



ROYAUME DU MAROC  
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT  
FACULTE DE MEDECINE  
ET DE PHARMACIE  
RABAT



Année: 2019

Thèse N°: 09

## PRODUCTION DE SHIGA-TOXINE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le : / / 2019

PAR

**Madame Asmaa MATRANE**  
*Née le 28 Décembre 1993 à Settat*

*Pour l'Obtention du Diplôme de*  
**Docteur en Pharmacie**

**Mots Clés :** Dysenterie; Escherichia coli; Hémolyse; Shiga-toxine

Membres du Jury :

**Monsieur Ahmed GAOUZI**

Professeur de Pédiatrie

**Monsieur Yassine SEKHSOKH**

Professeur de Microbiologie

**Madame Saida TELLAL**

Professeur de Biochimie

**Monsieur Khalil ABOUELALAA**

Professeur d'Anesthésie Réanimation

**Président**

**Rapporteur**

**Juge**

**Juge**

مَعْرِفَةُ الْعَالَمِ الْعَظِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما  
علمتنا إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31



UNIVERSITE MOHAMMED V

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

RABAT



**DOYENS HONORAIRES :**

- 1962 – 1969 : Professeur\_Abdelmalek FARAJ  
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI  
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ – HASSOUNI

**ADMINISTRATION :**

*Doyen*

**Professeur Mohamed ADNAOUI**

*Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes*

Professeur Brahim LEKEHAL

*Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération*

Professeur Taoufiq DAKKA

*Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie*

Professeur Jamal TAOUFIK

*Secrétaire Général*

Mr. Mohamed KARRA

# **1-ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS**

## **PROFESSEURS :**

### **Décembre 1984**

Pr. MAAOUNI Abdelaziz  
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi  
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne – Clinique Royale  
Anesthésie -Réanimation  
pathologie Chirurgicale

### **Novembre et Décembre 1985**

Pr. BENSAID Younes

Pathologie Chirurgicale

### **Janvier, Février et Décembre 1987**

Pr. LACHKAR Hassan  
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Médecine Interne  
Neurologie

### **Décembre 1989**

Pr. ADNAOUI Mohamed  
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne –Doyen de la FMPR  
Neurologie

### **Janvier et Novembre 1990**

Pr. HACHIM Mohammed\*  
Pr. KHARBACH Aïcha  
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine-Interne  
Gynécologie -Obstétrique  
Anesthésie Réanimation

### **Février Avril Juillet et Décembre 1991**

Pr. AZZOUZI Abderrahim  
Pr. BAYAHIA Rabéa  
Pr. BELKOUCHI Abdelkader  
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif  
Pr. BENSOU DA Yahia  
Pr. BERRAHO Amina  
Pr. BEZZAD Rachid  
Pr. CHERRAH Yahia  
Pr. CHOKAIRI Omar  
Pr. KHATTAB Mohamed  
Pr. SOULAYMANI Rachida  
Pr. TAOUFIK Jamal

Anesthésie Réanimation –Doyen de la FMPO  
Néphrologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pharmacie galénique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique Méd Chef Maternité des Orangers  
Pharmacologie  
Histologie Embryologie  
Pédiatrie  
Pharmacologie – Dir. du Centre National PV Rabat  
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir du  
CEDOC+Directeur du Médicament

### **Décembre 1992**

Pr. AHALLAT Mohamed  
Pr. BENSOU DA Adil  
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza  
Pr. CHRAIBI Chafiq  
Pr. EL OUAHABI Abdessamad

Chirurgie Générale Doyen de FMPT  
Anesthésie Réanimation  
Gastro-Entérologie  
Gynécologie Obstétrique  
Neurochirurgie

Pr. FELLAT Rokaya  
Pr. GHAFIR Driss\*  
Pr. JIDDANE Mohamed  
Pr. TAGHY Ahmed  
Pr. ZOUHDI Mimoun

### **Mars 1994**

Pr. BENJAAFAR Nouredine  
Pr. BEN RAIS Nozha  
Pr. CAOUI Malika  
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah  
Pr. EL BARDOUNI Ahmed  
Pr. EL HASSANI My Rachid  
Pr. ERROUGANI Abdelkader  
Pr. ESSAKALI Malika  
Pr. ETTAYEBI Fouad  
Pr. HASSAM Badredine  
Pr. IFRINE Lahssan  
Pr. MAHFOUD Mustapha  
Pr. RHRAB Brahim  
Pr. SENOUCI Karima

### **Mars 1994**

Pr. ABBAR Mohamed\*  
Pr. ABDELHAK M'barek  
Pr. BENTAHILA Abdelali  
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali  
Pr. BERRADA Mohamed Saleh  
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae  
Pr. LAKHDAR Amina  
Pr. MOUANE Nezha

### **Mars 1995**

Pr. ABOUQUAL Redouane  
Pr. AMRAOUI Mohamed  
Pr. BAIDADA Abdelaziz  
Pr. BARGACH Samir  
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine\*  
Pr. EL MESNAOUI Abbes  
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila  
Pr. HDA Abdelhamid\*  
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed  
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia  
Pr. SEFIANI Abdelaziz  
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

### **Décembre 1996**

Pr. AMIL Touriya\*  
Pr. BELKACEM Rachid  
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim  
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan

Cardiologie  
Médecine Interne  
Anatomie  
Chirurgie Générale  
Microbiologie

Radiothérapie  
Biophysique  
Biophysique  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques *Doyen de la FMPA*  
Gynécologie Obstétrique  
Traumato-Orthopédie  
Radiologie  
Chirurgie Générale- *Directeur CHIS -Rabat*  
Immunologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Traumatologie – Orthopédie  
Gynécologie –Obstétrique  
Dermatologie

Urologie *Directeur Hôpital My Ismail Meknès*  
Chirurgie – Pédiatrique  
Pédiatrie  
Gynécologie – Obstétrique  
Traumatologie – Orthopédie  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie

Réanimation Médicale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Cardiologie - *Directeur du Service de Santé des FAR*  
Urologie  
Ophtalmologie  
Génétique  
Réanimation Médicale

Radiologie  
Chirurgie Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale

Pr. GAOUZI Ahmed  
Pr. MAHFOUDI M'barek\*  
Pr. OUZEDDOUN Naima  
Pr. ZBIR EL Mehdi\*

Pédiatrie  
Radiologie  
Néphrologie  
Cardiologie Directeur Hôp. Mil.d'Instruction Med V Rabat

### **Novembre 1997**

Pr. ALAMI Mohamed Hassan  
Pr. BEN SLIMANE Lounis  
Pr. BIROUK Nazha  
Pr. ERREIMI Naima  
Pr. FELLAT Nadia  
Pr. KADDOURI Nouredine  
Pr. KOUTANI Abdellatif  
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid  
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ  
Pr. TAOUFIQ Jallal  
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique  
Urologie  
Neurologie  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Psychiatrie Directeur Hôp. Arrazi Salé  
Gynécologie Obstétrique

### **Novembre 1998**

Pr. BENOMAR ALI  
Pr. BOUGTAB Abdesslam  
Pr. ER RIHANI Hassan  
Pr. BENKIRANE Majid\*

Neurologie – Doyen de la FMP Abulcassis  
Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Hématologie

### **Janvier 2000**

Pr. ABID Ahmed\*  
Pr. AIT OUMAR Hassan  
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd  
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine  
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer  
Pr. ECHARRAB El Mahjoub  
Pr. EL FTOUH Mustapha  
Pr. EL MOSTARCHID Brahim\*  
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim\*  
Pr. TACHINANTE Rajae  
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Pneumo-ptisiologie Directeur Hôp. My Youssef  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pneumo-ptisiologie  
Neurochirurgie  
Anesthésie-Réanimation  
Anesthésie-Réanimation  
Médecine Interne

### **Novembre 2000**

Pr. AIDI Saadia  
Pr. AJANA Fatima Zohra  
Pr. BENAMR Said  
Pr. CHERTI Mohammed  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
Pr. EL HASSANI Amine  
Pr. EL KHADER Khalid  
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah\*  
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae  
Pr. ROUIMI Abdelhadi\*

Neurologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Générale  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Pédiatrie Directeur Hôp. Chekikh Zaied  
Urologie  
Rhumatologie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Pédiatrie  
Neurologie

### Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH\*

ORL

### Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham\*  
Pr. BENABDELJLIL Maria  
Pr. BENAMAR Loubna  
Pr. BENAMOR Jouda  
Pr. BENELBARHDADI Imane  
Pr. BENNANI Rajae  
Pr. BENOUACHANE Thami  
Pr. BEZZA Ahmed\*  
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi  
Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
Pr. CHAT Latifa  
Pr. DAALI Mustapha\*  
Pr. DRISSE Sidi Mourad\*  
Pr. EL HIJRI Ahmed  
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
Pr. EL MADHI Tarik  
Pr. EL OUNANI Mohamed  
Pr. ETTAIR Said  
Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
Pr. HRORA Abdelmalek  
Pr. KABBAJ Saad  
Pr. KABIRI EL Hassane\*  
Pr. LAMRANI Moulay Omar  
Pr. LEKEHAL Brahim  
Pr. MAHASSIN Fattouma\*  
Pr. MEDARHRI Jalil  
Pr. MIKDAME Mohammed\*  
Pr. MOHSINE Raouf  
Pr. NOUINI Yassine  
Pr. SABBAH Farid  
Pr. SEFIANI Yasser  
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation  
Neurologie  
Néphrologie  
Pneumo-phtisiologie  
Gastro-Entérologie  
Cardiologie  
Pédiatrie  
Rhumatologie  
Anatomie  
Radiologie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Radiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie-Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie **Directeur. Hôp.d'Enfants Rabat**  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Thoracique  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Médecine Interne  
Chirurgie Générale  
Hématologie Clinique  
Chirurgie Générale  
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Pédiatrie

### Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
Pr. AMEUR Ahmed \*  
Pr. AMRI Rachida  
Pr. AOURARH Aziz\*  
Pr. BAMOU Youssef \*  
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene\*  
Pr. BENZEKRI Laila  
Pr. BENZZOUBEIR Nadia  
Pr. BERNOUSSI Zakiya  
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya\*  
Pr. CHOHO Abdelkrim \*  
Pr. CHKIRATE Bouchra

Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-Entérologie  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Dermatologie  
Gastro-Entérologie  
Anatomie Pathologique  
Psychiatrie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie

Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair  
Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
Pr. FILALI ADIB Abdelhai  
Pr. HAJJI Zakia  
Pr. IKEN Ali  
Pr. JAAFAR Abdeloihab\*  
Pr. KRIOUILE Yamina  
Pr. MABROUK Hfid\*  
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
Pr. OUJILAL Abdelilah  
Pr. RACHID Khalid \*  
Pr. RAISS Mohamed  
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha\*  
Pr. RHOU Hakima  
Pr. SIAH Samir \*  
Pr. THIMOU Amal  
Pr. ZENTAR Aziz\*

### **Janvier 2004**

Pr. ABDELLAH El Hassan  
Pr. AMRANI Mariam  
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas  
Pr. BENKIRANE Ahmed\*  
Pr. BOUGHALEM Mohamed\*  
Pr. BOULAADAS Malik  
Pr. BOURAZZA Ahmed\*  
Pr. CHAGAR Belkacem\*  
Pr. CHERRADI Nadia  
Pr. EL FENNI Jamal\*  
Pr. EL HANCHI ZAKI  
Pr. EL KHORASSANI Mohamed  
Pr. EL YOUNASSI Badreddine\*  
Pr. HACHI Hafid  
Pr. JABOURIK Fatima  
Pr. KHARMAZ Mohamed  
Pr. MOUGHIL Said  
Pr. OUBAAZ Abdelbarre\*  
Pr. TARIB Abdelilah\*  
Pr. TIJAMI Fouad  
Pr. ZARZUR Jamila

### **Janvier 2005**

Pr. ABBASSI Abdellah  
Pr. AL KANDRY Sif Eddine\*  
Pr. ALLALI Fadoua  
Pr. AMAZOUZI Abdellah  
Pr. AZIZ Nouredine\*  
Pr. BAHIRI Rachid  
Pr. BARKAT Amina  
Pr. BENYASS Aatif  
Pr. DOUDOUH Abderrahim\*  
Pr. EL HAMZAOUI Sakina\*

Chirurgie Pédiatrique  
Dermatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Ophtalmologie  
Urologie  
Traumatologie Orthopédie  
Pédiatrie  
Traumatologie Orthopédie  
Gynécologie Obstétrique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Générale  
Pneumophtisiologie  
Néphrologie  
Anesthésie Réanimation  
Pédiatrie  
Chirurgie Générale

Ophtalmologie  
Anatomie Pathologique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Neurologie  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie Pathologique  
Radiologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Ophtalmologie  
Pharmacie Clinique  
Chirurgie Générale  
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique  
Chirurgie Générale  
Rhumatologie  
Ophtalmologie  
Radiologie  
Rhumatologie **Directeur. Hôp. Al Ayachi Salé**  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Biophysique  
Microbiologie

Pr. HAJJI Leila  
Pr. HESSISSEN Leila  
Pr. JIDAL Mohamed\*  
Pr. LAAROUSSI Mohamed  
Pr. LYAGOUBI Mohammed  
Pr. RAGALA Abdelhak  
Pr. SBIHI Souad  
Pr. ZERAIDI Najja

Cardiologie (mise en disponibilité)  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Parasitologie  
Gynécologie Obstétrique  
Histo-Embryologie Cytogénétique  
Gynécologie Obstétrique

### **Avril 2006**

Pr. ACHEMLAL Lahsen\*  
Pr. AKJOUJ Said\*  
Pr. BELMEKKI Abdelkader\*  
Pr. BENCHEIKH Razika  
Pr. BIYI Abdelhamid\*  
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
Pr. BOULAHYA Abdellatif\*  
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
Pr. DOGHMI Nawal  
Pr. FELLAT Ibtissam  
Pr. FAROUDY Mamoun  
Pr. HARMOUCHE Hicham  
Pr. HANAFI Sidi Mohamed\*  
Pr. IDRIS LAHLOU Amine\*  
Pr. JROUNDI Laila  
Pr. KARMOUNI Tariq  
Pr. KILI Amina  
Pr. KISRA Hassan  
Pr. KISRA Mounir  
Pr. LAATIRIS Abdelkader\*  
Pr. LMIMOUNI Badreddine\*  
Pr. MANSOURI Hamid\*  
Pr. OUANASS Abderrazzak  
Pr. SAFI Soumaya\*  
Pr. SEKKAT Fatima Zahra  
Pr. SOUALHI Mouna  
Pr. TELLAL Saida\*  
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Rhumatologie  
Radiologie  
Hématologie  
O.R.L  
Biophysique  
Chirurgie - Pédiatrique  
Chirurgie Cardio – Vasculaire  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Microbiologie  
Radiologie  
Urologie  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Pharmacie Galénique  
Parasitologie  
Radiothérapie  
Psychiatrie  
Endocrinologie  
Psychiatrie  
Pneumo – Phtisiologie  
Biochimie  
Pneumo – Phtisiologie

### **Decembre 2006**

Pr SAIR Khalid

Chirurgie générale Dir. Hôp.Av.Marrakech

### **Octobre 2007**

Pr. ABIDI Khalid  
Pr. ACHACHI Leila  
Pr. ACHOUR Abdessamad\*  
Pr. AIT HOUSSA Mahdi\*  
Pr. AMHAJJI Larbi\*  
Pr. AOUI Sarra  
Pr. BAITE Abdelouahed\*

Réanimation médicale  
Pneumo phtisiologie  
Chirurgie générale  
Chirurgie cardio vasculaire  
Traumatologie orthopédie  
Parasitologie  
Anesthésie réanimation Directeur ERSSM

Pr. BALOUCH Lhousaine\*  
Pr. BENZIANE Hamid\*  
Pr. BOUTIMZINE Nourdine  
Pr. CHARKAOUI Naoual\*  
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader\*  
Pr. EL BEKKALI Youssef \*  
Pr. ELABSI Mohamed  
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid  
Pr. EL OMARI Fatima  
Pr. GHARIB Nouredine  
Pr. HADADI Khalid\*  
Pr. ICHOU Mohamed\*  
Pr. ISMAILI Nadia  
Pr. KEBDANI Tayeb  
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar\*  
Pr. LOUZI Lhoussein\*  
Pr. MADANI Naoufel  
Pr. MAHI Mohamed\*  
Pr. MARC Karima  
Pr. MASRAR Azlarab  
Pr. MRANI Saad\*  
Pr. OUZZIF Ez zohra\*  
Pr. RABHI Monsef\*  
Pr. RADOUANE Bouchaib\*  
Pr. SEFFAR Myriame  
Pr. SEKHSOKH Yessine\*  
Pr. SIFAT Hassan\*  
Pr. TABERKANET Mustafa\*  
Pr. TACHFOUTI Samira  
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq\*  
Pr. TANANE Mansour\*  
Pr. TLIGUI Houssain  
Pr. TOUATI Zakia

### **Décembre 2008**

Pr TAHIRI My El Hassan\*

### **Mars 2009**

Pr. ABOUZAHIR Ali\*  
Pr. AGDR Aomar\*  
Pr. AIT ALI Abdelmounaim\*  
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia  
Pr. AKHADDAR Ali\*  
Pr. ALLALI Nazik  
Pr. AMINE Bouchra  
Pr. ARKHA Yassir

Biochimie-chimie  
Pharmacie clinique  
Ophtalmologie  
Pharmacie galénique  
Chirurgie générale  
Chirurgie cardio-vasculaire  
Chirurgie générale  
Anesthésie réanimation  
Psychiatrie  
Chirurgie plastique et réparatrice  
Radiothérapie  
Oncologie médicale  
Dermatologie  
Radiothérapie  
Anesthésie réanimation  
Microbiologie  
Réanimation médicale  
Radiologie  
Pneumo phtisiologie  
Hématologie biologique  
Virologie  
Biochimie-chimie  
Médecine interne  
Radiologie  
Microbiologie  
Microbiologie  
Radiothérapie  
Chirurgie vasculaire périphérique  
Ophtalmologie  
Chirurgie générale  
Traumatologie orthopédie  
Parasitologie  
Cardiologie

Chirurgie Générale

Médecine interne  
Pédiatre  
Chirurgie Générale  
Neurologie  
Neuro-chirurgie  
Radiologie  
Rhumatologie  
Neuro-chirurgie ***Directeur Hôp.des Spécialités***

Pr. BELYAMANI Lahcen\*  
Pr. BJIJOU Younes  
Pr. BOUHSAIN Sanae\*  
Pr. BOUI Mohammed\*  
Pr. BOUNAIM Ahmed\*  
Pr. BOUSSOUGA Mostapha\*  
Pr. CHTATA Hassan Toufik\*  
Pr. DOGHMI Kamal\*  
Pr. EL MALKI Hadj Omar  
Pr. EL OUENNASS Mostapha\*  
Pr. ENNIBI Khalid\*  
Pr. FATHI Khalid  
Pr. HASSIKOU Hasna \*  
Pr. KABBAJ Nawal  
Pr. KABIRI Meryem  
Pr. KARBOUBI Lamya  
Pr. LAMSAOURI Jamal\*  
Pr. MARMADE Lahcen  
Pr. MESKINI Toufik  
Pr. MESSAOUDI Nezha \*  
Pr. MSSROURI Rahal  
Pr. NASSAR Ittimade  
Pr. OUKERRAJ Latifa  
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*

Anesthésie Réanimation  
Anatomie  
Biochimie-chimie  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Traumatologie orthopédique  
Chirurgie vasculaire périphérique  
Hématologie clinique  
Chirurgie Générale  
Microbiologie  
Médecine interne  
Gynécologie obstétrique  
Rhumatologie  
Gastro-entérologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Chimie Thérapeutique  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Pédiatrie  
Hématologie biologique  
Chirurgie Générale  
Radiologie  
Cardiologie  
Pneumo-phtisiologie

### **Octobre 2010**

Pr. ALILOU Mustapha  
Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
Pr. BELAGUID Abdelaziz  
Pr. CHADLI Mariama\*  
Pr. CHEMSI Mohamed\*  
Pr. DAMI Abdellah\*  
Pr. DARBI Abdellatif\*  
Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
Pr. EL HAFIDI Naima  
Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*  
Pr. EL MAZOUZ Samir  
Pr. EL SAYEGH Hachem  
Pr. ERRABIH Ikram  
Pr. LAMALMI Najat  
Pr. MOSADIK Ahlam  
Pr. MOUJAHID Mountassir\*  
Pr. NAZIH Mouna\*  
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation  
Médecine interne  
Physiologie  
Microbiologie  
Médecine aéronautique  
Biochimie chimie  
Radiologie  
Chirurgie pédiatrique  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie plastique et réparatrice  
Urologie  
Gastro entérologie  
Anatomie pathologique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie générale  
Hématologie biologique  
Anatomie pathologique

### **Decembre 2010**

Pr. ZNATI Kaoutar

Anatomie Pathologique

## Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed  
Pr. ABOUELALAA Khalil\*  
Pr. BENCHEBBA Driss\*  
Pr. DRISSI Mohamed\*  
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna  
Pr. EL KHATTABI Abdessadek\*  
Pr. EL OUAZZANI Hanane\*  
Pr. ER-RAJI Mounir  
Pr. JAHID Ahmed  
Pr. MEHSSANI Jamal\*  
Pr. RAISSOUNI Maha\*

Chirurgie Pédiatrique  
Anesthésie Réanimation  
Traumatologie Orthopédique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Médecine Interne  
Pneumophtisiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie pathologique  
Psychiatrie  
Cardiologie

*\*Enseignants Militaires*

## Février 2013

Pr. AHID Samir  
Pr. AIT EL CADI Mina  
Pr. AMRANI HANCHI Laila  
Pr. AMOUR Mourad  
Pr. AWAB Almahdi  
Pr. BELAYACHI Jihane  
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain  
Pr. BENCHEKROUN Laila  
Pr. BENKIRANE Souad  
Pr. BENNANA Ahmed\*  
Pr. BENSGHIR Mustapha\*  
Pr. BENYAHIA Mohammed\*  
Pr. BOUATIA Mustapha  
Pr. BOUABID Ahmed Salim\*  
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba  
Pr. CHAIB Ali\*  
Pr. DENDANE Tarek  
Pr. DINI Nouzha\*  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa  
Pr. ELFATEMI Nizare  
Pr. EL GUERROUJ Hasnae  
Pr. EL HARTI Jaouad  
Pr. EL JOUDI Rachid\*  
Pr. EL KABABRI Maria  
Pr. EL KHANNOUSSI Basma  
Pr. EL KHLOUFI Samir  
Pr. EL KORAICHI Alae  
Pr. EN-NOUALI Hassane\*  
Pr. ERRGUIG Laila  
Pr. FIKRI Meryim

