHU et touche principalement les adultes (Karmali, 1989). Tout comme le SHU, il se traduit par une anémie hémolytique, une thrombocytopénie et une insuffisance rénale aiguë mais à la différence du SHU, ces symptômes sont accompagnés de fièvre et de troubles neurologiques. Dans 75% des cas, les patients atteints de PTT sont décédés au bout de 90 jours, quant aux autres, ils gardent de graves séquelles. Le lien entre le PTT et une infection par des STEC a été mis en évidence par Kovacs *et al.* en 1990 (Kovacs *et al.*, 1990).

II.3. Les épidémies et les moyens de lutte

II.3.1. Les épidémies associées au STEC

Depuis 2002, l'Anses a recensé en France plusieurs épidémies et cas groupés d'infection dus à des EHEC à l'origine de SHU, impliquant les sérotypes majeurs O157:H7 et O26:H11 mais aussi d'autres sérotypes moins fréquents (Tableau 2) (Anses, 2012b). Les aliments incriminés étaient majoritairement du fromage au lait cru et de la viande de bœuf. Lors de l'épidémie de 2005, des camemberts au lait cru contaminés par des STEC O26:H11 ont entraîné 16 cas de SHU. Bien que la totalité des personnes ayant été infectées ont développé un SHU, cette épidémie n'a entraîné aucun décès. Les résultats microbiologiques ont montré que la souche possédait les gènes *stx2* et *eae* (Espie *et al.*, 2006b). Cette souche a été nommé 21765 et a été très récemment entièrement séquencée par une équipe française (Galia *et al.*, 2015).

En 2011, une épidémie, causée par la consommation de graines germées de fenugrec contaminées par des STEC, a eu lieu en Allemagne et en France. Cette épidémie, qui n'impliquait pas un sérotype du « top five », était due au sérotype O104:H4 (Frank *et al.*, 2011, Gault *et al.*, 2011). Lors de cette épidémie, 3816 cas humains ont été recensés en Allemagne dont 845 cas de SHU et 54 décès. La France, quant à elle, n'a connu que 15 cas humains dont 9 SHU (Anses, 2012a, Hauser *et al.*, 2013, Anses, 2015). Les résultats microbiologiques ont montré que les souches incriminées possédaient les gènes *stx2* (et plus particulièrement le variant *stx2a*) et *eae*. De plus, le séquençage du génome complet de la souche épidémique a montré qu'il s'agissait d'une EAEC ayant acquis un phage Stx et son gène *stx* codant la Shiga-toxine (Bielaszewska *et al.*, 2011).

Tableau 2. Epidémies et cas groupés d'infections dues aux EHEC recensés en France entre 2002 et 2013

(Selon les rapports de l'Anses 2012 et de l'InVs 2013)

Année	Sérotype EHEC impliqués	Nombre total de malade (nombre de SHU)	Aliment incriminé	Référence
2002	O148:H8	11 (2)	Viande de mouton	(Espie <i>et al.</i> , 2006a)
2004	O157:H7	3 (2)	Fromage au lait cru de chèvre	(Espie <i>et al.</i> , 2006c)
2005	O157:H7	69 (17)	Viande hachée de bœuf congelée	(King <i>et al.</i> , 2009)
2005	O26:H11/O80:H2	16 (16)	Camembert	(Espie <i>et al.</i> , 2006b)
2009	O123:H-	2 (1)	Hamburger	(King <i>et al.</i> , 2010)
2011	O104:H4	15 (9)	Germes de fenugrec	(King <i>et al.</i> , 2012a)
2011	O157:H- /O177:H25	18 (18)	Viande hachée de bœuf congelée	(King <i>et al.</i> , 2012b)
2012	O157:H7	6 (4)	Viande hachée de bœuf fraîche	(Barret <i>et al.</i> , 2013)
2013	O157:H7	8 (5)	Fromage au lait cru	(InVS, 2013)

En 2013, d'autres cas groupés d'infection à EHEC ont été recensés en France par l'institut de veille sanitaire (InVS). Sept foyers familiaux à EHEC ont été identifiés par le système de surveillance et comprenaient au total neuf cas de SHU (InVS, 2013). Parmi ces sept foyers, cinq d'entre eux comprenaient un enfant atteint de SHU dont un dû à un EHEC O157, deux dus à un EHEC O26, un dû à un EHEC O121 et un autre pour lequel le sérotype n'a pas pu être identifié. Les deux autres foyers comprenaient chacun deux enfants

atteints de SHU dû à un EHEC O121 et à un EHEC dont le sérotype n'a pas pu être identifié (InVS, 2013).

Les autres pays ne sont pas épargnés par ces problèmes. Des épidémies suites à des infections par des STEC du sérotype O26:H11 ont été recensées aux Etats-Unis ainsi que dans plusieurs pays d'Europe mais aussi en Amérique du Sud, en Asie et en Australie (Bielaszewska *et al.*, 2013).

II.3.2. Surveillance des SHU en France

En France, une surveillance des SHU a été effectuée entre 1996 et 2013 chez les enfants de moins de 15 ans. Depuis 1996, l'incidence annuelle moyenne des SHU est de $0,8/10^5$ enfants de moins de 15 ans (Tableau 3). En 2013, 152 cas de SHU ont été identifiés dont 32% des cas concernaient le sérotype O157 et 14% le sérotype O26. De plus, en 2013, 98% des souches EHEC isolées d'enfants possédaient le gène *stx2* associé ou non avec le gène *stx1*. Pour finir, depuis le début des années 2000, l'institut de veille sanitaire (InVS) a pu observer une part croissante significative des cas de SHU identifiés en France attribuables aux sérotypes non-O157, cette part était de 28% entre 1996 et 2004 puis de 54% entre 2005 et 2013 dont 11% concernent le sérotype O26 pour la période 1996-2013 (InVS, 2013).

Tableau 3. Incidence annuelle des SHU par 100 000 enfants de moins de 15 ans en France entre 1996-2013.

(InVS, 2013)

Année	Nombre de cas de SHU	Incidence annuelle	Année	Nombre de cas de SHU	Incidence annuelle
1996	81	0,66	2006	104	0,87
1997	92	0,75	2007	74	0,62
1998	76	0,59	2008	112	0,94
1999	93	0,76	2009	109	0,91
2000	79	0,64	2010	122	0,99
2001	74	0,61	2011	162	1,32
2002	73	0,60	2012	145	1,20
2003	80	0,66	2013	152	1,22
2004	87	0,72	Total	1837	0,77
2005	122	1,01			

II.3.3. Traitements

Il existe plusieurs traitements basés sur une approche multi-cible utilisés lors d'une infection par des EHEC dans les cas de SHU (Goldwater & Bettelheim, 2012). Ces traitements consistent à utiliser des agents antiplaquettaires et thrombolytiques, des inhibiteurs de thrombine et plus sélectivement, des antimicrobiens, des probiotiques, des neutralisateurs de toxines et des anticorps dirigés contre des éléments clés de la voie pathogénique afin d'interrompre le processus pathologique (Goldwater & Bettelheim, 2012).

L'utilisation des antibiotiques est contre-indiquée puisqu'ils augmenteraient potentiellement le développement de complications comme le SHU. Une étude a été effectuée sur 71 enfants de moins de dix ans atteints de diarrhée causée par *E. coli* O157:H7. Elle confirme que l'utilisation d'antibiotique augmente le risque de développement de SHU (Wong *et al.*, 2000). En effet, l'utilisation des antibiotiques est responsable de l'induction de l'expression des Shiga-toxines (Stx). De ce fait, il existe très peu de thérapies qui détruiraient les STEC sans induire la production des Stx (Melton-Celsa & O'Brien, 2014).