Pharmacologie – Chimie  
Toxicologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Réanimation Médicale  
Anesthésie Réanimation  
Biochimie-Chimie  
Hématologie biologique  
Informatique Pharmaceutique  
Anesthésie Réanimation  
Néphrologie  
Chimie Analytique et Bromatologie  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie  
Cardiologie  
Réanimation Médicale  
Pédiatrie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Neuro-Chirurgie  
Médecine Nucléaire  
Chimie Thérapeutique  
Toxicologie  
Pédiatrie  
Anatomie Pathologie  
Anatomie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Physiologie  
Radiologie

Pr. GHFIR Imade  
Pr. IMANE Zineb  
Pr. IRAQI Hind  
Pr. KABBAJ Hakima  
Pr. KADIRI Mohamed\*  
Pr. LATIB Rachida  
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra  
Pr. MEDDAH Bouchra  
Pr. MELHAOUI Adyl  
Pr. MRABTI Hind  
Pr. NEJJARI Rachid  
Pr. OUBEJJA Houda  
Pr. OUKABLI Mohamed\*  
Pr. RAHALI Younes  
Pr. RATBI Ilham  
Pr. RAHMANI Mounia  
Pr. REDA Karim\*  
Pr. REGRAGUI Wafa  
Pr. RKAIN Hanan  
Pr. ROSTOM Samira  
Pr. ROUAS Lamiaa  
Pr. ROUIBAA Fedoua\*  
Pr. SALIHOUN Mouna  
Pr. SAYAH Rochde  
Pr. SEDDIK Hassan\*  
Pr. ZERHOUNI Hicham  
Pr. ZINE Ali\*

#### **Avril 2013**

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim\*

#### **Mai 2013**

Pr. BOUSLIMAN Yassir

#### **Mars 2014**

Pr. ACHIR Abdellah  
Pr. BENCHAKROUN Mohammed \*  
Pr. BOUCHIKH Mohammed  
Pr. EL KABBAJ Driss \*  
Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira \*  
Pr. HARDIZI Houyam  
Pr. HASSANI Amale \*  
Pr. HERRAK Laila  
Pr. JANANE Abdellah \*  
Pr. JEAIDI Anass \*

Médecine Nucléaire  
Pédiatrie  
Endocrinologie et maladies métaboliques  
Microbiologie  
Psychiatrie  
Radiologie  
Médecine Interne  
Pharmacologie  
Neuro-chirurgie  
Oncologie Médicale  
Pharmacognosie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie Pathologique  
Pharmacie Galénique  
Génétique  
Neurologie  
Ophtalmologie  
Neurologie  
Physiologie  
Rhumatologie  
Anatomie Pathologique  
Gastro-Entérologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Toxicologie

Chirurgie Thoracique  
Traumatologie- Orthopédie  
Chirurgie Thoracique  
Néphrologie  
Biochimie-Chimie  
Histologie- Embryologie-Cytogénétique  
Pédiatrie  
Pneumologie  
Urologie  
Hématologie Biologique

Pr. KOUACH Jaouad\*  
Pr. LEMNOUER Abdelhay\*  
Pr. MAKRAM Sanaa \*  
Pr. OULAHYANE Rachid\*  
Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar  
Pr. SABRY Mohamed\*  
Pr. SEKKACH Youssef\*  
Pr. TAZI MOUKHA Zakia

Géynecologie-Obstétrique  
Microbiologie  
Pharmacologie  
Chirurgie Pédiatrique  
CCV  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Généologie-Obstétrique

#### **AVRIL 2014**

Pr.ZALAGH Mohammed

ORL

#### **PROFESSEURS AGREGES :**

#### **DECEMBRE 2014**

Pr. ABILKASSEM Rachid\*  
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila  
Pr. BEKKALI Hicham \*  
Pr. BENAZZOU Salma  
Pr. BOUABDELLAH Mounya  
Pr. BOUCHRIK Mourad\*  
Pr. DERRAJI Soufiane\*  
Pr. DOBLALI Taoufik\*  
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali  
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim\*  
Pr. EL MARJANY Mohammed\*  
Pr. FEJJAL Nawfal  
Pr. JAHIDI Mohamed\*  
Pr. LAKHAL Zouhair\*  
Pr. OUDGHIRI Nezha  
Pr. RAMI Mohamed  
Pr. SABIR Maria  
Pr. SBAI IDRISSE Karim\*

Pédiatrie  
Médecine Légale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Maxillo-Faciale  
Biochimie-Chimie  
Parasitologie  
Pharmacie Clinique  
Microbiologie  
Anatomie  
Anesthésie-Réanimation  
Radiothérapie  
Chirurgie Réparatrice et Plastique  
O.R.L  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Psychiatrie  
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

#### **AOUT 2015**

Pr. MEZIANE Meryem  
Pr. TAHRI Latifa

Dermatologie  
Rhumatologie

#### **JANVIER 2016**

Pr. BENKABBOU Amine  
Pr. EL ASRI Fouad\*  
Pr. ERRAMI Noureddine\*  
Pr. NITASSI Sophia

Chirurgie Générale  
Ophtalmologie  
O.R.L  
O.R.L

## **JUIN 2017**

Pr. ABI Rachid*	Microbiologie
Pr. ASFALOU Ilyasse*	Cardiologie
Pr. BOUAYTI El Arbi*	Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pr. BOUTAYEB Saber	Oncologie Médicale
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim	Oncologie Médicale
Pr. OURAINI Saloua*	O.R.L
Pr. RAZINE Rachid	Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pr. ZRARA Abdelhamid*	Immunologie

\* *Enseignants Militaires*

## **2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES**

### **PROFESSEURS / PRs. HABILITES**

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naïma	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI Katim	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

Mise à jour le 10/10/2018  
Khaled Abdellah  
Chef du Service des Ressources Humaines



# Dédicaces

***Je dédie cette thèse***

***A mon père MATRANE EL BACHIR,** qui m'a accompagné et soutenu durant tout ce long chemin, que je n'aurais pu parcourir sans ses précieux conseils, ses encouragements. Il m'a témoigné un amour incommensurable, il m'a inculqué la rigueur dans le travail, la persévérance, la patience, la générosité. Ce travail est le votre, c'est le fruit de vos prières. Les mots me manquent pour vous dire combien je vous adore.*

***A ma mère FEKKAKI ZINEB,** qui m'a donné une parfaite éducation ce qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. La droiture, l'endurance, la bravoure et la dignité que vous m'avez enseignées, ont été d'un grand appui pour l'aboutissement de ce travail. Je vous remercie et je vous dédie ce travail pour tous les sacrifices que vous aviez faits pour ma réussite.*

***A mon oncle MATRANE ABDERAHMAN,** la volonté divine a voulu que vous soyez absent, Je ne vous remercierai jamais assez pour votre précieux soutien, pour votre patience, pour avoir cru en moi, pour votre sourire réconfortant. Je vous en suis infiniment reconnaissante. Puisse Dieu vous accorder sa clémence et sa miséricorde.*

***A ma sœur Wafaa et mon frère BADR,** vous êtes une source de motivation pour moi. Vos conseils, encouragements et vos prières me vont droit au cœur. Vous avez toujours su me remonter le moral dans les moments les plus difficiles. Je vous dédie ce modeste travail pour vous témoigner ma profonde reconnaissance.*

*A mon grand père **FEKKAKI MOHAMED**, pour toutes ses prières.  
Que dieu vous donne une longue vie.*

*A mon grand père **MATRANE AHMED**, ma grand-mère **ZOHRA** et  
ma grand-mère chérie **FATIMA**, pour toutes les prières durant leur vivant.  
Que le bon dieu, vous accueille dans son céleste paradis.*

*A ma tante **FEKKAKI HASNAA** et mon oncle **FEKKAKI  
HASSAN**, en témoignage de mon attachement et de ma grande  
considération. J'espère que vous trouverez à travers ce travail l'expression  
de mes sentiments les plus chaleureux.*

*A mes cousins **MATRANE ABOUBAKR, HAMID, ABDELATIF,  
SOUAD, LATIFA** et leur aimable maman, en reconnaissance de votre  
soutien incontestable et de vos encouragements, Je vous dédie ce travail.*

*A ma tante **MATRANE AICHA**, son époux **JAAFAR ABDELWAHED** et à leurs fils **Wael** et **MALAK**, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé.*

*A mes tantes **FEKKAKI RACHIDA**, **AMINA**, **SAMIRA**, leurs époux oncle **BLLADI ABDEERAHIM**, **JIRAOUI MOHAMED** et **BELMAHI ABDELTIF**, pour leur soutien et encouragement qu'ils m'ont toujours apporté. Je vous en suis infiniment reconnaissante.*

*Aussi voudrais-je exprimer ma profonde gratitude à mon parrain, mon ami, Tonton **ABDEERAHIM**, qui m'a marqué par sa disponibilité, sa générosité sincère et son amour, je ne pourrai jamais vous remercier assez.*

*A mes cousins, les adorables ADAM et WAEL, KARIMA, HOUDA, KAWTAR, MARIA, IMANE, AMINE, ISMAIL, HAMOUDA FEKKAKI et HAMOUDA BELMAHI.*

*A mes oncles MATRANE JILALI, HOUSSIN, HAJ, JAMAL, ABDELGHANI, leurs épouses et leurs enfants, J'ai le grand plaisir de dédier à vous ce modeste travail.*

*A mes meilleurs amis Zaari fadwa, Lmouden kaouthar, Tallali meriem, Tijani safaa, Kamal ihsan, Benhammou oumaima Quoique je dise, je ne saurais exprimer l'amour et la tendresse que j'ai pour vous. Je vous remercie, pour votre support et vos encouragements, et je vous dédie ce travail, pour tous les moments de joie et de taquinerie qu'on a pu partager ensemble.*



# Remerciements

*A notre maître et président de thèse*

*Monsieur Ahmed GAOUZI*

*Professeur de Pédiatrie*

*Nous vous remercions pour le grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider cette thèse.*

*Votre compétence, votre dynamisme, ainsi que vos qualités humaines et professionnelles exemplaires ont toujours suscité notre admiration.*

*Qu'il soit permis, cher maître, de vous exprimer notre sincère reconnaissance, notre profond respect et notre plus grande estime.*

*A notre Maitre et Rapporteur de thèse*

*Monsieur Yassine SEKHSOKH*

*Professeur de Microbiologie*

*Vous nous avez inspiré le sujet de thèse, vous nous avez guidé tout au long de son élaboration, avec bienveillance et compréhension, flexibilité et disponibilité ont été les qualités les plus marquantes au cours de cette collaboration. Votre accueil si simple, pour l'un de vos élèves, vos qualités humaines rares, vos qualités professionnelles ont été un enseignant complémentaire pour notre vie professionnelle et privée.*

*Veillez accepter ici, cher maître, l'expression de notre gratitude et l'expression de notre profonde reconnaissance*

*A notre Maitre et Juge de thèse*

*Mme Saïda TELLAL*

*Professeur de Biochimie*

*C'est pour nous un immense plaisir de vous voir siéger parmi le jury de notre thèse. Nous avons toujours été impressionné par vos qualités humaines et professionnelles.*

*Veillez agréer, cher maître, nos dévouements et notre éternelle reconnaissance.*

***A notre Maitre et Juge de thèse***  
***Monsieur Khalil ABOUELALAA***  
***Professeur En anesthesie reanimation***

*Permettez nous de vous remercier pour avoir si gentiment accepté de faire partie de nos juges.*

*En dehors de vos connaissances claires et précises, dont nous avons bénéficié, vos remarquables qualités humaines et professionnelles méritent toute admiration et tout respect.*

*Veillez trouver ici le témoignage respectueux de notre reconnaissance et admiration.*



# Liste des abréviations

## Liste des abréviations

<b>A/E</b>	: Attachement/Effacement
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>Eae</b>	: <i>Escherichia.coli attaching and effacing</i>
<b>EHEC</b>	: <i>Escherichia.coli entérohémorragique</i>
<b>EPEC</b>	: <i>Escherichia.coli entéropathogène</i>
<b>Esp</b>	: <i>Escherichia.coli secreted protein</i>
<b>Gb3</b>	: Globotriosylcéramide
<b>Gb4</b>	: Globotétraosylcéramide
<b>HC</b>	: Colite hémorragique
<b>HeLa</b>	: Cellules tumorales du col utérin d'Henrietta Lacks (lignée cellulaire)
<b>LEE</b>	: Locus d'effacement des entérocytes « locus of enterocyte effacement »
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharide
<b>PCR</b>	: Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
<b>pH</b>	: Potentiel d'hydrogène
<b>PTT</b>	: Purpura thrombotique thrombocytopénique
<b>SHU</b>	: Syndrome Hémolytique et Urémique
<b>SNC</b>	: Systhème nerveuxcentrale
<b>STEC</b>	: <i>Escherichia.coli</i> producteur de Shiga toxines
<b>Stx</b>	: Gène codant la Shiga-toxine
<b>Stx</b>	: Shiga-toxine
<b>Stx1</b>	: Shigatoxine type 1

**Stx2** : Shigatoxine type 2  
**Sub** : Subtilase  
**TNF** : Facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor)  
**VT** : Vérotoxine  
**VTEC** : Verotoxin producing *Escherichia.coli*



# Liste des illustrations

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique d'un bactériophage stx dans configuration tête-queue.....	10
<b>Figure 2</b> : Structure de Shiga-toxine .....	18
<b>Figure 3</b> : Structure de récepteur Gb3 de la toxine Shiga .....	21
<b>Figure 4</b> : Structure de l'holotoxine Shiga-toxine .....	22
<b>Figure 5</b> : Structure cristalline de la toxine Shiga .....	24
<b>Figure 6</b> : Diagramme des phages codant Stx2.....	26
<b>Figure 7</b> : Trafic de toxine Shiga .....	44
<b>Figure 8</b> : Voie de dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique .....	47
<b>Figure 9</b> : Modèle de progression de la maladie de la dysenterie bacillaire / colite hémorragique à des complications extra-intestinales .....	52
<b>Figure 10</b> : Diagramme de Venn .....	58
<b>Figure 11</b> : Réservoirs et modes de transmission des <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxine.....	63
<b>Figure 12</b> : Pathogenèse de la toxine Shiga .....	72
<b>Figure 13</b> : Evolution clinique après ingestion de STEC .....	81
<b>Figure 14</b> : Morphologie des colonnies d' <i>E.coli</i> O157 :H7 sur Milieu SMAC, SMC-CT et STEC .....	86
<b>Figure 15</b> : Etapes du diagnostic des infections à <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxine .....	89

## Liste des tableaux

**Tableau I** : Toxines prototypes et les souches qui produisent ces toxines .....16

**Tableau II** : Sous-types et variantes de la famille des toxines de Shiga .....19



# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>I. Historique</b> .....	5
<b>II. Généralités</b> .....	8
1. Shiga-toxine .....	8
2. Production de Shiga-toxine .....	8
3. Bactériophage de Shiga-toxine .....	10
4. Bactéries productrices de toxine de Shiga .....	11
<b>III. Caractéristiques de Shiga toxine</b> .....	14
1. Types et nomenclature .....	15
1.1 Stx / Stx1 Sous-types .....	15
1.2 Stx2a Sous-types .....	16
2. Génétique et structure de Shiga-toxine .....	17
2.1. Structure moléculaire .....	17
2.2. Structure protéique .....	19
3 Shiga-toxine structure et récepteur interaction.....	23
4 Génétique .....	26
<b>IV. Différents variants</b> .....	29
1. Toxines Stx 1 .....	29
2. Toxines Stx2 .....	29
3. Stx1a par rapport à Stx2a .....	32
4. Activité catalytique et cytotoxicité de Stx1 et Stx2 .....	34
4.1. Différence de cytotoxicité .....	34

4.2. Différence dans l'activité catalytique .....	37
<b>V. Mécanismes d'action .....</b>	<b>40</b>
1. Liaison de stx aux membranes cellulaires.....	40
2. Endocytose .....	42
3. Transport rétrograde.....	42
4. Retro-translocation.....	45
5. Apoptose .....	48
5.1 Shiga-toxines et apoptose .....	50
<b>VI. Epidémiologie .....</b>	<b>56</b>
1. Agent pathogène .....	56
1.1 <i>Shigella dysenteriae</i> .....	56
1.2 <i>Escherichia coli</i> producteur de Shiga-toxine .....	57
1.3 <i>Enterobacter cloacae</i> .....	59
1.4 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	60
1.5 <i>Citrobacter freundii</i> .....	60
2. Réservoirs .....	61
3. Modes de transmission .....	61
3.1 Transmission d'origine alimentaire .....	61
3.2 Transmission d'origine hydrique .....	62
3.3 Transmission inter-humaine .....	63
3.4 Contact avec des animaux .....	64
4. Distribution géographique .....	64
<b>VII. Physiopathologie .....</b>	<b>70</b>

<b>VIII. Etude clinique</b> .....	76
1. Dysenterie bacillaire .....	76
2. Colite hémorragique .....	76
3. Syndrome hémolytique et urémique .....	77
<b>IX. Evolutions et complications</b> .....	80
<b>X. Diagnostic</b> .....	84
1. Prélèvements .....	84
2. Culture .....	84
2.1. Méthodes de culture pour O157 STEC .....	85
2.2. Méthodes de culture pour STEC non-O157 .....	85
3. Détection du gène .....	86
3.1 Effet cytopathogène .....	86
3.1 Méthodes moléculaires .....	87
4. Tests immunologiques .....	87
5. Sérologie .....	88
<b>XI. Traitement</b> .....	91
1 Antibiotiques .....	91
2 Stratégies thérapeutiques dirigées contre Stx .....	93
<b>XII. Prévention</b> .....	97
1. Intervention pré-récolte .....	97
2. Intervention post-récolte.....	98
<b>Conclusion</b> .....	100
<b>Résumés</b> .....	102
<b>Références</b> .....	106



Les toxines Shiga (Stx) constituent une famille de toxines protéiques bactériennes apparentées, de structure et de mécanisme d'action similaires, mais produites par différents types de bactéries. *Shigella dysenteriae* sécrète la toxine Shiga, alors que la toxine 1 semblable à Shiga (Stx1) et la toxine analogue à Shiga 2 (Stx2) sont produites par certaines souches d'*Escherichia coli* et certaines autres bactéries. Le prototype Stx1 (Stx1a) ne diffère de la toxine Shiga que par un résidu d'acide aminé dans le fragment A catalytique de la toxine, alors que Stx2 ne partage qu'une similarité de séquence de ~ 60% avec la toxine Shiga et définit un sous-groupe distinct sur le plan de l'animologie, composé d'au moins sept sous-types de Stx2. Stx2 est plus mortel que Stx1 chez les modèles animaux et serait la principale cause d'infections menaçant le pronostic vital chez l'homme. Certains d'*Escherichia coli* producteur de Shiga-toxine (STEC) ne produisent qu'un type de toxine, Stx1 ou Stx2, tandis que d'autres expriment une combinaison des deux types et de différents sous-types. Par souci de simplicité, nous utiliserons l'abréviation Stx pour désigner toute la famille des toxines Shiga lorsqu'il abordera des faits généraux sur la toxine et / ou lorsque le type exact ou la variante n'est pas connue.

Stx sont des facteurs de virulence majeurs du *Shigella dysenteriae* de sérotype 1 et certains sérotypes d'*Escherichia coli*. Les bactéries productrices de toxines Shiga constituent un problème de santé publique important dans les pays en développement et les pays développés. En particulier, la présence du STEC dans les denrées alimentaires peut provoquer des épidémies généralisées. L'infection d'êtres humains avec au moins 10 à 100 organismes de *Shigella dysenteriae* de sérotype 1 ou de STEC peut initialement provoquer une diarrhée sanglante qui peut évoluer, en particulier chez les enfants et les personnes âgées, vers une forme d'insuffisance rénale aiguë appelée syndrome hémolytique et urémique (SHU), et peut être suivi de complications neurologiques dans les cas graves. Le SHU est caractérisé par la triade clinique de la microangiopathie thrombotique, de l'anémie hémolytique et de la thrombocytopénie. Les complications du système nerveux peuvent inclure la léthargie, la désorientation, les convulsions et la paralysie. Les toxines semblent capables de traverser la barrière épithéliale intestinale intacte via des mécanismes transcytotiques ou paracellulaires, endommagent la microvascularisation du côlon, puis peuvent s'associer à des monocytes et des neutrophiles sanguins pour circuler dans le flux sanguin. Elles se lient aux cellules

sensibles via un récepteur glycosphingolipidique se liant à la toxine. Les cellules endothéliales microvasculaires dans les reins et le système nerveux central semblent être préférentiellement sensibles à l'action cytotoxique des toxines de Shiga. Une fois internalisées, les toxines subissent un trafic intracellulaire rétrograde pour atteindre la lumière du réticulum endoplasmique (ER).

Notre travail présentera dans une première partie les généralités sur la Shiga-toxine, ses caractéristiques, sa structure et son mécanisme d'action. Nous développerons dans une deuxième partie son épidémiologie, sa physiopathologie, ses manifestations cliniques, diagnostique et enfin son traitement et prévention.



# Historique

## I. Historique :

En 1898 Shiga a été isolé pour la première fois en tant qu'agent de la dysenterie bacillaire chez un patient souffrant de diarrhée. Cet organisme particulier était *S. dysenteriae*. Quelques années après sa découverte, des extraits de bacilles de culture paralysaient et tuaient les lapins lorsqu'ils étaient administrés par voie parentérale [1].