Une étude menée en 2014 par Melton-Celsa & O'Brien, montre que de nouvelles thérapies potentielles, d'abord testées *in vitro*, seraient efficaces chez les animaux. Ces thérapies sont basées sur des anticorps monoclonaux dirigés contre les Stx de type 1 et 2 (Stx1 et Stx2) (Melton-Celsa & O'Brien, 2014). Melton-Celsa *et al.* ont très récemment décrit l'efficacité de ces anticorps monoclonaux, nommés calphaStx1 et calphaStx2, chez la souris, (Melton-Celsa *et al.*, 2015). En effet, des souris, inoculées avec une dose létale de Stx1, étaient protégées de l'intoxication grâce à l'injection de l'anticorps calphaStx1. Cet anticorps a été efficace une heure avant et une heure après l'injection de la toxine. Cependant, l'association des deux anticorps est nécessaire pour protéger les souris de la présence combinée de Stx1 et Stx2. Cette stratégie thérapeutique pourrait être utilisée de façon préventive ou comme premier traitement dans le cas d'un développement de SHU (Melton-Celsa *et al.*, 2015) et représenterait une avancée considérable de la lutte contre les STEC.

III. Facteurs de virulence des STEC

III.1. Les Shiga-toxines

Les Shiga-toxines sont considérées comme le principal facteur de virulence des STEC. Elles sont codées par les gènes *stx* présents au sein du génome des bactériophages Stx (ou phages Stx) (Smith *et al.*, 1983, Schmidt, 2001, O'Brien *et al.*, 1984).

*III.1.1. Types et variants du gène *stx**

Il existe deux grands types de Shiga-toxines, les Shiga-toxines de type 1 (Stx1) et les Shiga-toxines de type 2 (Stx2). Les gènes *stx1* et *stx2* sont eux même décomposés en plusieurs variants. Il existe trois variants du gène *stx1* (*stx1a*, *stx1c* et *stx1d*), et sept variants pour le gène *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* et *stx2g*) (Scheutz *et al.*, 2012). Les toxines Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99% et 56% d'identité avec la toxine Stx de *Shigella dysenteriae*. De ce fait, Stx1 est neutralisable par les anticorps Anti-Stx de *Shigella dysenteriae* ce qui n'est pas le cas de Stx2 (Strockbine *et al.*, 1986). Les STEC peuvent contenir un seul ou les deux types de gènes, *stx1* et/ou *stx2*. Ils peuvent aussi posséder deux gènes du même type mais dans ce cas, il s'agit de deux variants différents. Enfin, il a été démontré que Stx2 est plus fréquemment associée aux cas graves que Stx1 (Boerlin *et al.*, 1999) et plus particulièrement les variants *stx2a* et *stx2c*. La forte association du variant *stx2a* à des cas de SHU a été soulignée lors de l'épidémie de 2011 en Allemagne (Frank *et al.*, 2011, Melton-Celsa, 2014).

III.1.2. Description structurale de la toxine

Les Shiga-toxines sont codées par un opéron de 1230 pb. Cet opéron est constitué de deux gènes, le gène *stxA* codant une sous-unité A et le gène *stxB* codant cinq sous-unités B. La sous-unité A (32 kDa) constitue le domaine catalytique. Elle est composée de deux parties, la sous-unité A₁ contenant le site actif et le peptide A₂ relié d'une part à la sous-unité A₁ par un pont disulfure, et d'autre part, au pentamère de sous-unités B. Le pentamère de sous-unités B (7,7 kDa par monomère) constitue le domaine de liaison aux cellules endothéliales humaines. La protéine complète forme un hétérohexamère de 70 kDa (Figure 6) (Gyles, 2007, Melton-Celsa, 2014).