En 1972 pour que le premier signalement de purification partielle de cette toxine apparaisse [2]. L'extrait de *S. dysenteriae* a provoqué une accumulation de liquide lorsqu'il a été inoculé dans des anses iléales de lapin et était neurotoxique pour les souris. Ils ont suggéré que les deux effets biologiques étaient causés par une seule toxine. Une étude distincte de ces chercheurs a montré que les effets cytotoxiques et entérotoxiques de la 'neurotoxine de Shigella' étaient dus à une toxine unique, Stx. La preuve que la production de toxine par *S. dysenteriae* contribue à la dysenterie a été fournie par des études utilisant des volontaires et un modèle d'iléocolite chez le singe. Stx a été purifié jusqu'à l'homogénéité. La toxine purifiée est cytotoxique pour les cellules de culture tissulaire (HeLa), entérotoxique dans les anses iléales de lapin et mortelle lorsqu'elle est injectée à des lapins ou à des souris. Ces activités biologiques de la toxine peuvent être neutralisées par un antisérum spécifique dérivé de l'immunisation avec l'anatoxine. Les anticorps neutralisants se sont ensuite avérés utiles dans l'extraction de Stx produite par certaines souches d'*E. coli*.

En 1977, Knowalchuk et al, ont signalé que les filtrats de culture de certaines souches d'*E. coli* avaient un effet cytotoxique sur les cellules Vero (cellules rénales de singe vert d'Afrique). Il a été découvert par la suite que cet effet pouvait être neutralisé par un antisérum anti-Stx, suggérant que Stx ou un composé similaire était l'agent responsable de la cytotoxicité. O'Brien et ses collègues ont démontré qu'une souche d'*E. coli* O157: H7 isolée d'une épidémie de colite hémorragique aux États-Unis était toxique pour les cellules HeLa et a suggéré que l'isolat produisait une Shiga-like toxin. Une Shiga-like toxin a ensuite été isolée de cette souche [3]. Sa purification et sa caractérisation ont été décrites en détail peu de temps après. Une toxine similaire a ensuite été identifiée dans de nombreuses souches d'*E. coli*, dont certaines étaient non pathogènes. Une étape importante dans l'évolution de la virulence d'*E. coli* a été l'observation par Karmali et d'autres personnes que la toxine de type Shiga produite par STEC était responsable du SHU.

Chez *S. dysenteriae*, Stx est codé de manière chromosomique. Les gènes des sous-unités de toxine A et B ont été clonés et séquencés. Les masses moléculaires prédites pour les sous-unités A et B traitées sont respectivement 32 225 (293 acides aminés) et 7 691 kDa (69 acides aminés). En revanche, les gènes codant pour la production de Stx coli sont situés sur des phages lambdoïdes convertisseurs de toxine deux phages différents codant pour des gènes de deux toxines antigéniquement distinctes, Stx-1 et 2 [4, 5]. Stx-1 est homologue à 98% de Stx (provenant de *S. dysenteriae*), ne différant que par un seul acide aminé dans la sous-unité A et étant neutralisé par un antisérum anti-Stx-1, Stx-2 présente une homologie inférieure à 60% avec Stx-1 et n'est pas neutralisé par un anti-Stx. Une variance antigénique a été observée dans le sous-groupe Stx-2, en grande partie à cause de la variation de la séquence d'acides aminés dans la sous-unité B de cette toxine. Cette variation dans la sous-unité B explique également les différences de liaison des récepteurs. Spécificité, et donc toxicité vis-à-vis des toxines chez les animaux et dans les cultures cellulaires La plupart de la famille Stx-2 est codée sur un phage, bien que Stx-2e, associé à un œdème porcin, soit généralement codé de manière chromosomique (probablement un phage intégré) [6].



# Généralités

## **II. Généralités :**

### **1. Shiga-toxine :**

Les toxines Shiga sont des protéines ribotoxiques produites par plusieurs espèces de bactéries responsables d'épidémies de maladies gastro-intestinales [7].

Le terme Shiga-toxine a tout d'abord été utilisé pour identifier les toxines produites par *Shigella dysenteriae* de type 1 donnant naissance au terme Shiga-like toxin, ou Shiga-toxine, quand celles-ci ont été identifiées chez *E. coli*. Ce terme a remplacé celui de « Vérotoxine » utilisé pour caractériser les toxines lysant les cellules Vero (cellules épithéliales de rein extraites de singe) chez *E. coli* [8].

La toxine prototypique de ce groupe est la toxine Shiga produite par *Shigella dysenteriae* Type 1, une cause étiologique de la dysenterie bactérienne associée à des sources d'approvisionnement en eau contaminée. Les protéines apparentées toxine de type Shiga 1 et toxine de type Shiga 2 sont produites par diverses souches pathogènes d'*Escherichia coli* productrice de toxine Shiga, responsables de maladies d'origine alimentaire dans le monde [7].

La Shiga-toxine de type 1 codée par les gènes stx1 et la Shigatoxine de type 2 codée par les gènes stx2. Alors que la Shiga-toxine Stx1 est neutralisée par des anticorps anti-Shiga-toxine de *S. dysenteriae* sérotype 1, la Shiga-toxine Stx2 ne l'est pas [5]. Les gènes stx1 et stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie avec la Stx1 de *S. dysenteriae* [4,5]. Ceci s'explique par le fait que les deux toxines ne partagent respectivement que 55 % et 57 % d'identité pour les sous-unités protéiques A et B qui les composent. En revanche, leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires.

### **2. Production de Shiga-toxine :**

On pense que la Stx originale produite par *S. dysenteriae* est codée par son propre gène. Stx-1 et Stx-2 sont produits par des bactéries infectées par Stx-phages. STEC est la principale source de toxines Shiga en corrélation avec les phages Stx, mais les stxphages peuvent également infecter d'autres types de bactéries, telles que *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Shigella sonnei*, pour la production de toxines Shiga. Les phages Stx sont définis

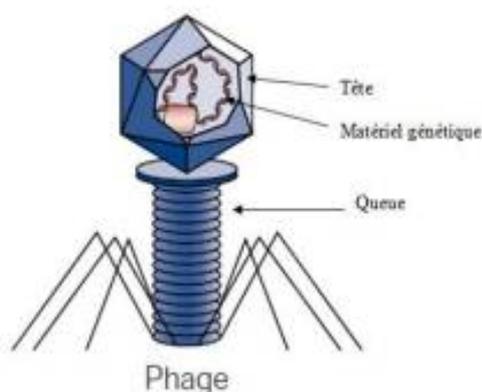
par la présence de l'opéron de la toxine Shiga et d'un groupe d'éléments génétiques mobiles qui peuvent être incorporés dans les sites spécifiques du génome de l'hôte [4]. Les cellules bactériennes peuvent être infectées par plusieurs Stx-phages, produisant ainsi des variantes de toxines de Shiga. La souche 933 d'*E. coli* O157 : H7, a pu produire à la fois Stx-1 et Stx-2 [5]. Les cellules peuvent également être infectées par d'autres types de phages, permettant la recombinaison de gènes à l'intérieur des cellules, renforçant la diversité génétique des phages.

Lorsque les phages Stx infectent les cellules bactériennes, celles-ci choisissent entre deux destins de développement. Ils peuvent se développer de manière lytique, causer des dommages et tuer la cellule hôte. Ils peuvent également se développer dans un état lysogène, où les gènes du phage sont insérés dans les chromosomes bactériens et se répliquent avec eux [9]. Bien que les gènes Stx aient une construction généralement très mosaïque de gènes, ils ont toujours leur gène Stx dans la région tardive du génome, dans une région située en aval du gène anti-terminateur Q et en amont de la cassette de lyse. L'expression du gène Stx est contrôlée par le promoteur PR. Ces gènes ne sont pas exprimés à l'état lysogène, jusqu'à ce qu'un signal soit généré pour induire le cycle lytique. Dans les états lysogènes, la liaison à l'ADN répresseur bloque les promoteurs précoces PL et PR. Pendant l'initiation du cycle lytique, le répresseur est inactivé et un processus de transcription sur les promoteurs PL et PR est induit. PL conduit à une transcription du gène N suivie d'une traduction, et la protéine N permet au processus de transcription de l'ARN polymérase sur PR de s'étendre à travers le des terminateurs pour exprimer le gène Q. La protéine Q se lie à l'ADN sur un site recouvrant la PR', bloquant le terminateur et étendant l'expression à travers l'opéron comprenant les gènes Stx. L'expression des toxines Shiga par le cycle lytique supprime la nécessité de développer un système de sécrétion de la toxine, car les cellules hôtes finissent par lyser et libérer les toxines Shiga [10]. Cependant, un système de sécrétion pour la libération de Stx-2 de cellules viables d'*E. coli* a été détecté.

La décision du génome du phage de passer de l'état lysogène au cycle lytique dépend de la protéine répresseur phagécodée CI [11], et l'inactivation de cette protéine répressive est généralement déclenchée par la réponse SOS, c'est-à-dire une Réponse omniprésente aux dommages causés à l'ADN de la cellule hôte. La réponse peut être déclenchée lorsque la cellule hôte est sensible aux antibiotiques ou aux espèces réactives de l'oxygène libérées par les leucocytes.

### 3. Bactériophage de Shiga-toxine :

Les gènes codant les Shiga-toxines ont la particularité d'être portés par un bactériophage tempéré (Figure 1) capable d'alterner entre une phase lysogénique et une phase lytique. Le bactériophage stx en phase lysogénique infecte une bactérie et intègre son génome au sein du chromosome bactérien. Ce matériel génétique ainsi intégré prend le nom de prophage et est le plus souvent « dormant » en raison d'une répression de la transcription des gènes nécessaires au cycle lytique. Sous différentes conditions, le bactériophage stx peut entrer en phase lytique avec une activation de la transcription des gènes correspondants, sous l'influence d'un élément déclencheur (exposition aux UV, antibiothérapie, traitement alimentaire) conduisant à la production de dizaines voire de centaines de phages au sein de la bactérie qui finira par littéralement exploser, libérant ainsi les nouveaux phages qui pourront infecter d'autres bactéries [12].



**Figure 1 : Représentation schématique d'un bactériophage stx dans configuration tête-queue [12]**

Les bactériophages Stx sont impliqués dans le transfert horizontal des gènes stx (transfert du matériel génétique du phage dans le génome bactérien) chez *E. coli* et ceci de manière aléatoire, participant ainsi à l'émergence de nouvelles souches STEC. Le bactériophage est un élément instable à l'intérieur de la bactérie. Il peut être perdu au cours d'une infection ou de cultures successives comme cela a été observé chez le sérotype O157:H7 et le sérotype O26 [12].

Les bactériophages Stx sont retrouvés libres chez l'Homme et dans l'environnement ; dans les fèces des animaux [13], dans les effluents d'origine humaine et animale (bovin, porc, volaille) [13, 14,16] dans les rivières et dans les aliments (viandes et salade).

Les concentrations en bactériophages stx peuvent varier par exemple entre 1 à 9 log<sub>10</sub> copies de gène/ml dans les effluents d'origine humaine et animale [14,16] et sont souvent plus importantes que les concentrations en *E. coli* qui elles peuvent varier entre 4 et 5 log<sub>10</sub> UFC/ml dans les effluents.

Les bactériophages persistent plus longtemps que les bactéries ; ils sont stables à 4, 22 et 37°C et à pH 7 et 9 pendant un mois, tandis que les populations de STEC déclinent rapidement dans ces mêmes conditions [12]. Les bactériophages portant les gènes stx2 sont plus souvent détectés que les bactériophages portant les gènes stx1 dans l'environnement : par exemple dans une méta-analyse de 25 études, les bactériophages stx2 ont été détectés dans les 25 études et le bactériophage stx1 dans cinq cas seulement. Cette même observation a également été confirmée par une récente étude effectuée sur 357 échantillons de fèces humaines et d'animaux, d'eaux usées, de matières fécales, d'eaux de rivière, de sols, de boue et d'aliments où stx1 a été détecté dans 7,6 % des échantillons et stx2 dans 68,4 % [17, 12].

#### **4. Bactéries productrices de toxine de Shiga :**

La toxine Shiga, produite par *Shigella dysenteriae*, consiste en un cycle de cinq sous-unités B identiques (le fragment B), associé de manière non covalente à la chaîne A de la toxine. Chaque chaîne B de la toxine Shiga a une masse moléculaire de 7 691 Da et trois sites de liaison pour Gb3. Cependant, les sites de liaison diffèrent par leur capacité à se lier au récepteur. La capacité d'une molécule de toxine à se lier à plusieurs molécules de glycosphingolipide sera probablement importante, non seulement pour sa forte liaison à la surface cellulaire, mais également pour son entrée dans les cellules. La chaîne A intacte de la toxine Shiga a une masse de 32 225 Da et contient une boucle formée par une liaison disulfure impliquant les deux cystéines en positions 242 et 261. Cette boucle comprend la séquence Arg-X-X-Arg, qui est le motif de reconnaissance minimal de l'enzyme cellulaire furine, responsable du clivage de la chaîne A en partie active de A1 et du peptide A2 inactif [18]. Dans la toxine Shiga, le site actif de A1 est bloqué par un résidu méthionine présent

dans A2 [22] et l'holotoxine doit être clivée pour pouvoir exercer son action toxique. Les cellules qui n'expriment pas la furine sont moins sensibles à la toxine Shiga. Cependant, lorsque la furine est exprimée dans ces cellules, elles obtiennent la capacité de cliver la toxine et deviennent également sensibilisées à la toxine Shiga.

Un certain nombre de toxines de type Shiga sont produites par STEC et d'autres bactéries, telles que *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae*, sécréter ont été signalés à des toxines similaires. Bien que la toxine Shiga soit codée chromosomiquement, les toxines de type Shiga sont codées par les prophages dans *E. coli* et peuvent donc être transférées à d'autres bactéries. Le fait que des bactériophages libres codant pour une toxine de type Shiga puissent être isolés des eaux usées suggère que d'autres bactéries peuvent devenir des producteurs de toxines. Il convient de noter que les toxines Shiga sont également appelées vérotoxines (VT) en raison de leur fort effet toxique sur les cellules Vero, et les désignations VT1 et VT2 sont encore couramment utilisées. Stx1 est presque identique à la toxine de Shiga, à l'exception d'un acide aminé qui diffère. En revanche, Stx2 comprend plusieurs sous-groupes. Certaines bactéries produisent plus d'un variant de la toxine. Plusieurs types de toxines Shiga sont produits chez l'homme après une infection. Des études sur 677 STEC ont révélé qu'elles produisaient six types différents de toxines (Stx1a, Stx1c, Stx2a, Stx2c, Stx2d et Stx2e). La plupart des toxines de type Shiga se lient au Gb3; Cependant, Stx2e est un cas particulier. Il se lie à Gb4 et est sécrété par des bactéries qui infectent le plus souvent les porcs. Les études structurales des toxines de Shiga révèlent des différences importantes entre Stx1 et Stx2. Contrairement à la toxine Shiga [19], le site actif de Stx2 est accessible dans la structure cristalline, les extrémités carboxyle des sous-unités A des deux toxines diffèrent par leur structure et l'un des domaines de liaison au récepteur du pentamère B diffère par conformation. Cela peut expliquer les différentes interactions cellulaires de ces toxines et, fait intéressant, la liaison de Stx1 et Stx2 est modulée différemment par le microenvironnement lipidique du récepteur des glycosphingolipides [20].



# **Caractéristiques de Shiga toxine**

### III. Caractéristiques de Shiga toxine :

La toxine Shiga est l'un des agents biologiques les plus toxiques connus, notamment les toxines du tétanos et du *Clostridium* de type A [21]. A l'origine démontré être un produit neurotoxique du bacille de Shiga, ou *Shigella dysenteriae*, sa connaissance remonte à **1903**. Lorsqu'on l'accorde aux lapins ou aux souris iv intraveineuse, Une paralysie motrice ascendante, consécutive à des hémorragies microvasculaires dans la moelle épinière, est ensuite administrée à des lapins ou à des souris iv [21, 22]. La toxine de Shiga administrée par voie iv provoque une hémorragie, un œdème et une ulcération de l'intestin de plusieurs espèces animales [22]. Cependant, lorsqu'ils sont instillés dans les anses iléales du lapin, les effets toxiques varient de peu ou pas de modifications à une inflammation sévère voire à une ulcération. Il est cytotoxique pour les cellules KB, foie, reins de singe et HeLa (carcinome épidermoïde cervical humain) [23], mais pas pour WI38 [23], Henle 407 (intestin de l'embryon humain), ovaire de hamster chinois, L, BHK ou cellules de mélanome humain [24] à moins d'être délivrés intracellulairement par une bactérie vivante. La cytotoxicité restreinte contraste avec la toxine cholérique, qui affecte une grande variété de cellules. Les cellules HeLa sont particulièrement sensibles à la toxine Shiga [23] et le test de cytotoxicité pour les cellules HeLa est devenu la méthode privilégiée pour déterminer la présence et la quantité de toxine Shiga. La dose cytotoxique à 50% (CD<sub>50</sub>) correspond à 1-2,5 pg de protéine de toxine purifiée / ml [23, 24]. La toxine a également une activité entérotoxique, telle que déterminée par le test de la boucle iléale du lapin et le test de perfusion jéjunale. En comparaison avec la cytotoxicité, l'entérotoxicité nécessite davantage de protéines, soit 20 ng de toxine pour la dose entérotoxique 50070 [30]. Le test de létalité chez la souris est le moins sensible, nécessitant 0,2 µg pour une dose toxique de 50070 [25]. Les trois activités, neuro, cyto- et entérotoxicité, sont dues à une seule protéine [25,26].

La toxine Shiga, dont la synthèse est augmentée par l'épuisement du fer dans les milieux de culture et par la culture aérobie [21] a été hautement purifiée dans plusieurs laboratoires [29, 22]. Il est relativement stable à la chaleur, surtout compte tenu de sa taille, présente une certaine perte d'activité à 60 ° C et une inactivation complète après 30 minutes à 90 ° C [23, 24]. Les estimations de la masse moléculaire se situent entre 58 000 et 70 000 [29]. Les

estimations de la taille des sous-unités varient, mais deux sous-unités, l'une sur M, 30 000, appelée sous-unité A, et une sous-unité plus petite, M, 4 000-15 000, appelée sous-unité B, ont été décrites. Le clivage par la trypsine de la sous-unité donne deux fragments, une plus grande sous-unité At et une plus petite sous-unité A2. On pense que la sous-unité At est synthétisée sous une forme de proenzyme inactive et nécessite un clivage protéolytique pour exprimer toute son activité. La sous-unité At inhibe la synthèse des protéines dans un système dépourvu de cellules, mais elle n'est pas toxique pour les cellules entières. On a pour hypothèse que la sous-unité B fonctionne comme une fraction de liaison. Cependant, la liaison au récepteur de la sous-unité B n'a pas encore été démontrée. La faible quantité requise pour la toxicité et la structure en dichain suggèrent que la toxine Shiga est une enzyme [26].

## **1. Types et nomenclature :**

Bien que les prototypes de *E. coli* Stx de chaque groupe principal, Stx1 et Stx2 (maintenant appelés Stx1a et Stx2a pour la distinction dans la nomenclature des autres sous-types de toxines [27]), Les sous-types de chaque toxine existent, comme indiqué dans le tableau I. De nombreuses nouvelles souches de STEC ont été isolées et les gènes de toxines de ces souches ont été séquencés, il est devenu difficile de savoir si les différences trouvées entre le gène nouvellement isolé et le prototype stx2a devaient aboutir à la désignation d'un autre sous-type de toxines. Par conséquent, une analyse phylogénétique des séquences stx a été entreprise et un schéma de typage par PCR développé permettant l'attribution d'une toxine à un sous-type particulier [32].

### **1.1 Stx / Stx1 Sous-types :**

À ce jour, aucune variante de Stx telle que produite par *Shigella* n'a été décrite, mais Stx est parfois retrouvé chez *Shigella sonnei* et dans le type 4 *S. dysenteriae*. Seuls deux variants de Stx1a ont été identifiés : Stx1c et Stx1d. Les deux Stx1c et Stx1a peuvent être distinguées immunologiquement de Stx1. Stx1c et Stx1d sont rarement retrouvés dans les maladies humaines et, lorsqu'ils sont associés à des STEC isolés chez des patients, ils sont associés à une évolution légère de la maladie [28].

## 1.2 Stx2a Sous-types :

Le premier variant de la toxine Stx2a, identifié comme important pour la maladie humaine, Stx2c, présente une cytotoxicité réduite sur les cellules Vero et réagit différemment de Stx2a à certains anticorps monoclonaux [29]. Une autre variante de Stx2a, Stx2d (Stx2d activable), a été identifiée en raison de l'incubation de la cytotoxicité de la toxine sur des cellules Vero [30]. Le Stx2d activable est associé à la manifestation la plus grave d'infection par STEC, le SHU. Stx2c et Stx2d présentent une cytotoxicité réduite pour les cellules Vero en raison de différences de 2 acides aminés dans la sous-unité B, mais Stx2d est aussi toxique que Stx2a lorsqu'elle est injectée à des animaux [31]. Modèle murin d'infection. En revanche, on rapporte que Stx2c présente une toxicité réduite par rapport à Stx2 lorsqu'il est injecté à des souris. Un sous-type différent de Stx2a, appelé à l'origine Stx2d, maintenant appelé Stx2b, ne peut pas être activé et est associé à une maladie bénigne. Stx2e, Stx2f et Stx2g sont associés à une infection par STEC chez un animal. Parmi ces dernières toxines, seule Stx2e est associée à une maladie chez l'animal hôte ; cette toxine provoque un œdème chez le porc, un trouble neurologique rare mais grave, souvent fatal [28].

**Tableau I : Toxines prototypes et les souches qui produisent ces toxines [28].**

Types de toxines	Souche prototype utilisée pour la détermination du sous-type stx	Lié à de graves maladies humaines; différence(s) par rapport à la toxine prototype
<b>Stx</b>	3818T	Yes
<b>Stx1a</b>	EDL933 (makes Stx1a and Stx2a)	Yes
Stx1c	DG131/3	No; immunologically distinct
Stx1d	MHI813	No; immunologically distinct, less potent
<b>Stx2a</b>	EDL933 (makes Stx1a and Stx2a)	Yes
Stx2b (originally named VT-2d or Stx2d)	EH250	No; the B subunit gene was not detected by methods used to detect other <i>stx</i> <sub>2</sub> B subunit genes
Stx2c	031	Yes, less toxic to Vero cells and mice
Stx2d (Stx2dact)	C165-02	Yes; more toxic after incubation with elastase, less toxic to Vero cells
Stx2e	S1191	No; binds to Gb4, associated with disease in pigs
Stx2f	T4/97	No; originally isolated in STEC from pigeons; immunologically distinct
Stx2g	7v	No; the <i>stx</i> <sub>2g</sub> gene is not amplified by primers specific for <i>stx</i> <sub>2a</sub>

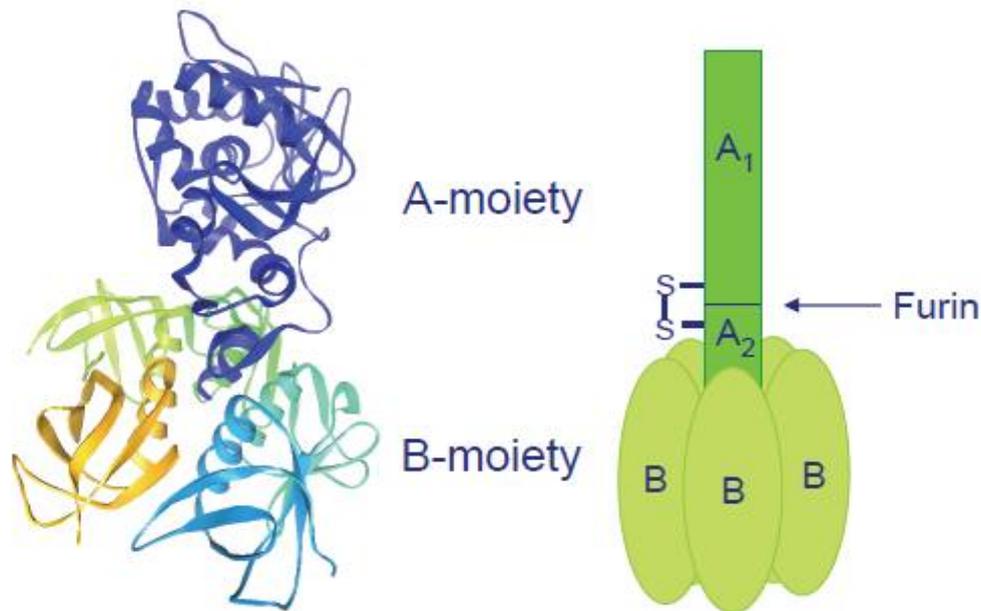
## 2. Génétique et structure de Shiga-toxine :

### 2.1. Structure moléculaire :

La famille des toxines Shiga comprend plusieurs toxines protéiques structurellement et fonctionnellement similaires. Le prototype de la famille est la toxine Shiga élaborée par *S. dysenteriae* de type 1; les toxines Shiga exprimées par *E. coli* ont une désignation numérique après le nom de toxine Shiga, par exemple, Stx1 diffère de la toxine Shiga de *S. dysenteriae* par un seul acide aminé. Stx2 est homologue à environ 50% de Stx1 au niveau protéique et est immunologiquement distincte.

Les protéines de la famille de la toxine Shiga inhibent la synthèse des protéines en bloquant la liaison dépendante du facteur d'élongation 1 de l'aminocyl-ARNt aux ribosomes. Toutes les toxines de Shiga connues à ce jour sont composées d'une sous-unité A active sur le plan enzymatique et d'un pentamère de sous-unités B identiques qui induisent une activité de liaison spécifique. La sous-unité A fonctionne comme une glycohydrolase, coupant une adénine spécifique de l'ARNr 28S et inhibant de manière irréversible la fonction ribosomale. Cette activité est identique à l'activité enzymatique observée pour la toxine végétale ricine [32].

Les analyses cristallographiques aux rayons X de la toxine Shiga et des sous-unités Stx1 B ont confirmé la structure AB<sub>5</sub>, révélant un noyau sous-unité pentamérique B entourant un a-heHx C-terminal de la sous-unité A [19], qui est similaire à la structure AB<sub>5</sub> de toxine cholérique et toxine thermolabile de *E. coli*. Lorsque la sous-unité A est traitée avec de la trypsine et réduite, une partie A1 d'environ 28 kDa et un peptide A2 d'environ 4 kDa sont séparés. Le fragment A1 contient la partie enzymatiquement active de la molécule de toxine et le composant A2 doit lier de manière non covalente la sous-unité A entière au pentamère B [33]. Les fragments A1 et A2 sont liés par une liaison disulfure. Le fragment A2 peut jouer un rôle important dans l'assemblage des holotoxines [33], et le pont disulfure entre A1 et A2 semble nécessaire à la formation de pentamères.



**Figure 2 : Structure de Shiga-toxine [73]**

La boucle disulfure contient la séquence Arg-X-X-Arg, un motif consensus pour le clivage par la protéase furine à ancrage membranaire. Le clivage de la toxine Shiga sur ce site, entraînant la formation de fragments A1 et A2, semble être important pour l'intoxication cellulaire [30]. Fait intéressant, Stx2d est activé par le mucus intestinal ; cette caractéristique distingue Stx2d des autres membres de la famille Stx2. La substance du mucus qui active Stx2d a été identifiée comme une élastase qui clive les deux acides aminés C-terminaux de la sous-unité A2 [34], mais d'élégantes études portant sur des toxines hybrides de Shiga ont démontré que cette activation dépendait de la structure du pentamère B.

Les caractéristiques structurales importantes pour l'activité enzymatique des toxines de Shiga ont été définies. Stx1, Stx2 et Stx2e et la toxine végétale ricine, qui inhibent tous la synthèse des protéines par le même mécanisme d'action, partagent deux domaines d'homologie dans leurs sous-unités A [35]. Dans la zone 1, l'acide glutamique 167 est essentiel pour la biologie activité de Stx1. Des expériences similaires dans Stx2 ont montré des résultats similaires, affirmant l'importance de ce résidu d'acide glutamique dans le site actif [109]. Dans la zone 2, la suppression des acides aminés 202 à 213 de la sous-unité Stx2 A permet l'assemblage des holotoxines mais pas la cytotoxicité [35].

## 2.2. Structure protéique :

Stx, avec un fragment A actif sur le plan enzymatique et un fragment B non toxique, responsables de la liaison aux récepteurs cellulaires. Le fragment B consiste en cinq sous-unités B identiques (7,7 kDa) formant un cycle pentamérique entourant la partie centrale. Pore dans lequel l'extrémité C-terminale du fragment A est le pore central dans lequel l'extrémité C-terminale du fragment A est ancrée [19,32], comme indiqué sur les figures 3A, B Chaque sous-unité B héberge trois sites de liaison distincts (sites 1-3, comme indiqué sur la figure 3C) qui interagissent spécifiquement avec le fragment trisaccharide du glycosphingolipide Gb3 (structure représentée sur la figure 2A) [8]. Ainsi, chaque fragment B peut potentiellement interagir avec jusqu'à 15 molécules de Gb3, entraînant une liaison de haute affinité.

**Tableau II : Sous-types et variantes de la famille des toxines de Shiga [8].**

Toxin <sup>a</sup>	Source	Synonyms	A subunit homology <sup>b</sup>	B subunit homology <sup>b</sup>
Shiga toxin	<i>S. dysenteriae</i> type I	Stx		
Shiga toxin 1a	<i>E. coli</i> O157:H7	SLTI, VT1, Stx1a	99%	100%
Shiga toxin 1c	<i>E. coli</i> O128:H2	SLTIIc, VT1c, Stx1c	97%	97%
Shiga toxin 1d	<i>E. coli</i> ONT:H19	SLTIId, VT1d, Stx1d	94%	92%
Shiga toxin 2a	<i>E. coli</i> O157:H7	SLTII, VT2, Stx2, Stx2a	Stx hom.: 55%	Stx hom.: 57%
Shiga toxin 2b	<i>E. coli</i> O118:H12	SLTIIb, VT2b, Stx2b	94%	89%
Shiga toxin 2c	<i>E. coli</i> O157:H7	SLTIIc, VT2c, Stx2c	100%	97%
Shiga toxin 2d	<i>E. coli</i> O91:H21	SLTIIId, VT2d, Stx2d	99%	97%
Shiga toxin 2e	<i>E. coli</i> O139	SLTIIe, VT2e, Stx2e	94%	87%
Shiga toxin 2f	<i>E. coli</i> O128:H2	SLTIIIf, VT2f, Stx2f	71%	83%
Shiga toxin 2g	<i>E. coli</i> O2:H25	SLTIIIf, VT2g, Stx2g	96%	94%

A | Nomenclature basée sur la proposition de 2009

B | Homologie de séquence avec le prototype du sous-type de la toxine Shiga (toxine Shiga ou toxine Shiga 2a).

Pour intoxiquer les cellules, le fragment A (32,2 kDa) doit être clivé par la protéase furine dans le fragment A1 enzymatiquement actif (w27,5 kDa) et un petit fragment A2 (w4,5 kDa) [18]. Les fragments A1 et A2 sont maintenus ensemble par une liaison disulfure entre les cystéines 242 et 261 (figure 3A). En reconnaissant un motif de séquence spécifique (Arg – X – X – Arg) dans la boucle protéique formée par la liaison disulfure, la furine coupe le fragment A entre R251 et M252 dans la toxine Shiga et la toxine Shiga 1, et entre les extrémités R250 et A251 dans la toxine Shiga. 2 [18]. Non seulement les acides aminés spécifiques dans le site de reconnaissance de la furine sont nécessaires pour un clivage efficace, mais les acides aminés voisins dans la boucle sont également importants, très probablement pour l'exposition du site de la furine. La furine est également responsable du clivage et de l'activation d'autres toxines protéiques, telles que la toxine diphtérique et l'exotoxine de *Pseudomonas*, et le pH optimal pour le clivage de la toxine dépend du substrat [36]. Le clivage des toxines Shiga est optimal un pH faible [37], ce qui suggère qu'il se produit tôt dans la voie de transport. Cependant, même les cellules dépourvues de furine peuvent se scinder et activer la toxine Shiga, bien que de manière moins efficace et à un stade ultérieur du transport. Après clivage, le fragment A1 reste attaché au fragment A2 via la liaison disulfure jusqu'à ce que la toxine soit exposée aux conditions réductrices de la lumière ER (réticulum endoplasmique) [37]. Le fragment A1 libéré est ensuite transféré dans le cytosol où il exerce son action cytotoxique.

Bien que les membres de la famille des toxines Shiga partagent la même structure et la même fonction, il existe des différences entre les variantes de toxines (Tableau II).

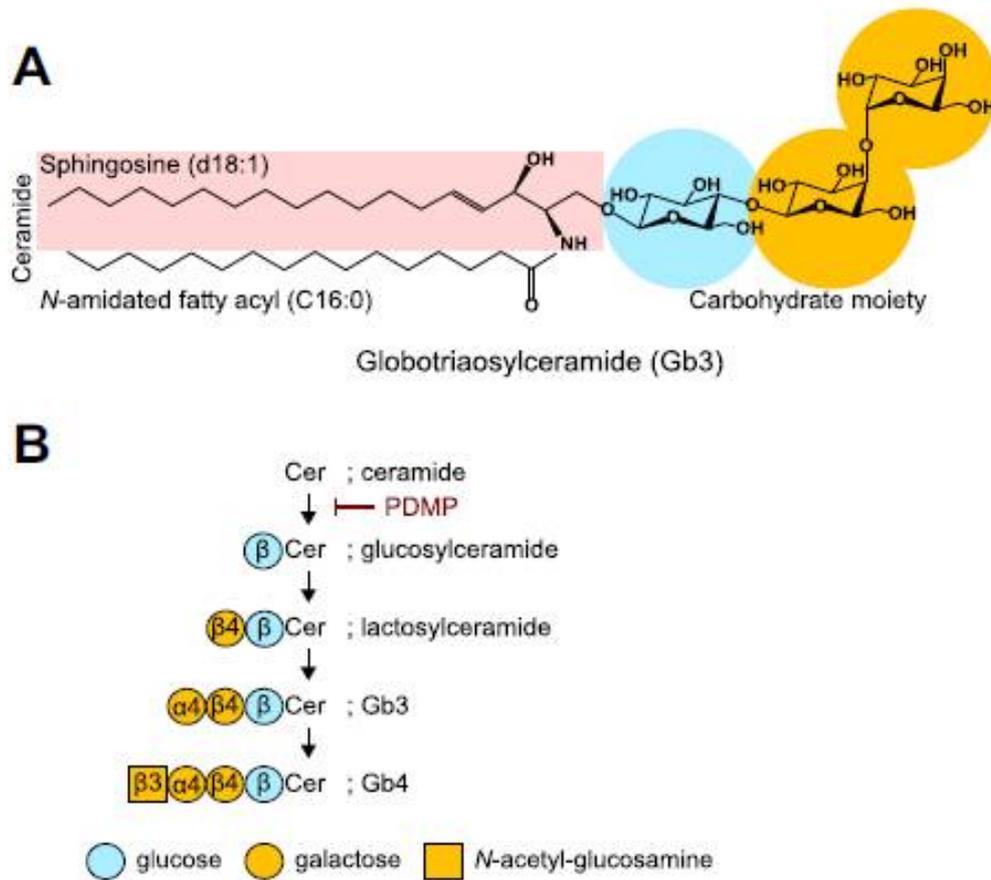
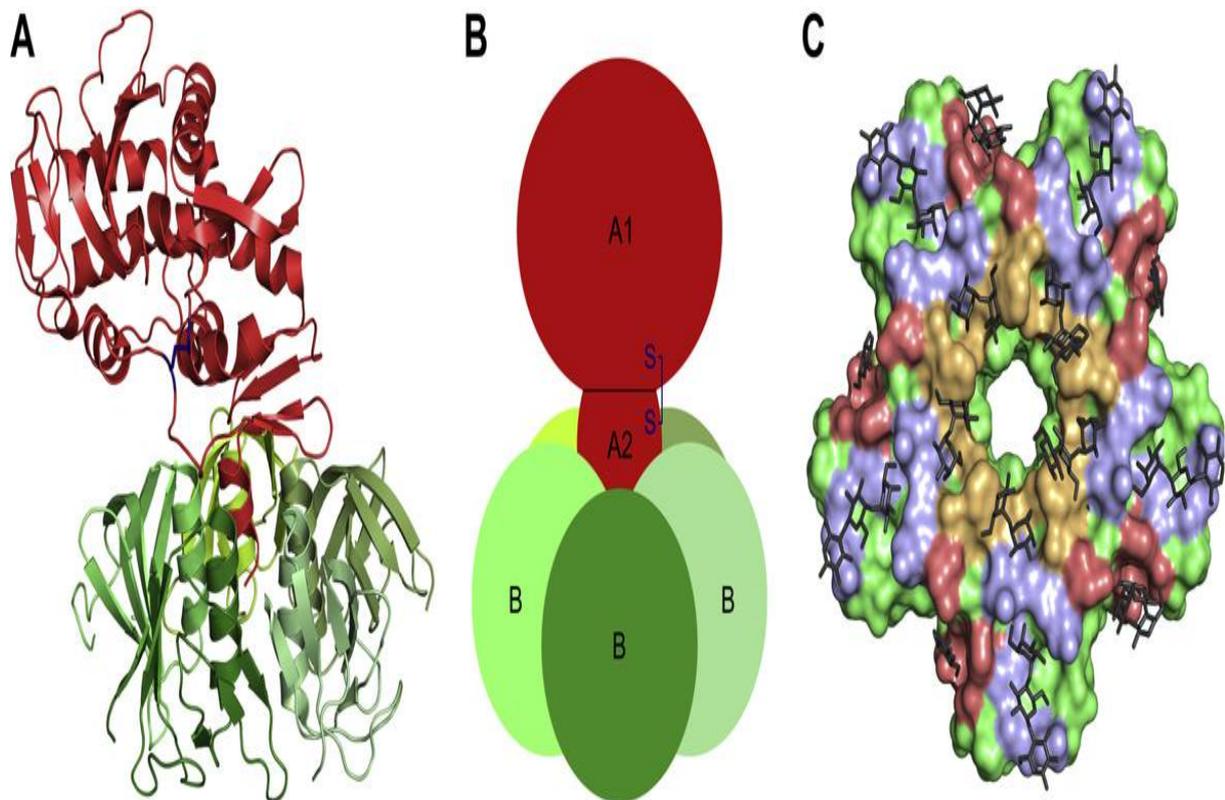


Figure 3 : Structure de récepteur Gb3 de la toxine Shiga [8].

La toxine Shiga produite par *S. dysenteriae* et la toxine Shiga 1 d'*E. coli* sont les membres de la famille les plus similaires ; ils ont des fragments B identiques [50], et ne diffèrent que par un seul résidu dans le fragment A [51]. La toxine Shiga 2 est immunologiquement distincte de la toxine Shiga 1 et elles ne partagent que l'identité de séquence d'acides aminés w56%. Des études de cristallographie aux rayons X ont montré qu'il existe des différences structurelles entre la toxine Shiga 1 et la toxine Shiga 2 dans les fragments A et B. Dans la toxine Shiga 2, le site actif de la fraction A est accessible dans la structure cristalline [38], tandis qu'une partie du fragment A2 bloque les sites actifs de la toxine Shiga et de la toxine Shiga 1 [38], les laissant inactifs jusqu'à ce qu'ils soient clivés de manière protéolytique en fragments A1 et A2. La partie A de la toxine Shiga 2 à une orientation différente par rapport à la partie B par rapport à la toxine Shiga 1, et l'extrémité carboxyle de la partie A est plus étendue et plus structurée [38], comme l'extrémité C-terminale. Une partie de la toxine Shiga 2 est détectée par cristallographie aux rayons X tandis que la fin de la toxine Shiga 1 ne l'est pas.



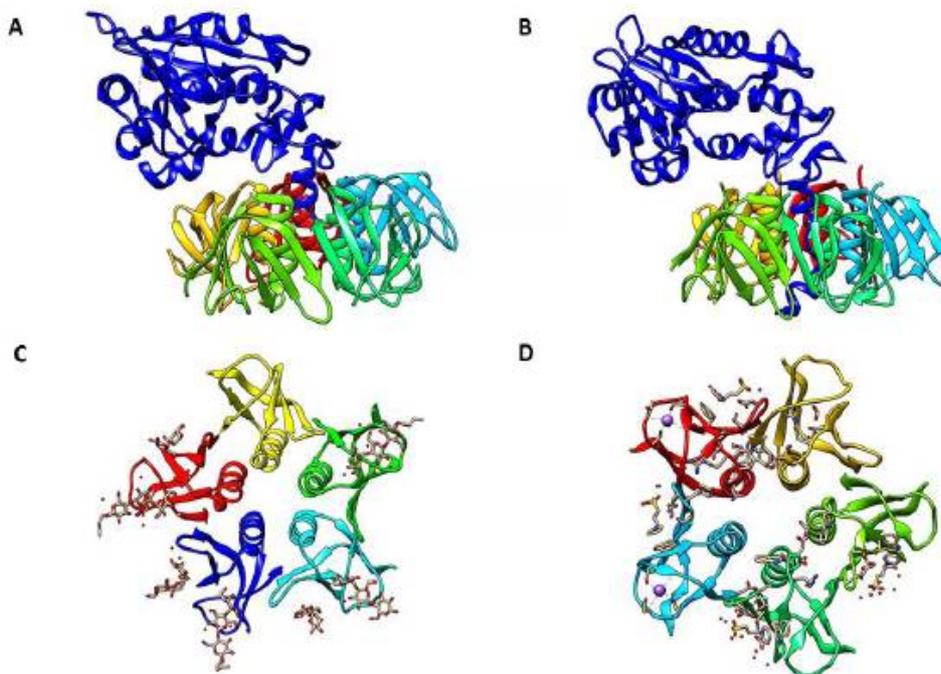
**Figure 4 : Structure de l'holotoxine Shiga-toxine [8]**

La partie C-terminale de la fraction Shiga toxine 2 A occupe l'un des sites de liaison au récepteur du site 1 et peut ainsi affecter l'affinité du récepteur [38]. Bien que la toxine Shiga 1 présente une plus grande affinité pour le trisaccharide présent sur le récepteur Gb3 [8]. La différence d'affinité pour les récepteurs peut être due à la conformation différente du site de liaison 2 dans la sous-unité B de la toxine Shiga 2 [38], qui serait le site de liaison primaire de haute affinité pour le trisaccharide. Ceci est basé sur la structure cristalline de Stx1B complexée avec un analogue de Gb3 [8] et sur les affinités pour les analogues de trisaccharide Gb3 solubles mesurées par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray. En outre, il a été montré que la liaison de la toxine de Shiga 1 et 2 à la toxine est modulée de manière différentielle par la partie céramide et le microenvironnement lipidique du récepteur des glycosphingolipides [20]. Les différences de liaison des récepteurs peuvent entraîner un ciblage différentiel sur les tissus sensibles et affecter le tri intracellulaire, et par conséquent déterminer la pathologie.