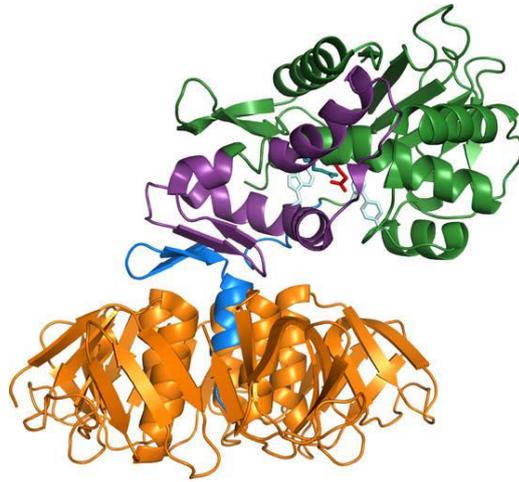


Figure 6. Structure de la Shiga-toxine

Le pentamère de sous-unité B est représenté en orange. Le peptide A₂ est en bleu. La majorité de la sous-unité A₁ est représentée en vert tandis que la région d'interaction de la sous-unité A₁ avec le ribosome (cible de la toxine) est en violet. Le site actif est représenté en bleu ciel mais le résidu actif (position 167) est en rouge. (Melton-Celsa, 2014)

III.1.3. Mécanisme d'action

La toxine Stx n'étant pas préformée dans l'aliment, les STEC ingérés doivent tout d'abord coloniser l'épithélium intestinal par l'intermédiaire des lésions A/E (voir III.2.1). Une fois cette liaison effectuée, la bactérie va produire la toxine Stx, qui va traverser la barrière intestinale et se retrouver dans la circulation sanguine pour atteindre les cellules endothéliales vasculaires de certains tissus (rein, côlon, cerveau).

La toxine Stx, par le biais des sous-unités B, se fixe au récepteur Gb3 présent à la surface des cellules endothéliales. Elle est ensuite internalisée dans la cellule par endocytose et transportée de manière rétrograde à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. La sous-unité A est ensuite scindée en deux sous-unités A1 et A2, la sous-unité A1 subit une translocation dans le cytoplasme puis va exercer son activité N-glycosidase sur l'adénosine 2348 de l'ARN ribosomal 28S entraînant le blocage de la sous-unité 60S du ribosome. Il en résulte l'arrêt de la synthèse protéique puis la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Croxen *et al.*, 2013).

III.1.4. Différences entre Stx1a et Stx2a

D'après la revue de Melton-Celsa, il existe des différences entre les toxines Stx1a et Stx2a. En effet, l'analyse de la composition en acides aminés (aa) permet de différencier ces deux toxines : la sous-unité A de Stx1a est composée de 293 aa contre 297 aa pour celle de Stx2a. Une différence peut également être observée au niveau de la sous-unité B puisqu'elle est composée de 69 aa pour Stx1a contre 71 aa pour Stx2a (Melton-Celsa, 2014). Une

différence a également été observée en termes de toxicité. Lors de tests effectués dans les cellules Vero (lignée utilisée pour les cultures cellulaires), il a été constaté que Stx1a était dix fois plus cytotoxique que Stx2a. En revanche, l'inverse a été observé chez les souris, où Stx2a est 100 fois plus cytotoxique que Stx1a. De plus, des tests sur des cellules endothéliales microvasculaires rénales humaines ont montré que ces cellules étaient 1000 fois plus sensibles à Stx2a qu'à Stx1a (Melton-Celsa, 2014). Cette différence de toxicité serait liée aux sous-unités B qui sont particulièrement importantes pour l'acheminement de la toxine dans le tractus gastro-intestinal (Russo *et al.*, 2014).