### **3 Shiga-toxine structure et récepteur interaction**

Tous les membres de la famille des toxines Shiga partagent la même configuration structurale constituée d'une sous-unité A enzymatiquement active d'environ 32 kDa liée de manière non covalente à cinq sous-unités B identiques, chaque protéine de sous-unité B ayant une taille d'environ 7,7 kDa. Dans les analyses cristallographiques des holotoxines, les sous-unités B homopentamériques forment un cycle avec l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité A insérée dans le pore central [19, 37]. Une différence structurale majeure entre Stx1 et Stx2 réside dans le fait que, contrairement à la sous-unité A Stx1, l'extrémité C-terminale de la sous-unité A Stx2 forme un hélice après avoir traversé le pore central des sous-unités B . Les sous-unités Stx A sont clivées de manière asymétrique par la furine ou une protéase analogue à la furine en deux peptides, A1 (~ 27,5 kDa) et A2 (~ 4 kDa), qui sont maintenues ensemble par une liaison disulfure [18]. Le fragment A1 enzymatiquement actif est libéré par réduction de la liaison disulfure lors de l'exposition aux conditions réductrices de la lumière ER des cellules cibles. Des études de mutagenèse ont montré que le site actif du fragment A1 de la fonction N-glycosidase comprenait la position 167 (acide glutamique) [35], qui était nécessaire pour éliminer une adénine base dans le domaine VI de l'ARN ribosomal 28S de

ribosomes eucaryotes [39]. Il a été rapporté que les sous-unités B de ces Stx se lient aux récepteurs Gb3, alors que celles-ci se lient faiblement au glycolipide neutre Globotetraosylceramide (Gb4) [40]. Récemment, cependant, Gallegos et al, ont signalé que Stx1 et Stx2 se sont liées à Gb3 et Gb4 in vitro avec des affinités comparables. Chez les neutrophiles humains, le récepteur de type péage (TLR) 4 a récemment été révélé comme un récepteur reconnaissant les sous-unités A de Stxs. Sur la base de la structure cristalline des sous-unités B, chaque monomère des sous-unités B de Stx1 et Stx2 contient trois sites de liaison distincts, numérotés sur les sites 1 à 3, pour le composant glycanique de Gb3 (figures 4C, D) [41]. Ainsi, chaque cycle homopentamérique de sous-unités B peut contenir au total 15 sites de liaison à Gb3 [32]. En outre, le site 2 dans chaque sous-unité B a démontré une occupation plus élevée que le site 1 et il y avait moins d'interaction détectée avec le site 3. Sur la base des études de mutation qui ont confirmé le rôle principal du site 2 dans la liaison à Stx1, l'interaction du site 2 avec Gb3 à la surface de la cellule cible joue un rôle essentiel dans la toxicité de Stx1 et Stx2 [41].



**Figure 5 : Structure cristalline de la toxine Shiga [41]**

L'affinité de liaison des sous-unités B homopentamériques (15 sites de liaison, constante de liaison =  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ) est supérieure à celle des sous-unités B monomères (trois sites de liaison, constante de liaison =  $10^3 \text{ M}^{-1}$ ), ce qui suggère que plusieurs sites de liaison améliorent considérablement l'affinité à la liaison [41]. La plupart des données structurales et de liaison ont été collectées à l'aide de Stx1. Récemment, Jacobson et al. [42] ont rapporté la première structure cristalline de sous-unités B pentamériques de Stx2 liées à un analogue disaccharidique de Gb3 et ont montré que les sites 1 et 2 étaient fonctionnels et que le site de liaison primaire était le site 2, comme dans les expériences sur Stx1. Fait intéressant, l'affinité de liaison des glucides pour le site 2 dans Stx2 était supérieure à celle de l'interaction dans Stx1. Conrady et al. ont rapporté que les sous-unités B pentamériques de Stx1 étaient plus stables que celles de Stx2 avant la résolution de la structure cristalline de Stx2 lié à Gb3. Le site 3 des sous-unités B de Stx2 est partiellement bloqué par l'extrémité C du fragment A2, ce qui entraîne la désactivation des sites de liaison jusqu'à ce que la sous-unité A soit traitée dans l'ER [37]. Prises ensemble, ces données peuvent indiquer qu'il existe des différences dans les mécanismes de liaison au récepteur de Stx1 et Stx2, et des différences dans les préférences de liaison au récepteur entre Stx1 et Stx2 peuvent contribuer aux différentes toxicités observées entre les toxines.

Les molécules d'holotoxine Stx sont internalisées dans les cellules par des voies d'endocytose dépendantes de la clathrine ou indépendantes de la clathrine, en fonction du type de cellule examiné [8]. Il a été rapporté que le processus dépendant de la clathrine est la voie la plus commune d'absorption cellulaire après la liaison du récepteur par les toxines [8]. Cependant, le spectre complet des mécanismes d'absorption cellulaire de Stx reste à caractériser. Par exemple, Malyukova et al, ont démontré que la macropinocytose est une voie alternative pour l'absorption de Stx dans des cellules n'exprimant pas le Gb3. Mécanismes uniques d'internalisation des sous-unités B de la toxine Shiga (StxB) via les récepteurs Gb3, liant la forme pentamérique de StxB à jusqu'à 15 récepteurs Gb3 avec une haute affinité .une faible immunogénicité in vivo et une minimisation de la dégradation lysosomique par le biais du trafic rétrograde, a fortement encouragé de nombreux chercheurs à exploiter cette protéine en tant qu'agent thérapeutique ciblant le cancer, comme l'administration de médicaments et l'imagerie de cellules tumorales à haute intensité. En effet, les agents anticancéreux à base de

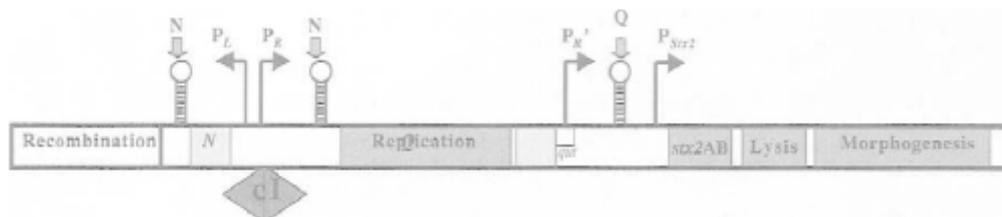
StxB sont en cours de développement en tant que cargaison de livraison ciblée de molécules thérapeutiques. Plus récemment, une surexpression de Gb3 a été détectée chez 57,9% des patientes atteintes d'un cancer du sein. Fait intéressant, l'expression de Gb3 est augmentée dans les métastases des ganglions lymphatiques (40% des tumeurs primitives) et en corrélation positive avec l'expression des récepteurs aux œstrogènes, qui est la preuve clinique la plus récente du modèle d'expression de Gb3 chez les patients cancéreux [41].

#### 4 Génétique :

Les toxines Shiga sont codées par le phage (Stx1 et Stx2) ou par le chromosome (Stx et Stx2e) [43].

Au début des années **1970**, il a été signalé pour la première fois que des lysats d'une souche d'*E. coli* 026 : H11, isolée d'un foyer de diarrhée infantile, pouvaient transférer l'entérotoxigénicité in vitro à une bactérie *E. coli* non pathogène [44]. C'est la première indication que chez STEC, les toxines de Shiga ont été encodées par des bactériophages. Les bactériophages ont codé les toxines Shiga. Des lysats de cette souche, le phage appelé H-19B a ensuite été isolé. Il a été démontré que ce phage codait pour Stx1 et présentait une homologie de séquence d'ADN avec le phage lambda (x) [45].

**En 1982** un second phage lambdoïde codant pour Stx2, appelé 933W, a été isolé d'un isolât clinique 0157 : H7 responsable d'un foyer de colite hémorragique [4,43].



**Figure 6 : Diagramme des phages codant Stx2**

Depuis ces premières observations, il est maintenant admis que les phages codant pour Stx sont des lambda-Hke et que les composants régulateurs liés à l'induction et au contrôle du gène phage semblent être similaires à ceux de lambda. Les isolats cliniques de STEC peuvent contenir un seul phage ou plusieurs phages. De nombreux isolats cliniques 0157 : H7 hébergent des bactériophages Stx1 et Stx2 distincts.

Différents groupes ont publié les séquences de nucléotides des gènes stx [46]. Les différents opérons stx ont une structure similaire et sont composés d'une seule unité de transcription composée d'une copie du gène de la sous-unité A, suivie du gène de la sous-unité B. On croyait initialement que la sous-unité B avait son propre promoteur [47] ; plus tard, on s'est rendu compte qu'un seul promoteur transcrit les sous-unités A et B ; La traduction des sous-unités B est augmentée en raison d'un site de liaison ribosomal plus fort comparé à la traduction des sous-unités A. Cela se traduit par une traduction plus importante des sous-unités B, fournissant davantage de sous-unités B pour la structure A1 : B5 de l'holotoxine de la toxine de Shiga [48].

La comparaison de la séquence nucléotidique des sous-unités A et B de Stx1 et Stx2 révèle respectivement une homologie de 57% et 60%, avec une homologie d'acides aminés de 55% et 57%. En dépit de ce degré d'homologie, Stx1 et Stx2 sont immunologiquement distincts, et aucun d'entre eux n'est neutralisé par croisement par un anticorps polyclonal dirigé contre l'autre toxine. Stx2c est très similaire à Stx2 ; les sous-unités A sont identiques et les sous-unités B partagent une homologie d'acides aminés de 97%. Stx2c et Stx2d ont des sous-unités B identiques ; les sous-unités A partagent 99% d'homologie [49]. Stx2e présente le moins de similitude avec les autres membres de la famille Stx2. Bien que les sous-unités Stx2 et Stx2e A aient une homologie déduite à 93% des acides aminés, les sous-unités B ne possèdent qu'une homologie déduite à 84% des acides aminés [50]. Il n'est donc pas surprenant que la spécificité de liaison au récepteur de Stx2e soit différente de celle d'autres membres de la famille Stx2. Un cinquième membre de la famille, Stx2f, a été décrit récemment à STEC, isolé de populations de pigeons sauvages, bien que l'on en sache peu sur cette variante [51].



## IV. Différents variants :

### 1. Toxines Stx 1 :

Elles représentent un groupe homogène et sont neutralisées par les anticorps dirigés contre la toxine de *S. dysenteriae* avec laquelle elles présentent 99 % d'homologie. Récemment, quelques variants du gène *stx1* ont été décrits : *stx1*, *stx1c* et *stx1d*.

Le variant *stx1* correspond à la séquence nucléotidique du gène *stx1* porte par le phage 933J de la souche de référence EDL 933 [52] et représente le variant de référence ou variant « sauvage ».

Le variant *stx1c*, tout d'abord mis en évidence chez des souches d'origine ovine et nommé *stx1OX3* a été retrouvé plus tardivement, chez des souches humaines et fut rebaptisé *stx1c* [81]. Chez l'homme, il est associé à des cas de diarrhées sans complication, ou bien n'entraîne aucun symptôme. Les pourcentages d'identité avec le gène *stx1* sont respectivement de 97 et 95 % pour les séquences des gènes *stxA* et *stxB*. Les protéines, quant à elles, ne diffèrent que de 9 et 3 acides aminés correspondant à 97,1 et 96,6 % d'homologie entre les sous-unités A et B respectivement. Koch et collaborateurs (2001) ont montré que l'opéron *stx1c* est fréquemment détecté dans les sérotypes O146 :H21 et O128 :H2 isolés chez les ovins et chez l'homme. Les ovins seraient probablement à l'origine de la transmission de ces germes à l'homme chez qui ils seraient responsables d'une forme bénigne de maladie [82]. Le variant *stx1d* [82] a été mis en évidence chez une souche d'origine bovine. Un séquençage des gènes a montré que les régions codant les sous-unités A et B possédait 93 et 92 % d'identité respectivement avec la séquence de référence *stx1*. Ce résultat correspond à une différence de 20 acides aminés pour la sous-unité A et de 7 acides aminés pour la sous-unité B. Les sites d'actions des deux sous-unités sont fortement conservés. Très ce variant sont disponibles.

### 2. Toxines Stx2 :

Elles constituent un groupe hétérogène, bien distinct de Stx1 et ne présentent que 56 % d'homologie avec la toxine Stx de *S. dysenteriae* type 1 [52]. Les souches productrices de Stx2 sont plus virulentes et ont été très souvent associées aux formes graves d'infections (SHU et TTP). Le variant *stx2* est l'opéron « sauvage » correspondant aux gènes de la

souche de référence EDL 933 qui porte le phage 933W [52]. Les variants *stx2* sont nombreux. Au moins 7 variants ont été identifiés à ce jour : *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*, et *stx2NV206* [55,56]. Les variants ont tout d'abord été mis en évidence sur la base de différences de leur activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs des toxines Stx. Ces différences sont majoritairement dues à des nucléotidiques des gènes *stx* modifiant donc légèrement la structure primaire de la toxine [57].

Les régions les plus conservées des toxines correspondent aux acides aminés impliqués dans le site enzymatique de la sous-unité A ou dans la liaison au récepteur Gb3 de la sous-unité B [33]. Les caractéristiques phénotypiques des souches possédant des variants expliquent pourquoi certaines souches sont associées à des hôtes spécifiques. Le caractère dangereux pour l'homme n'en est pas pour autant toujours absent, puisque par exemple des cas de diarrhées dus à une souche possédant le variant *stx2e*, ont été décrits [57].

Le premier variant décrit fut celui des STEC impliqués dans la maladie de l'œdème du porc. La toxine Stx2e diffère de Stx2 au niveau de la sous-unité A par un acide aminé en plus que Stx2 (94 % d'homologie) et deux acides aminés en moins pour la sous-unité B (79 % d'homologie) [50].

La protéine codée par le variant *stx2e* possède globalement la même structure que toutes les autres Shiga toxines, mais elle diffère de celles-ci par sa fixation préférentielle au récepteur Gb4 au lieu de Gb3 [58]. Les souches possédant ce variant sont donc peu pathogènes pour l'homme (qui possède le récepteur Gb3 sur ses cellules) et sont impliquées dans la maladie de l'œdème du porc (espèce possédant à la surface de ses cellules le récepteur Gb4).

Un deuxième variant (Stx2c) est de plus grande importance clinique et biologique chez l'homme. La toxine Stx2c diffère de la toxine Stx2 au niveau de la sous-unité B. Le groupe de variants Stx2c comporte deux sous variants : Stx2vh-a et Stx2vh-b. Ils ont été mis en évidence dans une même souche d'EHEC O91:H21 isolée d'un patient atteint d'un SHU [58]. Le gène *stx2vh-a* présente respectivement 98,6 % et 95,5 % d'identité avec les régions de *stx2* codant les sous-unités A et B. L'opéron *stx2vh-b* présente 99 % d'identité avec *stx2vh-a* sur la totalité de la séquence.

Le groupe de variant *stx2d* est constitué des sous-groupes *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111*. Ils ont été mis en évidence dans des souches humaines ou animales [57].

Les toxines Stx2d semblent moins pathogènes chez l'homme puisqu'elles sont le plus souvent associées à des souches isolées d'humains n'ayant pas développé de pathologies graves [55]. Le gène codant pour la sous-unité A de ces variants présente environ 95 % d'identité avec *stx2* contre 88 % seulement pour le gène *stx2B*. Les opérons *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111* présentent entre 96,6 et 99,9 % d'identité entre eux.

Le variant *stx2f* présente 70,6 % et 98 % d'identité respectivement avec les parties codant les sous-unités A et B du gène *stx2e*. Cependant, de récentes études ont montré que les souches possédant l'opéron *stx2f* ne sont retrouvées que dans des fèces de pigeons [51]. Ces animaux représenteraient donc le réservoir naturel de ces souches, mais il est encore difficile d'évaluer le danger lié à celles-ci pour l'homme. Une étude regroupant une importante collection de STEC a montré que le variant *stx2f* n'avait été retrouvé dans aucune des 626 souches étudiées, suggérant que les souches possédant *stx2f* ne sont que faiblement pathogènes pour l'homme [55]. Des études plus approfondies seraient donc nécessaires pour évaluer clairement ce risque.

Le variant *stx2g*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, présente des pourcentages d'identité compris entre 63 et 94,9 % avec les gènes précédemment décrits. La comparaison des séquences des opérons *stx2g* et *stx2* montre que la région la plus conservée correspond à celle codant la partie centrale de la sous-unité A [56]. La faible prévalence des souches possédant ce variant suggère qu'il s'agit certainement de souches émergentes encore peu répandues dans les élevages. Cependant, une forte homologie de séquence en acides aminés avec les toxines produites par des souches associées à des maladies humaines et une conservation des sites actifs de la protéine confèrent aux souches produisant la toxine Stx2g un caractère potentiellement pathogène pour l'homme [56]. D'autres études doivent être menées afin d'apprécier plus finement la virulence associée à ce variant.

La séquence nucléotidique de l'opéron du variant *stx2 NV206*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, a été comparée à celles des opérons connus et montre 94,5 à 99 % d'identité au niveau du gène *stx2A* et 81,5 à 96 % d'identité avec *stx2B*. Les séquences

protéiques présentent, quant à elles, respectivement 94 à 99 % et 87 à 98 % d'homologie pour les sous-unités A et B. À ce jour, aucune étude concernant la fréquence d'identification ou le pouvoir pathogène de ce variant n'a été menée [57].

Tous les variants ont les mêmes particularités génétiques que les gènes de référence, *stx1* et *stx2*. Il n'est donc pas rare, suite à l'insertion de plusieurs phages dans le chromosome bactérien, d'observer des souches possédant plusieurs variants. Les souches STEC peuvent produire une seule toxine (Stx1 ou Stx2), ou les deux Stx1 et Stx2 (souche EDL 933) ou encore deux toxines Stx2 différentes.

### **3. Stx1a par rapport à Stx2a :**

Stx1a est environ 10 fois plus cytotoxique pour les cellules Vero que Stx2a ; Cependant, l'inverse est vrai chez les souris : Stx1a est 100 à 400 fois moins mortelle pour les souris que Stx2a, même si les toxines présentent des activités enzymatiques équivalentes / ng de protéine *in vitro* [59]. Les données épidémiologiques sur les maladies humaines indiquent une association plus forte avec les maladies graves pour les souches de STEC produisant Stx2a par rapport à Stx1a seul [28]. Une question importante dans le domaine des STEC est donc de savoir comment expliquer le paradoxe de la toxicité indifférentielle des Stx *in vitro* par rapport à *in vivo*. Russo et al, ont récemment découvert que Stx2a est plus toxique que Stx1a par voie orale chez la souris, des données qui corroborent l'hypothèse selon laquelle Stx2a est plus puissant au niveau de l'intestin et pas seulement après une injection intrapéritoneale [60]. Une explication possible de la toxicité différentielle des toxines est que, contrairement aux cellules épithéliales telles que Vero, les cellules endothéliales ciblées dans le SHU sont plus sensibles à Stx2a qu'à Stx1a. Le laboratoire d'Obrig a constaté que les cellules endothéliales microvasculaires rénales obtenues à partir de glomérules humains étaient environ 1 000 fois plus sensibles à Stx2a qu'à Stx1a, bien que les cellules endothéliales de la veine ombilicale aient une sensibilité équivalente [61]. Étant donné que les Stx sont également actifs sur le plan enzymatique et qu'ils lient tous deux Gb3, la question reste de savoir pourquoi différents types de cellules présentent une sensibilité différentielle aux deux types de Stx. Cependant, Gb3 n'existe pas dans une population homogène à l'intérieur de la cellule et il se peut que les toxines ne se lient pas de manière équivalente à Gb3 dans les cellules cibles. Une étude *in*

in vitro avec des formes solubles du fragment trisaccharidique de Gb3 a montré que Stx1a et Stx2a se lient avec une affinité similaire pour ce composant du récepteur [62]. En outre, Stx1a et Stx2a présentent des affinités similaires pour le Gb3 dérivé du rein, mesurées par dosage immuno-absorbant lié à une enzyme, bien que, par chromatographie sur couche mince, Stx2a présente moins de liaison que Stx1a [28]. Les examens de l'interaction des toxines avec les trisaccharides immobilisés suggèrent que Stx1a a une plus grande affinité pour les glucides que Stx2a [63]. D'autres expériences portant sur la capacité des toxines à se lier aux analogues de Gb3 ont montré que Stx1a et Stx2a présentaient une liaison différentielle à ces analogues in vitro, mais l'existence d'analogues similaires ou fonctionnant fonctionnellement comme récepteurs in vivo n'a pas été démontrée.

Au niveau de la réponse immunitaire aux toxines, Stx1a et Stx2a induisent des réponses différentielles en chimiokines à partir de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et d'une lignée de cellules épithéliales tubulaires rénales, HK-2. Les cellules HK-2 sont plus sensibles à Stx1a qu'à Stx2a et le traitement par Stx2a induit l'expression des protéines chimioattractives des macrophages, protéine protéique inflammatoire macrophage-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) et MIP-1 $\beta$ . Cependant, dans un modèle d'intoxication par un babouin, il n'y avait pas de changement de MIP-1 $\beta$  en réponse à Stx1a ou à Stx2a [64]. Néanmoins, dans ce modèle de babouin, de nombreuses caractéristiques du SHU sont observées et Stx2a est mortel à des doses inférieures à Stx1a est, bien que la lésion rénale prenne plus de temps à se développer chez les animaux traités avec Stx2a.

Prises ensemble, ces études sur les différences entre Stx1a et Stx2a indiquent que l'interaction entre chaque toxine et le récepteur est complexe et influencée par plusieurs facteurs. Comme discuté ci-dessus, les structures cristallines Stx et Stx2a pouvant contribuer aux différences biologiques connues présentées par ces toxines sont les suivantes: (i) le site actif Stx est partiellement bloqué par la région N-terminale du peptide A2; (ii) le terminal Stx2a A2 C a une structure plus ordonnée que celle de Stx; (iii) le site de liaison à Gb3 2 a une conformation différente dans chacune des toxines; et (iv) le site de liaison à Gb3 3 est partiellement bloqué par le 2 aa C-terminal du peptide Stx2a A2[28].

## **4. Activité catalytique et cytotoxicité de Stx1 et Stx2 :**

### **4.1. Différence de cytotoxicité :**

Des études épidémiologiques suggèrent que la majorité des décès liés au SHU sont causés par des souches de *E. coli* O157 : H7 portant Stx2. Des études antérieures utilisant des toxines Shiga ont montré que si Stx2 est plus puissant dans les modèles animaux, Stx1 est plus toxique pour les cellules Vero [59, 65]. La dose létale à 50% pour Stx2 purifiée était 400 fois plus faible que pour Stx1 dans un modèle murin et seules les souris traitées à Stx2 ont développé des complications rénales et la mort [59]. Cependant, les modèles animaux ont des limites par rapport aux observations chez l'homme et ne reproduisent pas la maladie chez l'homme. Les modèles de primates non humains (Baboon) ont montré des lésions rénales compatibles avec le SHU lors de l'injection intraveineuse des toxines. Le traitement de primates non humains avec quatre doses de 25 ng / kg de Stx2 a provoqué un SHU, alors qu'une dose égale de Stx1 n'a eu aucun effet [65]. Dans une autre étude, la comparaison des effets des deux toxines a révélé des différences intéressantes, notamment des réponses pro-inflammatoires différentes et des durées différentes avec une lésion organique tardive après une provocation par Stx2 [63]. Les babouins traités avec Stx1 ont développé un SHU en l'espace de deux à trois jours, tandis que ceux atteints de Stx2 ont pris plus de temps (3 à 5 jours), indiquant le rôle d'autres facteurs dans la production d'une lésion rénale retardée lors d'une stimulation par Stx2. De plus, Stx1 a provoqué plus tôt une réponse pro-inflammatoire plus forte, tandis que la réponse pro-inflammatoire induite par Stx2 était progressive et retardée de plusieurs jours [63]. Une étude ultérieure utilisant des modèles de babouins a montré que Stx1 et Stx2 peuvent affecter la fonction rénale. Bien que Stx2 ait causé des dommages plus importants au rein que Stx1, les dommages infligés au rein par Stx1 étaient significatifs.