III.2. Les autres facteurs de virulence

III.2.1. *Le locus d'effacement des entérocytes*

L'habilité des *E. coli* à susciter un effet histopathologique sur les cellules épithéliales intestinales est désignée par le terme « lésions d'attachement et d'effacement » (A/E) (Moon *et al.*, 1983). Les gènes responsables des lésions A/E sont regroupés au sein d'un îlot de pathogénicité chromosomique de 35kb nommé par le locus d'effacement des entérocytes (LEE), très conservé chez les entérobactéries pathogènes notamment les EHEC O157:H7 et O26:H11 (McDaniel *et al.*, 1995, Stevens & Frankel, 2014). En revanche, le faible pourcentage en GC (38%) du LEE semble indiquer un transfert latéral de gènes d'une espèce de parenté éloignée (Jores *et al.*, 2004). De plus, l'analyse des régions flanquantes du LEE montre qu'il peut y avoir des différences de part et d'autre du LEE selon le sérotype de la bactérie EHEC. La souche EDL933 (EHEC O157:H7) possède, en amont du LEE, un prophage de type P4 alors que, chez une souche O26:NM, il s'agit d'un îlot de pathogénicité, OI-122. Cet îlot de pathogénicité (OI-122) est aussi présent dans la souche de sérotype O103:H2 mais avec des séquences et des gènes supplémentaires augmentant la taille totale du LEE à 111kb (Jores *et al.*, 2004). Enfin, le LEE est généralement intégré dans des loci correspondant à des ARN de transfert (ARNt) tels que *selC*, *pheU* et *pheV* (Stevens & Frankel, 2014).

Le LEE est décomposé en cinq opérons polycistroniques nommés LEE1 à LEE5 (Figure 7) (Jores *et al.*, 2004, Stevens & Frankel, 2014). Les régions LEE1 à LEE3 contiennent les gènes *esc* et *esp* codant la majorité de l'appareil de sécrétion de type III impliqué dans l'export de molécules effectrices.

La région LEE4 contient les gènes *espA*, *espB* et *espD* codant les protéines EspA, EspB et EspD impliquées dans la formation du composé de translocation (ou « seringue ») des effecteurs.

La protéine EspA est la plus importante du système de sécrétion de type III, elle forme un filament ressemblant à un flagelle permettant d'effectuer le transfert des effecteurs entre la bactérie et la cellule hôte (Figure 8) (Stevens & Frankel, 2014, Pallen *et al.*, 2005).

Enfin, la région LEE5 contient le gène *eae*, codant l'intimine impliquée dans la fixation aux protéines membranaires externes, et le gène *tir* codant la protéine Tir pour « translocated intimin receptor » servant de récepteur de l'intimine. La protéine Tir est requise dans l'activation du rassemblement des filaments d'actine et dans la réquisition des protéines du cytosquelette au site d'adhésion de la bactérie pour la formation du piédestal (Stevens & Frankel, 2014). Il existe au moins 19 types de gène *eae* dont quatre distincts nommés Intimine α , β , γ et ε (Oswald *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré qu'il y avait une association entre le sérotype des souches d'*E. coli* et un type d'intimine. En effet, l'intimine α est généralement retrouvé dans les EPEC tandis que les intimines γ et ε sont plutôt associées aux EHEC : l'intimine γ est produite par les EHEC des sérotypes O157 (γ_1), O111 (γ_2/σ) et O145 (γ_1) et l'intimine ε par les EHEC O103 et O121. L'intimine β est, quant à elle, retrouvée dans les EHEC et les EPEC, parmi lesquels le sérotype le plus important produisant cette intimine, O26 (Caprioli *et al.*, 2005, Oswald *et al.*, 2000).