En comparaison avec des modèles animaux, des études sur des cellules Vero ont suggéré que la cytotoxicité de Stx1 était 10 fois supérieure à celle de Stx2 [59]. La base de la toxicité différentielle de Stx1 et Stx2 dans des lignées cellulaires de modèles animaux contre mammifères est inconnue. Les toxines Shiga déclenchent des lésions endothéliales des reins et du cerveau en ciblant le Gb3. Cependant, des différences ont été observées dans la sensibilité des cellules endothéliales à Stx1 et Stx2. Les connaissances actuelles sur les lésions

des cellules endothéliales causées par Stx1 et Stx2 sont passées en revue dans [66]. Stx2 avait une puissance plus élevée pour les cellules endothéliales microvasculaires rénales humaines (HRMEC) que pour les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC), où la toxicité de Stx1 et de Stx2 était similaire [61]. Ces résultats indiquent une sensibilité sélective des cellules endothéliales rénales à Stx2 bien que les cellules endothéliales rénales possèdent moins de sites de liaison au récepteur Gb3 pour Stx2 que pour Stx1 [61].

La distribution des récepteurs Stx dans les différentes populations de cellules rénales et la sensibilité des différents types de cellules rénales à Stx1 et Stx2 sont décrites dans [8]. La comparaison des lésions cellulaires induites par Stx1 et Stx2 dans les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau humain (HBMEC) et des cellules macrovasculaires endothéliales dérivées de HUVEC EA.hy 926 a montré que ces lignées cellulaires présentaient une sensibilité différente aux toxines. Cellules HBMEC étaient plus de 1000 fois plus sensibles à Stx 2, alors que les cellules EA.hy 926 étaient environ 10 fois plus sensibles à Stx1 [67]. Stx1 a provoqué à la fois une nécrose et une apoptose, tandis que Stx2 a principalement induit une apoptose dans les deux lignées cellulaires [67]. La base de la sensibilité différentielle des cellules endothéliales à Stx1 et Stx2 n'est pas bien comprise. La stabilité des holotoxines, l'activité enzymatique et l'affinité des récepteurs ont été proposées comme facteurs potentiels contribuant à la toxicité différentielle. De plus, les comparaisons de cytotoxicité entre Stx1 et Stx2 chez les animaux et les cellules dépendent de manière critique des lots spécifiques de toxine utilisés et peuvent varier en conséquence.

On a émis l'hypothèse que les sous-unités B de Stx1 et Stx2 joueraient un rôle important dans la médiation des différences de puissance. Les sous-unités B de Stx1 et Stx2 présentent des différences dans la reconnaissance des récepteurs, ainsi que dans le nombre de sites de liaison potentiels [66]. Des études sur des cellules Vero ont montré que Stx1 avait une plus grande affinité pour le récepteur Gb3 [59, 63]. En utilisant du Gb3 purifié, il a été montré que Stx1 avait une affinité 10 fois plus élevée pour le Gb3 par rapport à Stx2 [63]. Il a été suggéré que Stx1 pourrait se lier aux variants Gb3 dans le poumon, l'empêchant d'atteindre les organes les plus sensibles, tels que les reins, alors que Stx2 se lie préférentiellement aux variants Gb3 dans les reins. En conséquence, Stx1 présente une diminution de la liaison aux cellules rénales, qui sont les principales cibles de la létalité chez la souris. L'analyse de la cinétique de liaison à l'analogie du récepteur glycolipidique par résonance plasmonique de surface (SPR) a

montré que Stx1 se liait mieux à l'analogue du récepteur que Stx2 et présentait des vitesses d'association et de dissociation plus rapides. Ces résultats suggèrent que les différences de cinétique de liaison et d'affinité des sous-unités B pour le récepteur Gb3 pourraient être responsables de la plus grande toxicité de Stx1 pour les cellules Vero [66].

Les sous-unités B de Stx1 et Stx2 présentent également des différences de stabilité structurelle [68]. Le pentamère B de Stx1 était plus stable que le pentamère B de Stx2 et liait le récepteur avec une affinité supérieure à celle du pentamère B de Stx2 [68]. De plus, alors que les sous-unités Stx1B étaient capables de se lier aux glycolipides uniquement sous forme de pentamère stable, les sous-unités Stx2B étaient liées aux glycolipides dans les états oligomères inférieurs [68]. Ces résultats suggèrent que les différences d'affinité et de préférences de liaison au récepteur pourraient contribuer à toxicité différentielle de Stx1 et Stx2 en affectant leur ciblage sur les tissus sensibles.

Des chimères des sous-unités Stx A / B, dans lesquelles les sous-unités A et B des deux toxines ont été interchangeées, ont été utilisées pour étudier la contribution des sous-unités A et B individuelles à la toxicité [63]. L'holotoxine ainsi que les toxines chimériques ont été utilisées dans des cellules de souris et dans des cellules Vero pour différencier les rôles des sous-unités dans la toxicité [59,63]. Cependant, les toxines chimériques se sont généralement avérées moins stables que les holotoxines en raison d'un repliement incorrect [63] ou ont présenté une cytotoxicité équivalente. Les toxines chimériques, créées par les fusions d'opéron, ont présenté une cytotoxicité intermédiaire entre Stx1 et Stx2 ou n'ont pas produit de chimère fonctionnelle. Par conséquent, ces études ne permettent pas de tirer des conclusions claires sur le rôle de chaque sous-unité dans la toxicité. Une étude récente a utilisé la sous-unité A2 en même temps que la sous-unité B pour augmenter la stabilité de la toxine chimérique [66]. La liaison des toxines chimériques au récepteur Gb3 et leur translocation à travers les monocouches des cellules HCT-8 polarisées dépendaient de l'origine de la sous-unité B, et la toxine chimérique avec la sous-unité Stx1B avait une affinité pour le récepteur supérieure à celle du récepteur.

Chimère Stx2B. La toxicité des toxines chimériques vis-à-vis des cellules Vero et HCT-8 a montré l'importance de l'origine de la sous-unité B bien que celle-ci représente moins de 50% de la toxicité différentielle pour les cellules Vero. Peut-être, en raison de l'instabilité des

toxines chimériques à pH 3, l'administration orale de la toxine chimérique lorsque la sous-unité A provenait de Stx1 chez la souris nécessitait au moins 10 fois plus de toxine par rapport à la Stx2 native, tandis que Stx1 ou la toxine chimérique la sous-unité A de Stx2 n'a montré aucune mortalité chez les souris, même à une concentration très élevée. Cette étude a mis en évidence l'importance de la sous-unité B dans la toxicité différentielle de Stx1 et 2. La létalité différentielle chez la souris aurait eu lieu au niveau de la toxicité pour le rein [66]. Cependant, bien que les résultats *in vivo* indiquent que les sous-unités B sont impliquées dans les différences de sévérité de l'intoxication, elles n'excluent pas un rôle potentiel des sous-unités A dans la toxicité différentielle de Stx1 et Stx2. La question critique de savoir pourquoi Stx2 est plus puissant que Stx1 *in vivo* reste toujours sans réponse.

#### **4.2. Différence dans l'activité catalytique :**

Les sous-unités A des toxines Shiga et de la ricine jouent un rôle essentiel dans la toxicité de chaque toxine. Ils ont la même activité catalytique et montrent une conservation en acides aminés sur le site actif. Les études de mutagenèse ont identifié Glu167, Arg170, Tyr77, Tyr114, Trp203 et Arg205, qui sont critiques pour l'activité catalytique et sont conservés entre Stx1 et Stx2 [66]. Les connaissances actuelles sur le mode d'action des sous-unités A sont obtenues d'études sur des lignées cellulaires en culture ou des systèmes *in vitro*. Les études *in vivo* au niveau moléculaire ou au niveau de l'organisme entier sont limitées en raison de l'extrême cytotoxicité de ces toxines et le manque de systèmes modèles disponibles. En utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle, nous avons identifié les acides aminés essentiels à la cytotoxicité de Stx1A et de Stx2A et avons montré que l'activité des sous-unités A pouvait être différenciée [69]. Les résultats ont montré que Asn75 et Tyr77 étaient plus critiques pour l'activité de dépurination de Stx2A, tandis que Arg176 était plus critique pour l'activité de dépurination de Stx1A. L'analyse des surfaces accessibles aux solvants a montré qu'Asn75 et Tyr77 étaient davantage exposés dans Stx2A, alors que Arg176 était davantage exposée dans Stx1A [69]. Arg176 s'est par la suite avéré être essentiel pour la liaison de Stx1A1 au ribosome, suggérant qu'il pourrait y avoir des différences dans la liaison de ribosome de Stx1A1 à Stx2A1. Plusieurs études ont utilisé des tests d'inhibition de la traduction sans cellules pour comparer l'activité enzymatique des sous-unités A de Stx1 et Stx2 [59, 65]. Les sous-unités A présentaient des activités inhibitrices de la traduction

similaires [59, 63], ce qui a permis de conclure que les activités enzymatiques des sous-unités A ne sont pas responsables des différences de toxicité entre Stx1 et Stx2. En conséquence, le rôle de la sous-unité A dans la puissance différentielle de Stx1 et Stx2 n'a pas fait l'objet de beaucoup d'attention. L'inhibition de la traduction étant un effet aval de la dépurination, ces analyses ne comparaient pas directement l'activité catalytique de Stx1A1 et de Stx2A1 sur le ribosome. De plus, alors que certaines études utilisaient l'holotoxine [59], dans d'autres, l'holotoxine était activée par digestion à la trypsine pour libérer la chaîne A1 du complexe A2-B5 et / ou par traitement chimique au DTT pour rompre la liaison disulfure A1 et les chaînes A2 [65]. Ces méthodes donnent souvent des quantités variables de protéines activées et peuvent causer dégradation, empêchant la comparaison de l'activité enzymatique directement [66]. Par conséquent, en raison de limitations techniques, le rôle de la sous-unité A1 dans l'augmentation de la puissance de Stx2 n'a pas été complètement étudié et une comparaison directe de l'activité catalytique n'a pas été réalisée. Les questions sans réponse concernant l'activité catalytique relative des RIP soulignent l'importance des dosages quantitatifs, qui permettent des comparaisons directes de l'activité de dépurination. Notre groupe a développé un dosage PCR en temps réel quantitatif (qRT-PCR) permettant de mesurer directement l'activité catalytique des RIP sur des ribosomes *in vitro* ou dans des cellules de levure et de mammifère *in vivo* [70]. Le test qRT-PCR présentait une plage dynamique beaucoup plus large que le test d'extension utilisé précédemment et une sensibilité accrue [70]. Sturm et Schramm ont décrit un essai quantitatif de luminescence couplé à une enzyme afin d'examiner la cinétique de dépurination par les RIP [71]. Dans cet essai, l'adénine libérée par dépurination est convertie en AMP par l'adénine phosphoribosyl transférase (APRTase), puis en ATP par l'orthophosphate dikinase de pyruvate (PPDK). La lumière générée par l'ATP via la luciférase de luciole est détectée à l'aide d'un luminomètre [71]. Le qRT-PCR et le test de luminescence couplé à une enzyme ont été utilisés pour examiner l'activité de la chaîne A de la toxine de la ricine (RTA) et de ses mutants. Notre groupe a mis au point un dosage hautement sensible et quantitatif utilisant la RPS afin d'examiner les interactions RIP avec les ribosomes. Le développement de ces tests permettra de comparer directement les cinétiques de liaison et de dépurination des sous-unités A1 des toxines Shiga et aidera à déterminer si les sous-unités A1 de Stx1 et Stx2 jouent un rôle important dans leur toxicité différentielle.



# Mécanismes d'action

## **V. Mécanismes d'action :**

La toxicité des toxines de Shiga est exercée par l'inactivation catalytique de la sous-unité ribosomale 60S, inhibant ainsi efficacement la synthèse des protéines dans les cellules cibles. Plus précisément, les toxines Shiga présentent une activité spécifique de l'ARN N-glycosidase qui élimine une adénosine particulière de la région 30 de l'ARNr 28S. Pour atteindre cette cible cytoplasmique, il a été démontré que la toxine Shiga était transportée de manière rétrograde vers le réseau trans-Golgi, l'appareil de Golgi et le RE après endocytose ; contournant la voie endocyttaire tardive. À partir du RE, le fragment toxique est translocée au cytoplasme, où il est capable d'inactiver les ribosomes. Outre le blocage de la synthèse des protéines, un effet à long terme de la toxine sur plusieurs types de cellules est l'induction de l'apoptose [8].

### **1. Liaison de stx aux membranes cellulaires**

Tous les membres de la famille des toxines Shiga, à l'exception de Stx2e, se lient à la partie oligosaccharide du glycosphingolipide Gb3, avec la structure G ((1-4) Gal (1-4) GlcCer. Stx2e se lie à Gb4 et est produit par des bactéries qui infectent principalement les porcs. Bien que Stx2 soit le plus souvent associé à une maladie humaine, il a été démontré que dans la plupart des cas, Stx1 se liait plus fortement que Stx2 à Gb3 [72]. Lorsque la structure cristalline de Stx2 et de Stx est comparée, certaines différences peuvent influencer la capacité des toxines à interagir avec les cellules humaines et à provoquer une maladie [38]. Contrairement à Stx, le site actif du fragment A-Stx2 est accessible dans l'holotoxine, l'orientation de la chaîne A par rapport au pentamère B diffère dans les deux toxines et l'un des trois sites de liaison Gb3 dans le récepteur Stx2. La chaîne B a une conformation différente de celle de la chaîne B Stx.

Bien que la toxine se lie à la partie oligosaccharide de Gb3, il est connu que la structure de la partie lipide du récepteur est également importante pour la liaison à la toxine, très probablement en modifiant la présentation de la partie oligosaccharide. L'hydroxylation, le degré d'insaturation de l'acide gras et la longueur de la chaîne d'acide gras sont des facteurs importants pour une liaison optimale de la toxine [73,74]. L'importance de la longueur de la

chaîne d'acide gras de Gb3 pour la liaison de la toxine de type Shiga s'est récemment révélée être différente pour Stx1 et Stx2 [75]. Dans le système membranaire, Stx1 s'est lié sélectivement aux espèces Gb3 en C16, C22 et C24, mais pas aux espèces en C18 ou C20. Sans contraste, Stx2 lié à toutes les isoformes de Gb3, quelle que soit la longueur de la chaîne.

Chez l'homme, l'expression de Gb3 est limitée à certains types de cellules et est principalement observée dans l'épithélium et l'endothélium rénaux, les cellules endothéliales microvasculaires dans la lamina propria intestinale, les plaquettes et dans des sous-ensembles de lymphocytes B centraux germinaux. Gb3 est également exprimé sur les cellules endothéliales et ganglionnaires de la racine dorsale du système nerveux périphérique et sur les cellules endothéliales et les neurones du système nerveux central. Bien que l'expression de Gb3 à la surface des cellules soit une condition préalable à la sensibilité à la toxine de Shiga, elle n'est pas suffisante en elle-même, car la toxicité nécessite généralement un transport rétrograde efficace de la toxine [8].

La structure de Gb3 n'est pas le seul paramètre qui affecte la liaison de la toxine Shiga ; l'environnement de la membrane locale entourant Gb3, tel que la teneur en phospholipides et en cholestérol de la membrane est également importante [74,76]. La densité de Gb3 dans la membrane semble également affecter la liaison à la toxine de Shiga, car il a été récemment découvert que les cellules Vero mutantes avec une densité inférieure de Gb3 étaient impossibles à lier Stx1. Notamment, au moins dans les cellules HeLa, la liaison de la toxine semble induire le recrutement du complexe toxine / récepteur dans des microdomaines lipidiques, ou radeaux, dans la membrane plasmique [73] et il a été rapporté que cette localisation était importante pour un trafic rétrograde correct et une toxicité (voir ci-dessous). Récemment, il a été démontré que Stx1 et Stx2 (également appelées vérotoxines 1 et 2) étaient localisés à la fois sur des microdomaines partagés et distincts situés à la surface des cellules et que Stx1 était plus résistant à l'extraction au détergent que Stx2, à la surface des cellules et pendant le transport intracellulaire [76]. À partir de cela, il semble que les homologues de la toxine lient différents assemblages lipidiques Gb3. De plus, lors de leur transport rétrograde, la localisation, ainsi que la cinétique de leur transport rétrograde étaient différentes [76]. Ces facteurs pourraient contribuer aux effets différentiels sur les cellules cibles que ces toxines présentent.

Fait intéressant, il a été démontré que Stx se liant rapidement active plusieurs kinases, telles que les Src kinases Yes, et Lyn, la tyrosine kinase Syk, la sérine / thréonine kinase PKC, et la MAP kinase. p38, L'activité de certaines de ces kinases est importante pour l'entrée dans Stx et le transport intracellulaire, ce qui suggère que Stx est capable d'induire son propre transport [73].

## **2. Endocytose :**

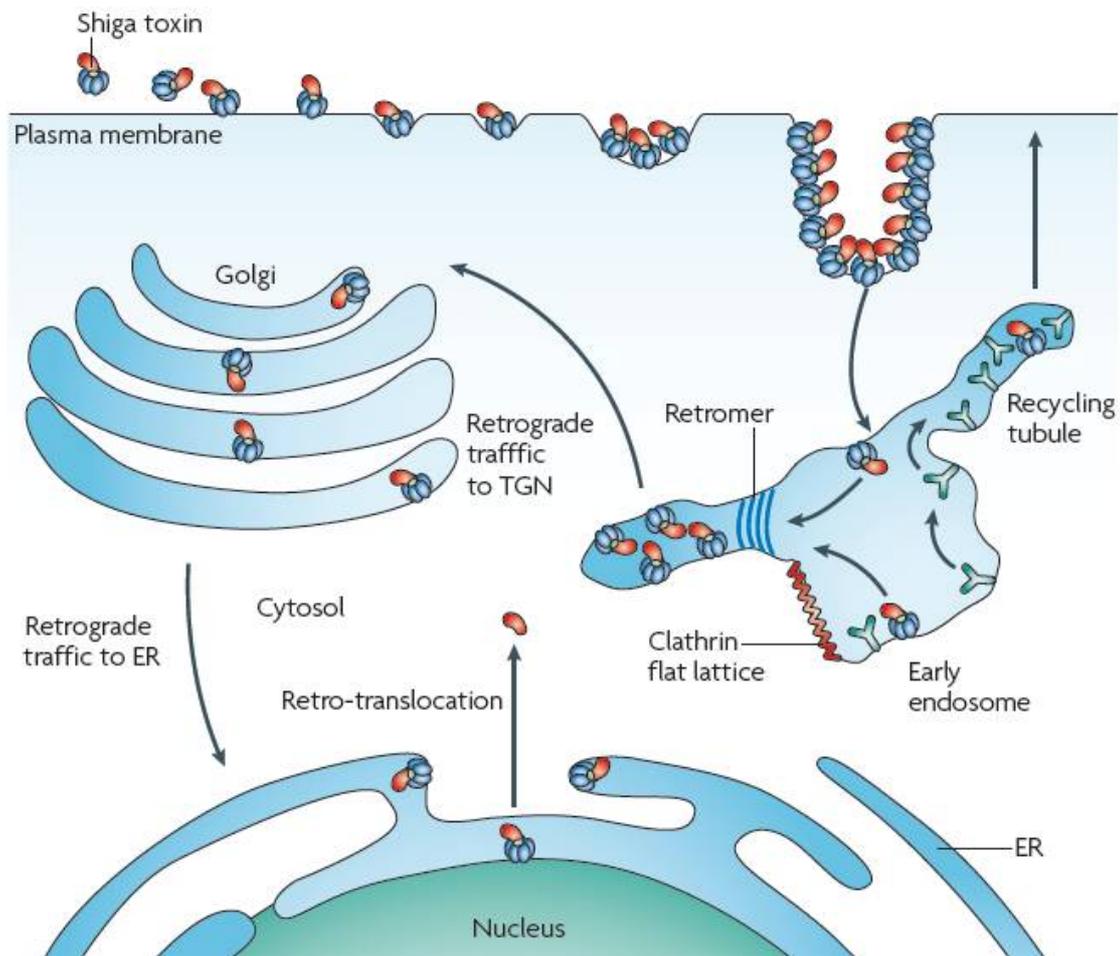
Suite à la liaison aux molécules du récepteur Gb3 au niveau de la membrane plasmique, la toxine Shiga et les autres membres de la famille sont internalisés dans les cellules cibles par endocytose (figure 7). La toxine Shiga a été trouvée dans des fosses recouvertes de clathrine<sup>56</sup>. Cependant, lorsque l'endocytose dépendante de la clathrine est inhibée, la toxine de Shiga est toujours absorbée efficacement [77], ce qui montre que la voie de la clathrine n'est pas nécessaire pour les étapes initiales de l'entrée de la toxine dans la cellule. En effet, la toxine Shiga peut induire des invaginations de la membrane plasmique endocytique sans l'aide de la machinerie cytosolique [78]. Dans ce cas la flexion membranaire résulte du regroupement, dirigé par la toxine, de molécules de récepteur des glycosphingolipides (figure 7), représentant un nouveau mécanisme de génération de courbure dans les membranes biologiques. Les invaginations induites par la toxine sont ensuite traitées par une machinerie cellulaire associant dynamine, actine et cholestérol des membranes plasmiques.

## **3. Transport retrograde :**

Après son entrée dans la cellule, les toxines Shiga se localisent dans les endosomes précoces. Dans une étude pionnière, Sandvig et van Deurs ont découvert que la toxine Shiga pourrait être éventuellement détectée dans les membranes du réticulum endoplasmique (RE), suggérant fortement que la toxine traite de manière rétrograde par la voie de la sécrétion (figure 7). Il a été démontré par la suite que la toxine Shiga peut contourner la voie endocytique tardive pour être transférée directement des endosomes précoces et recyclants au réseau trans-golgien (TGn) et, de là, au RE. Ce trafic semble être différent de la boucle de recyclage identifiée précédemment pour les récepteurs du mannose-6-phosphate, qui sont des protéines cargoshuttlantes dont le cycle a été démontré entre les endosomes tardifs et le TGn.