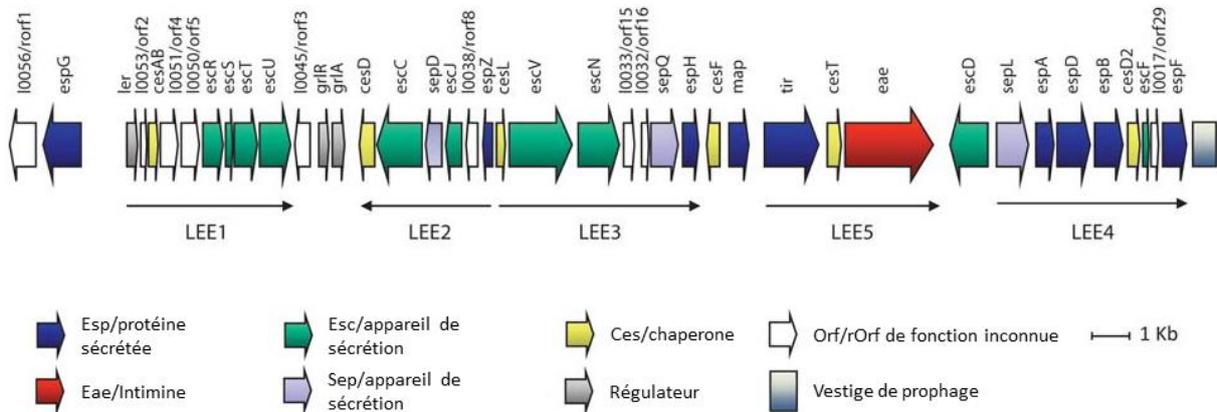


Figure 7. Organisation génétique du LEE chez *E. coli* O157:H7

Les cadres ouverts de lecture (ORF ou « *open reading frame* ») sont caractérisés par des flèches larges et les 5 opérons polycistroniques (LEE1 à 5) sont représentés par des flèches fines. Les flèches blanches correspondent à des ORF dont la fonction est inconnue et sont désignées par l'appellation « Orf » ou « rOrf » selon la direction de transcription relative au gène *eae* (adaptée de Stevens & Frankel, 2014).

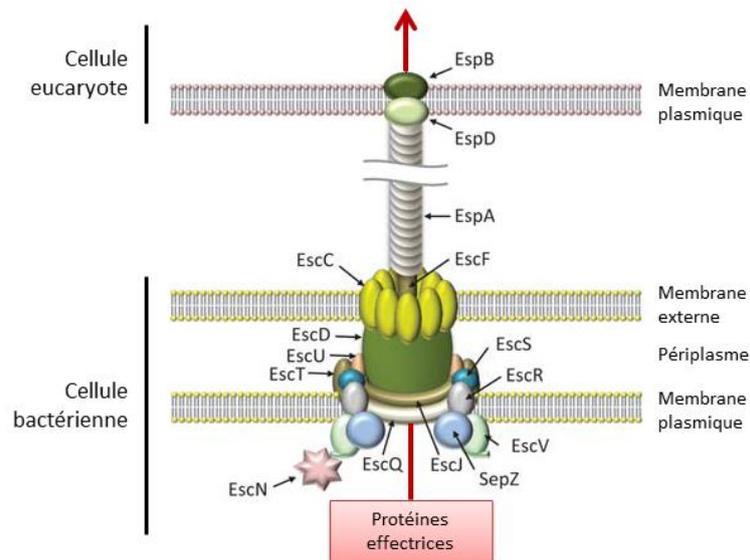


Figure 8. Représentation schématique du système de sécrétion de type III

Visualisation de l'organisation spatiale des protéines codées par le LEE (adaptée de Stevens & Frankel, 2014)

III.2.2. O-islands

L'analyse du génome complet de la souche EDL933 (EHEC O157:H7) a montré que 20% du chromosome était constitué d'ADN étranger, absent de la souche de laboratoire *E. coli* K-12 suggérant donc l'acquisition de ces régions par transfert horizontal (Caprioli *et al.*, 2005). De plus, ces régions ne sont pas restreintes au sérotype O157 puisqu'elles peuvent être retrouvées aussi dans d'autres sérotypes d'EHEC. L'îlot génomique OI-122 est un exemple parfait, car il est présent dans la majorité des EHEC et des EPEC mais absent dans les autres groupes d'*E. coli* (Caprioli *et al.*, 2005). Cet îlot de pathogénicité, d'une taille de 23 kb, est constitué de trois modules séparés par des éléments génétiques mobiles (Figure 9) (Konczy *et al.*, 2008, Ju *et al.*, 2013). Le module 1 contient le gène *Z4321* qui possède 46% de similarité avec le gène *pagC* (« *phoPI*-activated gene C ») de chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium. Le module 2 contient le gène *Z4326* (*sen*) codant une protéine possédant 39% de similarité avec une entérotoxine de *Shigella* et deux gènes, *Z4328* et *Z4329*, codant des protéines qui présentent 89 et 86% de similarité avec des effecteurs non codés par le LEE (Nle), NleB et NleE respectivement. Enfin, le module 3 contient les gènes *Z4332* et *Z4333* codant des facteurs d'adhérence (Efa) des EHEC, Efa1 et Efa2, impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes du sang périphérique (Konczy *et al.*, 2008, Ju *et al.*, 2013).

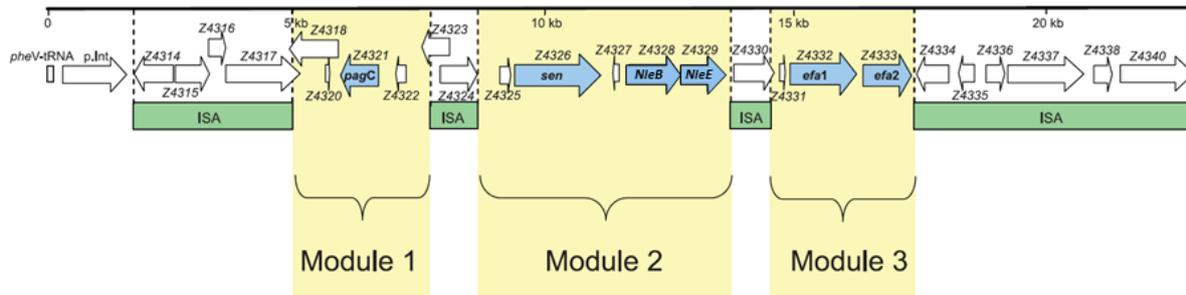


Figure 9. Représentation schématique de l'îlot de pathogénicité OI-122

ISA (en vert), séquence d'insertion associée à des éléments séparant les trois modules (adaptée de Konczy *et al.* 2008).

Deux îlots de pathogénicité dupliqués, OI-43 et OI-48 (contracté en OI-43/48) ont été détectés dans la souche EDL933 (Ju *et al.*, 2013). Les gènes de OI-43/48 sont divisés en trois régions. La première région contient un cluster de sept gènes *ureDABCEFG* codant une uréase et des protéines accessoires impliquées dans l'hydrolyse de l'urée en ammonium et en CO₂. La seconde région est composée de gènes de résistance au tellurite, *terZABCDEF*. Enfin, la dernière région contient des gènes d'adhésion (présumés) tels que *iha* (« iron regulated gene A ») et *aidA-1* (codant un autotransporteur de l'adhésine impliqué dans l'adhésion diffuse) (Ju *et al.*, 2013).

Pour finir, un autre îlot de pathogénicité a été mis en évidence dans la souche EDL933, il s'agit du OI-57, présent plus généralement dans les STEC des sérotypes A et B mais absent dans les sérotypes C, D et E. Il est impliqué dans la colonisation de la muqueuse intestinale par A/E (Ju *et al.*, 2013, Imamovic *et al.*, 2010b). Cet OI-57 contient des gènes *Nle* tels que *nleG2-3*, *nleG6-2* et *nleG5-2* (Ju *et al.*, 2013) mais aussi des gènes comme Z2098 et Z2099 qui sont considérés comme spécifiques aux EHEC et leurs souches dérivées *stx*-négatives (Delannoy *et al.*, 2013b). Pour finir, OI-57 possède deux autres gènes responsables du déclenchement de cas graves de maladie chez l'Homme, il s'agit du gène *adfO* codant un facteur qui renforce l'adhésion des STEC aux cellules et le gène *ckf* un facteur putatif de lyse de la cellule bactérienne (Imamovic *et al.*, 2010b).