Il a ensuite été constaté que la voie de trafic rétrograde qui relie la voie endocytique précoce au TGn est également utilisée par plusieurs protéines cellulaires ayant diverses fonctions allant de la signalisation cellulaire au transport du glucose en passant par le trafic de morphogène et le remodelage tissulaire [79].

Les mécanismes par lesquels les toxines de Shiga s'échappent de la voie endocytique précoce ont fait l'objet d'études approfondies. La clathrine [79] et le rétromère revêtent une importance cruciale. La clathrine est une protéine organisatrice nanodomaine ayant des fonctions bien établies dans la génération de la courbure membranaire. La clathrine est recrutée dans les endosomes par une multitude de protéines, notamment la protéine de liaison au phosphatidylinositol-4-phosphate (Epsin-related protein) (EpsinR), pour laquelle un rôle dans le transport rétrograde a été démontré<sup>59</sup>. Retromer est composé d'une sous-unité de reconnaissance de courbure de deux nexins de tri (une combinaison de SnX1, SnX2, SnX5 et SnX6) et d'une sous-unité de reconnaissance de cargaison composée de trois protéines associées au tri des protéines vacuolaires, VPS26, VPS29 et VPS35 [80]. Il reste à établir comment la clathrine et le rétromère entraînent la formation d'intermédiaires de transport rétrogrades sur les endosomes précoces. Des preuves récentes suggèrent que les deux protéines pourraient fonctionner de manière séquentielle (figure 7). Selon ce modèle, la clathrine est nécessaire pour la génération de la courbure initiale de la membrane sur les endosomes précoces [173].



**Figure 7 : Trafic de toxine Shiga [173].**

La cargaison utilise des adaptateurs en clathrine et la sous-unité de reconnaissance de cargaison de retromer pour se localiser sur les sites de formation de transport intermédiaire. Les tubules rétrogrades naissants sont ensuite traités par scission en intermédiaires de transport rétrogrades, impliquant probablement aussi le rétromère dans un processus actuellement mal défini. Une discussion détaillée de ce modèle est disponible dans [79].

Comment les toxines Shiga, qui se lient au glycolipide Gb3 dans la foliole de la membrane exoplasmique, communiquent-elles avec le mécanisme de tri cytosolique et pourquoi leur trafic dépend-il de la clathrine dans les premiers endosomes, mais pas au niveau de la membrane plasmique. Le premier point peut être lié à la découverte que les toxines de Shiga induisent un réarrangement des membranes [78] et s'associent à des environnements membranaires formant des complexes insolubles dans les détergents après la lyse des cellules [82]. Ce comportement de fractionnement a été corrélé avec un tri rétrograde efficace dans les cellules HeLa et l'absence de domaines insolubles dans les détergents a été corrélée avec un tri rétrograde inefficace dans les macrophages dérivés de monocytes humains et les cellules dendritiques totalement résistantes aux toxines [82]. Des modifications induites par les toxines dans la répartition des lipides dans la foliole exoplasmique peuvent entraîner une nanocompartimentation similaire au niveau de la foliole cytoplasmique et favoriser le recrutement de machines de tri.

L'exigence de clathrine sur les endosomes mais pas sur la membrane plasmique peut constituer les deux faces d'une même pièce : bien que la toxine induise une courbure au niveau de la membrane plasmique par la formation dynamique de grappes [78], la toxine peut se localiser préférentiellement par rapport à l'environnement incurvé des endosomes précoces, conduisant à un tri fondé sur la géométrie. Les toxines de Shiga sont transportées du TGn de manière indépendante du complexe protéique du manteau I (COPI) via l'appareil de Golgi vers l'ER [81]. Les mécanismes exacts qui sous-tendent cette étape du trafic restent encore largement inexplorés.

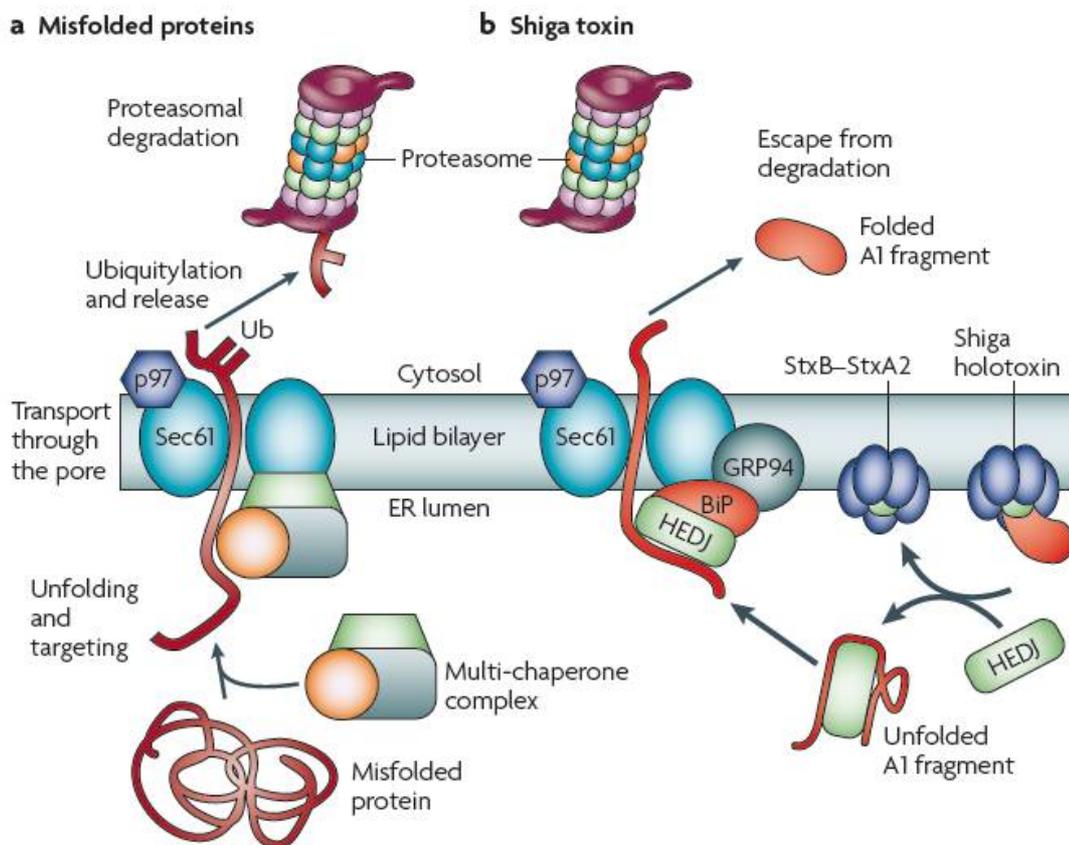
#### **4. Retro-translocation**

Les toxines Shiga n'induisent pas la formation de pores. Au lieu de cela, elles reposent sur la machinerie cellulaire de l'hôte pour transloquer la sous-unité A catalytique à travers les membranes cellulaires et accéder au cytosol. Les mécanismes par lesquels cela se produit commencent à être compris. Au début du processus d'entrée (probablement au stade des premiers endosomes), une boucle sensible à la protéase (résidus 242 à 261) située dans la région C-terminale de StxA est clivée par l'endoprotéase furine associée à la membrane au site Arg251-met252, division de StxA en fragment A1 catalytique (constitué des résidus 1 à

251 ; 27,5 kDa) et un fragment A2 associé à StxB (constitué des résidus 252 à 293 ; 4,5 kDa) [18]. Le fragment A1 reste lié au complexe StxA2 – StxB en raison d'une liaison disulfure entre Cys242 dans StxA1 et Cys261 dans StxA2 [18,83]. Cette liaison disulfure est finalement réduite dans la lumière ER, libérant le fragment enzymatique A1, qui est ensuite transféré au cytosol.

Les toxines de Shiga ont été co-immunoprécipitées avec des chaperones de RE et des composants du translocon, ce qui suggère que les toxines utilisent la voie de dégradation de la protéine associée à l'RE (ERAD) cellulaire. En effet, les toxines Shiga interagissent avec les protéines HEDJ (également connues sous les noms de ERdj3 et DnAJB11), BiP et une protéine régulée par le glucose de 94 kDa (GRP94) dans de grands complexes multi-chaperons pré-associés avant leur transport à travers la membrane RE [81] , des études d'immunoprécipitation ont démontré que de grandes quantités de toxine Shiga associée à HEDJ interagissent avec l'unité centrale de la membrane intégrale Sec61 du translocon[84]. Il a été suggéré que HEDJ et ses partenaires interagissent recrutent des protéines mal repliées dans le translocon Sec61 et que les toxines Shiga exploitent ce mécanisme pour leur propre transport à travers la membrane de l'RE [84] (Figure 8).

La translocation membranaire semble être l'étape limitante de l'intoxication des cellules par les toxines de Shiga. La plupart des cellules StxA associées aux cellules sont clivées mais restent liées des cellules StxA associées aux cellules sont clivées mais restent liées à StxB, car la liaison disulfure entre les fragments A1 et A2 ne peut pas être réduite. Seule une petite fraction (4%) de StxA semble être transloquée vers le cytosol, constituée de fragments A1 clivés, réduits et séparés par StxB.L'interaction du fragment A1 avec la machinerie ERAD ne semble pas impliquer une séquence d'exportation spécifique, mais plutôt repose sur un élément structural dégénéré, tel qu'une séquence hydrophobe dans sa région C-terminale. Il reste à déterminer si une telle séquence interagit directement avec la bicouche lipidique pour induire des changements de conformation qui sont ensuite reconnus par la machinerie ERAD, comme cela a été suggéré pour d'autres protéines toxines [81].



**Figure 8 : Voie de dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique [173]**

Contrairement aux protéines endogènes mal repliées, le fragment A1 des toxines de Shiga doit éviter le protéasome jusqu'à ce qu'il atteigne son substrat dans le cytosol. Il est très probable que le fragment A1 soit protégé de la dégradation du cytosol par son absence de résidus de lysine, ainsi que par sa capacité à se replier rapidement. La lactacystine, un inhibiteur du protéasome, augmente la quantité de fragment A1 cytosolique de 30% et augmente la cytotoxicité de 50%, ce qui suggère qu'une fraction du fragment A1 transloqué peut être dégradée par la machinerie du protéasome, comme décrit pour la ricine et la toxine cholérique [81,173].

## 5. Apoptose :

En plus d'inhiber la synthèse des protéines, les toxines de Shiga sont connues pour induire une mort cellulaire programmée, ou apoptose, dans de nombreux types de cellules [85]. L'apoptose est caractérisée par de multiples changements morphologiques cellulaires, tels que le saignement, le rétrécissement cellulaire, la condensation des chromosomes et la fragmentation de l'ADN, et est médiée par l'activation de cascades de caspase. Dans la plupart des types de cellules, l'induction de l'apoptose nécessite le transport des toxines de Shiga enzymatiquement actives vers le RE et semble être liée à l'activation de la réponse au stress ribotoxique ou à l'induction de l'EPU (réponse protéique dépliée).

La réponse au stress ribotoxique fait référence à l'activation des voies MAPK à la suite d'une lésion ribosomale. Il a été démontré que les toxines Shiga activent les trois cascades MAPK ; la voie JNK (c-Jun Nterminal), la voie p38 MAPK et la voie ERK (kinase régulée par le signal extracellulaire), mais l'ampleur de l'activation des différentes voies semble différer selon les lignées cellulaires [8]. Le lien entre le stress ribosomal induit par la toxine Shiga et l'apoptose a été démontré dans la lignée de cellules épithéliales humaines HCT-8, où la toxine Shiga 1 catalytiquement active, mais non un mutant enzymatiquement inactif, s'est avérée provoquer l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN [86]. La toxine Shiga 1 a également activé les voies MAPK de JNK et p38, et l'inhibition pharmacologique de la signalisation de MAPK p38 a partiellement protégé les cellules de l'apoptose. Similairement, l'inhibition pharmacologique ou l'inhibition par le siRNA du MAP3K ZAK (zipper sterile- a-motif kinase) a partiellement protégé les cellules HCT-8 et Vero de l'apoptose en bloquant l'activation des voies MAPK médiée par la toxine Shiga [87]. L'inhibition de ZAK a empêché l'activation de la caspase-3 médiée par la toxine Shiga 2, mais pas la fragmentation de l'ADN, ce qui suggère que les toxines Shiga pourraient utiliser plusieurs voies de signalisation pour induire des événements apoptotiques.

Dans certains types de cellules, le stress ribotoxique induit par la toxine Shiga induit également l'expression et la libération de diverses cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  (tumeur nécrotique factor), le GM-CSF (facteur stimulant la formation de colonies de macrophages et de granulocytes) et l'IL-1, IL-6 et IL-8. Ces cytokines sécrétées peuvent ensuite réguler positivement l'expression du récepteur Gb3 de la toxine Shiga dans d'autres types de cellules, les sensibilisant ainsi à la toxine [8].

Il a également été démontré que les toxines de Shiga induisent l'apoptose via l'UPR (réponse protéique non repliée). L'UPR fait partie du mécanisme de contrôle de la qualité des RE, garantissant que les protéines sont correctement repliées avant d'être exportées hors des RE. L'UPR est médiée par les trois protéines transmembranaires localisées dans l'RE (trois protéines transmembranaires de l'ARN dépendantes de l'ARN), PERK (RE kinase-like kinase-like), IRE-1 (RE nécessitant un inositol, signal kinase-1) et ATF6 (facteur de transcription activant 6), qui agissent en tant que capteurs pour les protéines non pliées et les niveaux de RE Ca<sup>2+</sup>. Lors de l'accumulation de protéines non pliées ou mal traitées dans le RE, ces molécules de capteur sont activées, ce qui entraîne une atténuation transitoire de la synthèse protéique couplée à une expression régulée des chaperons impliqués dans le repliement des protéines et des protéines associées à ERAD. Si les contre-mesures induites par l'UPR ne suffisent pas à restaurer le traitement correct des protéines, une signalisation UPR prolongée peut induire une apoptose [88]. On a proposé que les toxines Shiga activent l'UPR à la suite du déploiement transitoire du fragment de la toxine Shiga A1 au cours de la rétrotranslocation, en conséquence de l'accumulation de protéines tronquées due à l'inhibition de la synthèse protéique ou à des altérations de la RE Ca<sup>2+</sup> induites par la toxine. -homéostasie [89]. On a montré que le traitement 1 de la toxine Shiga des cellules THP-1 non différenciées activait les trois capteurs de stress RE, entraînant une expression accrue, entre autres, du facteur de transcription CHOP (protéine homologue C / EBP), qui régule à la hausse l'expression de DR5 (récepteur de mort 5) et TRAIL (ligand induisant l'apoptose liée au facteur de nécrose tumorale) et régule à la baisse l'expression du régulateur anti-apoptotique Bcl-2 (lymphome à cellules B 2) [89]. Bien qu'un mutant enzymatiquement inactif de la toxine Shiga 1 ou du fragment B de la toxine Shiga 1 puisse activer le chemin IRE-1, la toxine Shiga 1 fonctionnelle était nécessaire pour maintenir la signalisation UPR susceptible d'induire une apoptose. Il convient également de noter que les toxines Shiga 1 et 2 semblent activer les voies du capteur de stress ER à différents degrés dans les cellules HK-2. La contrainte RE provoquée par la toxine Shiga 1 a également libéré Ca<sup>2+</sup> des magasins RE dans les cellules THP-1, entraînant l'activation de la cystéine protéase calpaïne dépendante de Ca<sup>2+</sup>, qui a déclenché l'apoptose en clivant la caspase initiateur, la procaspase-8 [89]. Dans d'autres types de cellules, l'apoptose induite par la toxine Shiga est également associée à

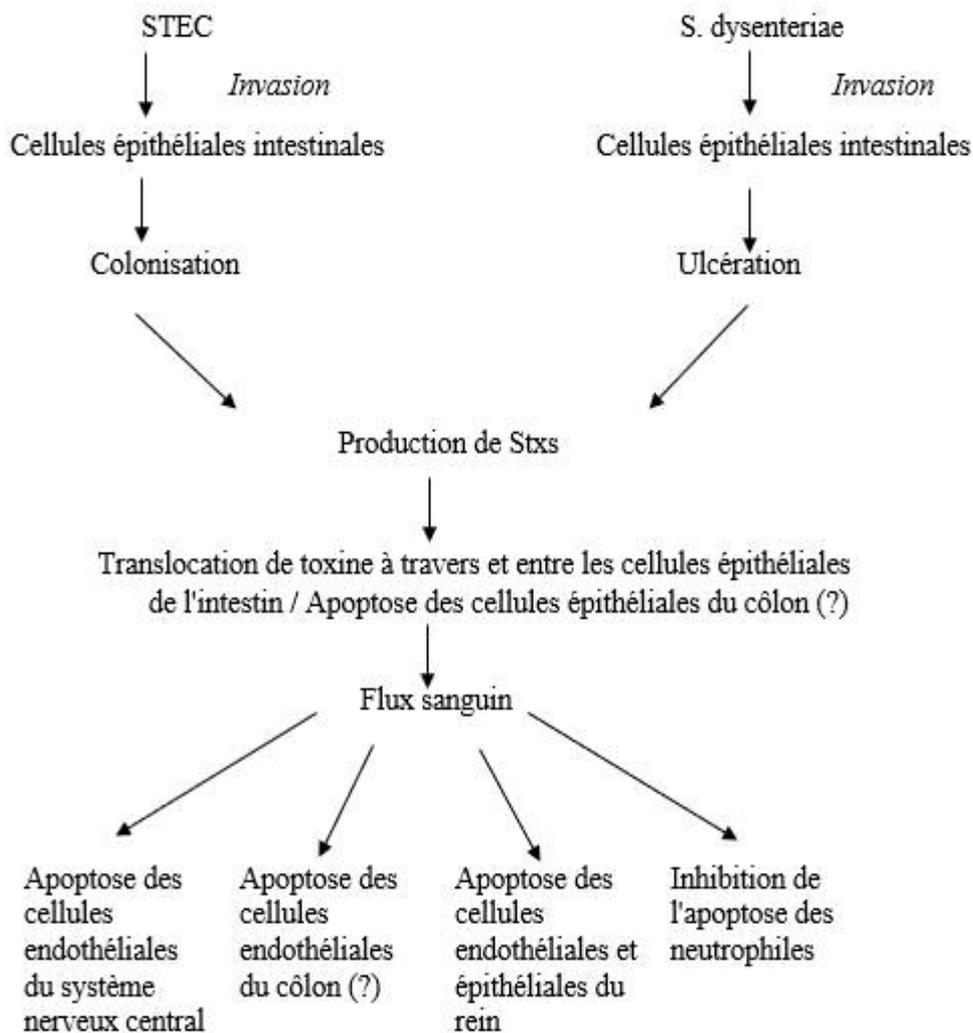
l'activation de la caspase et à une altération de l'expression ou de la dégradation d'un certain nombre de protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques, telles que l'inhibiteur de la caspase 9 XIAP (inhibiteur lié à l'X de la protéine d'apoptose), la protéine anti-apoptotique FLIP (protéine inhibitrice de type FLICE) et plusieurs membres de la famille Bcl-2.

Dans la plupart des types de cellules, le transport de toxines actives enzymatiquement vers le RE est une condition préalable à la signalisation apoptotique, mais dans la lignée cellulaire Ramos de Burkitt, la lignée de toxines de Shiga purifiée 1 B a pu induire l'apoptose. Un phénotype similaire a été obtenu avec des anticorps anti-Gb 3 Ce qui suggère que la signalisation apoptotique a été causée par le recouplement de Gb 3 plutôt que par le stress RE [8].

### **5.1 Shiga-toxines et apoptose :**

De nombreuses études ont examiné le mécanisme de la mort cellulaire induite par les Stx purifiés. Les cellules ou lignées cellulaires cultivées utilisées dans ces études comprennent les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les lignées cellulaires de lymphome B, les cellules d'astrocytome, les lignées cellulaires monocytaires, les neutrophiles et les lignées cellulaires amniotiques. Ces types de cellules répondent différemment aux Stx. Par exemple, les cellules T84, une lignée de cellules épithéliales intestinales humaines, sont dépourvues des récepteurs glycolipidiques de la toxine et ne sont pas tuées *in vitro* par Stx, mais sont capables de translocer la toxine des surfaces apicale à basolatérale [90]. Les cellules épithéliales intestinales des cryptes bovines, en revanche, expriment le Gb3 mais échappent à la destruction en acheminant les toxines vers les lysosomes plutôt que vers le RE. Il a été démontré que Puri  $\phi$  ed Stx2 inhibe la mort cellulaire des neutrophiles, cellules qui subissent normalement une apoptose spontanée, ce qui suggère que les toxines peuvent augmenter la durée de vie des cellules capables de médier des lésions vasculaires étendues [91]. Les Stx ne peuvent pas induire l'apoptose dans tous les types de cellules, il existe de nombreuses preuves suggérant que l'apoptose est essentielle dans le développement de lésions vasculaires et de lésions tissulaires après la translocation des toxines dans le sang. Sur la base de la littérature actuellement disponible, un modèle de progression de la maladie est présenté à la Figure9.

Contrairement aux études utilisant les cellules T84, Smith et al. [86] ont traité la lignée de cellules épithéliales intestinales humaines, HCT8, avec Stx1 et démontré l'activation des cascades de kinases activées, JNK / SAPK et p38, et l'activation de la caspase 3 conduisant à l'apoptose avec fragmentation de l'ADN. L'activité enzymatique de la toxine était nécessaire pour l'activation des kinases activées par le stress et la cytotoxicité. L'activation de la caspase3 et la cytotoxicité étaient bloquées par l'inhibiteur de la kinase p38 SB202190. Les protéines de signalisation nécessaires pour lier l'activité enzymatique de la toxine à l'activation de cascades de kinases et de caspases restent à caractériser. Suzuki et al. [92] ont rapporté que le Stx2A-subunit, mais pas la sous-unité Stx1 A, possède une séquence pentapeptide (NWGRI) similaire au domaine d'homologie Bcl-2 BH1. Ainsi, la sous-unité Stx2A 1 peut directement interagir avec le Bcl-2homologie mitochondrial, ce qui permet l'activation de la caspase 3 dans des cellules d'hépatome humain (HepG2) exprimant Bcl-2. De nombreuses études ont montré que les Stx purifiées induisent l'apoptose dans les cellules épithéliales primaires en culture, y compris les cellules du tubule proximal rénal et du cortex rénal humain [93].



**Figure 9 : Modèle de progression de la maladie de la dysenterie bacillaire / colite hémorragique à des complications extra-intestinales [93].**

L'apoptose de cellules corticales rénales *in vivo* a été démontrée dans des biopsies réalisées chez trois enfants atteints de SHU, Les biopsies ont montré une nécrose corticale étendue et une microangiopathie thrombotique, et la coloration au TUNEL a révélé des noyaux apoptotiques dans les tubules et les glomérules. Un schéma similaire de coloration TUNEL a été noté dans les tissus rénaux de souris nourries avec *E. coli* produisant Stx2.

Les mécanismes de l'apoptose induite par Stx ont été largement étudiés à l'aide de la lignée cellulaire épithéliale du larynx humain HEP-2 et de la lignée cellulaire épithéliale du col utérin humain HeLa. Dans les cellules HEP-2, Stx1, Stx2 et Stx2c induisent l'apoptose en activant les caspases 8, 9 et 3 [94]. Le traitement des cellules HEP-2 avec les toxines a entraîné une augmentation du clivage de la poly (adénosine diphosphate (ADP) -ribose) polymérase (PARP). La PARP est un substrat de la caspase 3, et on pense que le clivage de la PARP agit de manière pro-apoptotique en inhibant la réparation de l'ADN. Bid, membre pro-apoptotique du Bcl-2family, est clivé à sa forme active de 15 kDa par l'action de la caspase 8. Il est connu que Bid activé (bid tronqué ou bid) active l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques Bak et Bax [93] qui, à leur tour, déclenchent la libération du cytochrome c des mitochondries et activent la caspase 3 en aval. Ces données suggèrent que Bid agit comme un lien entre la caspase 8 et la voie intrinsèque ou mitochondriale dans l'apoptose médiée par Stx. Les sous-unités B purifiées Stx ont déclenché l'apoptose des cellules HEP-2, bien que des doses plus élevées soient nécessaires par rapport aux holotoxines.

Le traitement Stx1 ou Stx2 des cellules HEP-2 a entraîné l'expression régulée de manière positive de la protéine pro-apoptotique Bax et la surexpression des cellules protégées par la protéine Bcl-2 à partir de l'apoptose induite par Stx. [95] Les cellules HeLa transfectées avec des plasmides expriment soit des sous-unités Stx1 A, soit des sous-unités B. Les cellules transfectées par la sous-unité Stx1 A sont mortes par nécrose, comme l'indiquent la libération de lactate déshydrogénase et l'inactivation de déshydrogénases générant du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) réduit sans fragmentation de l'ADN. Les cellules transfectées par la sous-unité B de Stx1 sont devenues apoptotiques, comme en témoignent la fragmentation de l'ADN et l'activation des caspases 1 et 3. Fujii et al. [96] ont rapporté que le traitement Stx1 des cellules HeLa entraîne l'activation des caspases 3, 6, 8 et 9 et le prétraitement des cellules avec les inhibiteurs de la caspase 3, 6 et 8, mais pas les inhibiteurs de la caspase 9 apoptose. La caspase 6 induit le désassemblage nucléaire et la condensation de la chromatine en activant la lamine A. L'activation de la bid et la libération du cytochrome c ont été démontrées dans des cellules HeLa traitées avec Stx1. Cependant, le traitement par Stx1 a également régulé positivement l'expression de l'inhibiteur de la protéine d'apoptose liée à l'X (caspase 9), ce qui suggère que la voie intrinsèque ou mitochondriale et l'activation de la caspase 9 pourraient ne pas jouer un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose dans ce type

de cellule. Contrairement aux études de Nakagawa et al. Les sous-unités Stx1 B ne provoquaient pas l'apoptose des cellules HeLa et le transport rétrograde de l'holotoxine vers le RE semblait essentiel pour l'induction de l'apoptose [96].

Un certain nombre de rapports indiquant que les Stx induisent l'apoptose dans les cellules endothéliales isolées à partir de divers sites anatomiques, mais les aspects mécanistiques de l'apoptose des cellules endothéliales induite par Stx commencent à apparaître. Pijpers et al. Des études ont montré que les cellules endothéliales microvasculaires du prépuce humain (FMVEC) sont sensibles à l'apoptose induite par Stx à des concentrations aussi faibles que  $10^4$  fM. À des concentrations nanomolaires, les sous-unités B purifiées de Stx ont également induit l'apoptose de FMVEC. Un peptide inhibiteur aldéhyde de la caspase 3 protégeait les cellules de l'apoptose. Dans les études utilisant la lignée de cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines, HMEC-1, Stx1 et Stx2 ont rapidement démontré qu'elles induisaient l'apoptose et inhibaient l'expression du membre anti-apoptotique Bcl-2family Mcl-1. Mcl-1 est normalement exprimée de manière constitutive par les cellules endothéliales. La diminution des taux détectables de Mcl-1 était fonction de la dose de toxine et du temps. Un inhibiteur de la pan-caspase n'empêchait pas la diminution des taux de protéine Mcl-1, ce qui suggère que les caspases ne contribuent pas à ce phénomène. La lactacystine, inhibiteur du protéasome, empêche la diminution des taux de Mcl-1 et protège les cellules contre l'apoptose. En utilisant les mêmes cellules, une autre protéine anti-apoptotique, la protéine inhibitrice de type FLICE (FLIP), s'est également révélée être modulée à la baisse par Stx1 [97]. Le FLIP est rapidement dégradé par les protéasomes et doit être synthétisé en continu pour la survie des cellules. Ces études suggèrent que les protéasomes jouent un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose. Face à l'inhibition de la synthèse protéique de novo induite par Stxs, les facteurs anti-apoptotiques labiles sont rapidement dégradés, ce qui déclenche l'apparition de l'apoptose. FLIP est homologue à la caspase 8, mais est enzymatiquement inactif, servant ainsi de manière négative dominante pour prévenir l'apoptose via l'inhibition de l'activation de la caspase 8. Ainsi, le rôle de la FLIP dans la protection contre l'apoptose induite par Stx est cohérent avec les résultats précédents impliquant un mécanisme dépendant de la caspase 8 pour l'apoptose médiée par Stx [93].



# Epidémiologie

## VI. Epidémiologie :

### 1. Agent pathogène :

La toxine Shiga est principalement produite par la bactérie *Shigella dysenteriae* de sérotype 1 mais un certain nombre de ces toxines sont produites par *Escherichia Coli* et d'autres bactéries telles que *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae*.

#### 1. 1 *Shigella dysenteriae* :

*Les shigelles*, prototypes des bactéries entéro-invasives, sont des bacilles Gram négatif de la famille des entérobactéries, apparaissant sous la forme de courts bâtonnets de 2 à 3 mm de long, immobiles, aflagellés, non encapsulés. Leur température optimale de croissance est de 37°C en milieu aéro ou anaérobie. Ils sont peu résistants en milieu extérieur.

Le groupe *shigelle* est divisé en 4 sérogroupes et près de 40 sérotypes. *Les shigelles* sont difficilement identifiables par leurs seuls caractères biochimiques, l'identification formelle nécessitant un sérotypage fondé sur les propriétés antigéniques lipopolysaccharidiques somatiques O. *S. dysenteriae*, sérotype type, constitue le sous-groupe A (15 sérotypes) [98]. *Shigella* de type 1 (Sd1), plus connu sous l'appellation "bacille de Shiga", se singularise nettement car :

- Il n'a pas de catalase, ce qui est exceptionnel pour une entérobactérie ;
- Il produit une toxine du même nom ;
- Il est responsable d'une maladie plus sévère, plus prolongée et plus souvent fatale que les autres shigelles ;
- Il a une puissante capacité épidémique avec un taux d'attaque élevé et une forte mortalité largement due à sa shiga-toxine ;

Le tube digestif de l'homme constitue l'unique réservoir naturel *des shigelles*, exception faite des primates en captivité. Les bactéries ne font pas partie de la flore normale, elles sont uniquement présentes dans les selles des malades et des porteurs sains. L'homme élimine les bactéries par ses selles (une selle diarrhéique contient 10<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> shigelles/g) et les disperse dans le milieu extérieur (sol, eau) où, fragiles, elles ne survivent pas longtemps.

Un élément supplémentaire à considérer est le rôle des toxines dysentériques. *Les shigelles* induisent la production de 3 entérotoxines différentes : Shigella entérotoxine 1 (SHET-1) présente chez *S. flexneri* 2a et rarement dans les autres sérotypes, SHET-2 trouvée dans tous les sérotypes, et enfin Shiga-toxine, la plus puissante et la mieux caractérisée. Propre à Sd1, elle a été reconnue par Flexner (1900) puis Conradi (1903) comme provoquant une paralysie et la mort de souris et lapins. Cette toxine protéique de 70 kd est constituée de 5 sous-unités B porteuses (7,7 kd) qui permettent l'endocytose, et d'une sous-unité fonctionnelle A (32 kd) qui provoque la mort cellulaire par blocage de la synthèse protéique. Elle exerce une action entérotoxinique, cytotoxique et neurotoxique. Sa présence n'est pas nécessaire à la maladie, mais les souches Sd1 productrices de la toxine sont plus pathogènes que les souches non productrices. Elle intervient aussi dans le syndrome hémolytique et urémique [99].

### **1.2 *Escherichia coli* producteur de Shiga-toxine :**

*E. coli* est un bacille de la famille des Enterobacteriaceae, à coloration de Gram négative, aéro-anaérobie et pouvant fermenter les nitrates. Ces bactéries sont catalase-positives et ne possèdent pas d'oxydase. Elles fermentent le glucose et habituellement le lactose (coloration rouge/rosée des colonies cultivées sur gélose MacConkey), cependant quelques souches ne possèdent pas cette dernière propriété.

Chez l'Homme, les souches impliquées dans des infections intestinales sont classées en sept « pathotypes », en fonction de leur mode d'interaction avec leur hôte et des signes cliniques associés [100] : les EPEC (*Enteropathogenic E. coli*), les EHEC (*Enterohaemorrhagic E. coli*), les ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*), les EIEC (*Enteroinvasive E. coli*), les EAEC (*Enteraggregative E. coli*), les DAEC (*Diffusely Adherent E. coli*) et récemment les AIEC (*Adherent et Invasive E. coli*). D'autres pathovars sont responsables d'infections extra-intestinales (infections urinaires, méningites...) et sont regroupés sous le terme de ExPEC (*Extra-intestinal Pathogenic E. coli*). Néanmoins, l'émergence de souches « hybrides », possédant des facteurs de virulencespécifiques de pathotypes différents, telles que la souche EAHEC O104 :H4 (*Enteraggregative Haemorrhagic E. coli*) des épidémies allemandes et françaises de 2011, a montré les limites de cette classification [101]. STEC

(également appelés VTEC pour *E. coli* producteurs de vérotoxines) sont définis comme des *E. coli* possédant un gène *stx* codant pour une puissante toxine, la Shiga-toxine (Stx). Cette toxine n'entraîne des symptômes chez l'Homme que si la bactérie qui la produit, après avoir été ingérée, adhère à la muqueuse intestinale de l'hôte : les Shiga-toxines produites par les souches responsables d'épidémies alimentaires ne sont donc pas préformées dans les aliments [102]. Les gènes *stx* présents chez les STEC sont portés par des phages intégrés dans le chromosome (ou prophages) des souches EHEC. Des prophages codant pour les toxines Stx (dits prophage Stx) ont été identifiés chez *E. coli* mais aussi chez *Shigella dysenteriae* type 1, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* ou *Shigella flexneri*. Les phages Stx infectieux à l'état libre ont par ailleurs été mis en évidence dans l'environnement et dans les aliments [103].

Toutes les souches EHEC sont des STEC. En revanche, toutes les souches STEC ne sont pas pathogènes pour l'Homme et ne sont donc pas des EHEC [102]. La figure 10 illustre le système de classification actuel des souches d'*E. coli* à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés.

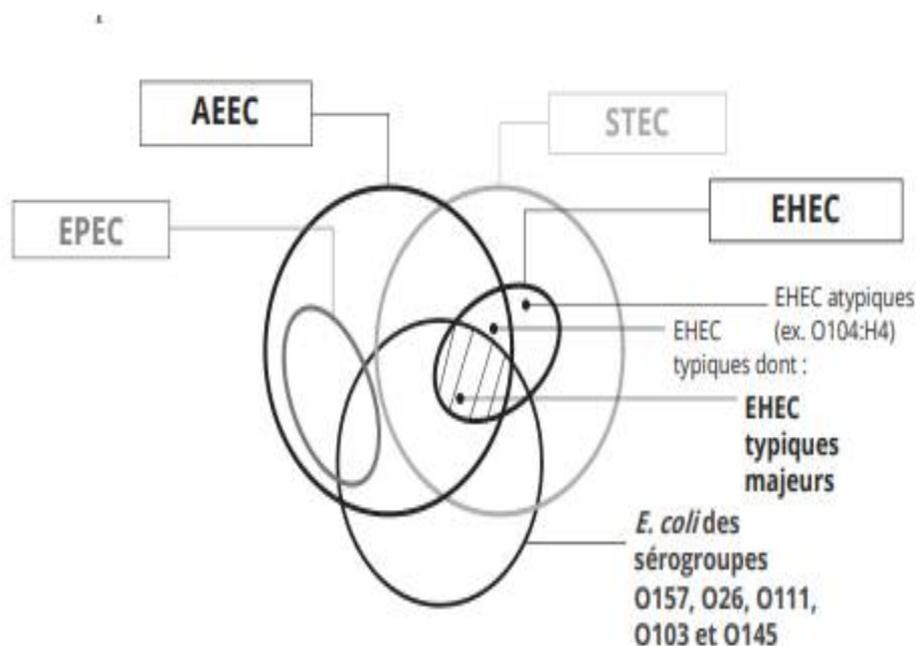


Figure 10 : Diagramme de Venn [172].

Le sérotypage permet de distinguer les différentes souches d'*E. coli* grâce à leurs antigènes de surface et, à ce jour, plus de 380 sérotypes de souches STEC ont été décrits chez l'Homme mais aussi chez l'animal [104]. Or, seul un petit nombre d'entre eux semble être associé à la majorité des cas humains graves recensés dans le monde. Bien qu'il y ait des variations en fonction du pays et de l'année, une étude a montré, en 2003, que les sérotypes les plus « à risque » appartiennent aux sérogroupes O26, O91, O103, O111, O113, O121, O145 et O157 [105].

**En 2013**, à partir des données recensées en Europe entre 2007 et 2010, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs, ou EFSA en anglais) a montré que les souches STEC les plus « à risque » appartenaient aux sérogroupes O26, O103, O104, O111, O145 et O157. Elle a également souligné que les données étant parcellaires (seules 2 033 souches avaient pu être sérotypées parmi les 13 545 cas étudiés), le risque associé aux autres sérogroupes de souches restait difficile à estimer (EFSA, 2013). La dénomination « 5 sérotypes majeurs » ou « 5 sérotypes les plus à risque » se réfère classiquement aux sérotypes O157, O26, O111, O103 et O145.

### **1.3 *Enterobacter cloacae* :**

*Enterobacter cloacae* est un bacille à Gram négatif qui appartient à la famille des Enterobacteriaceae ;

*L'E. cloacae* peut être retrouvé au niveau du sol, de l'eau, des plantes et des animaux. Ce complexe est également retrouvé au niveau de la flore normale du tractus gastro-intestinal de l'homme. Présent à l'état commensal, il est capable de passer à l'état pathogène opportuniste essentiellement chez les patients dont les défenses immunitaires sont diminuées. Son implication dans les infections des patients hospitalisés dans les services de soins intensifs représente environ 7 % des microorganismes responsables d'infections. La prise en charge thérapeutique des infections causées par cette espèce peut poser plusieurs problématiques, notamment par sa propension à augmenter l'expression de sa céphalosporinase chromosomique ou à acquérir un ou plusieurs types de mécanisme de résistance [106].

#### **1.4 *Aeromonas hydrophila* :**

*Aeromonas hydrophila* une bactérie à Gram négatif, des écosystèmes aquatiques, a été fréquemment isolée aussi bien des eaux douces qu'en eau de mer. Sa présence est constatée dans les effluents et les estuaires, les eaux potables et minérales et dans certains aliments. Cette espèce opportuniste impliquée dans des cas d'infections de poissons d'eau douce et d'eau de mer a été relativement peu étudiée en milieu marin [107].

#### **1.5 *Citrobacter freundii* :**

Les bactéries du genre *Citrobacter* font partie de la famille des Enterobacteriaceae ; il s'agit de bacilles ou de coccobacilles Gram négatif qui fermentent le mannitol et produisent du H<sub>2</sub>S gazeux ; elles sont aussi capables d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone. Le genre peut être divisé en 43 sérogroupes O selon l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) et en 20 groupes selon la composition en sucres du LPS.

Ce sont des agents pathogènes nosocomiaux opportunistes rares qui entraînent normalement des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux et des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies et d'autres infections néonatales comme la méningite, le sepsis néonatal, l'infection articulaire et la bactériémie. Les infections du système nerveux central (SNC) sont plus courantes chez les nourrissons de moins de 2 mois que chez les enfants plus âgés et les adultes immunodéprimés; cependant, certains cas rares ont été signalés. *C. koseri* et *C. freundii* causent des méningites néonatales pouvant évoluer vers l'abcès cérébral. Chez l'ensemble des patients, les infections à *Citrobacter* comportent un risque de mortalité de 33 à 48 % et, chez les nouveau-nés, ce risque s'élève à 30 %. Les nourrissons ayant réussi à combattre l'infection pourront présenter des séquelles neurologiques importantes touchant le SNC ; un retard mental profond, une hémiparésie et des convulsions sont entre autres possibles.

Les bactéries du genre *Citrobacter* peuvent se propager par contact direct, par transmission verticale de la mère à l'enfant ou par ingestion de matériel contaminé (voie fécale-orale), mais la transmission directe entre humains demeure le mode de transmissions le plus fréquentes [108].

## **2. Réservoirs :**

Le réservoir des STEC est représenté par les bovins. La colonisation du tube digestif des bovins est asymptomatique et transitoire. L'excrétion est influencée par le stress, l'alimentation, les pratiques d'élevage et les saisons. D'autres animaux d'élevage ou des animaux sauvages dont certains gibiers peuvent également être porteurs sains de STEC. Les études réalisées chez les bovins montrent qu'en fonction des élevages, de 20 à 80 % des animaux peuvent être porteurs de STEC mais le sérotype majeur *E. coli* O157:H7 n'est isolé que chez peu d'animaux (0 à 3 %). La persistance de souches de STEC dans les cheptels est due au portage digestif par les animaux et à la contamination par contact d'animal à animal, mais aussi à la contamination des sols (prairies, champs) et des eaux superficielles à partir des déjections animales ou d'engrais de ferme contaminés (fumiers, lisiers) épandus pour fertiliser les terres agricoles. Les aliments (herbe, fourrages) et l'eau d'abreuvement des animaux peuvent ainsi être contaminés. Les STEC peuvent survivre pendant plusieurs semaines dans l'environnement de la ferme (tels que les sédiments d'abreuvoir, les fèces ou le fumier sur le sol). Différents végétaux consommés par l'homme peuvent être contaminés par des STEC, soit par les fumures obtenues à partir d'animaux contaminés, soit quand de l'eau contaminée est utilisée pour l'irrigation [109].

## **3. Modes de transmission :**

Les analyses des épidémies de STEC principalement causées par *E. coli* O157:H7 ont établi trois principales voies de transmission :

- 1) Transmission d'origine alimentaire et hydrique
- 2) Transmission interhumaine
- 3) Contacts avec des animaux.

### **3.1 Transmission d'origine alimentaire :**

La contamination de la viande par les STEC provenant de matières fécales de bovins a lieu pendant l'abattage ou la transformation de la viande et constitue la principale voie par laquelle ces agents pathogènes pénètrent dans la chaîne alimentaire [110]. Les matières

fécales sont également la source de STEC dans les produits laitiers [111]. Par conséquent, la consommation d'aliments crus ou insuffisamment cuits d'origine bovine, en particulier de bœuf haché (hamburgers) et de lait non pasteurisé, est le moyen de transmission le plus courant de *E. coli* O157 : H7. La plupart des éclosions d'infection à *E. coli* O157 : H7 au Canada étaient associées à la consommation de bœuf haché insuffisamment cuit [112], tout comme 50% des éclosions aux États-Unis. De même, la consommation de boeuf haché rose a été reconnue comme un facteur de risque de la maladie sporadique de STEC humain au Canada. La liste des véhicules déclarés d'infection à *E. coli* O157 : H7 comprend le rôti de bœuf, le salami, et le lait cru, que de la viande correctement traitée (Ahmed et Donaghy, 1998) et des produits laitiers tels que le lait pasteurisé et le yogourt ont servi de véhicule à *E. coli* O157 : H7 lors d'épidémies importantes, probablement de contamination croisée. Les produits animaux d'origine autre que bovine, par exemple le lait de chèvre brut et le saccage de chevreuil ont également été identifiés comme des véhicules de l'infection à O157.

Récemment, des légumes et des fruits, probablement contaminés par du fumier de bétail lors de la récolte ou de la transformation, ont été impliqués dans la transmission de *E. coli* O157 : H7. Les exemples sont la laitue, les pommes de terre ; les germes de radis, les germes de luzerne, cantaloup, et le cidre de pomme non pasteurisé et le jus. *E. coli*, matières fécales et fumier. Un degré élevé de tolérance à l'acide permet à *E. coli* O157 : H7 de survivre dans des aliments qui étaient auparavant considéré comme étant exempt d'agents pathogènes d'origine alimentaire. Ceci peut expliquer comment ces produits ont été contaminés par cet agent pathogène [113].

### **3.2 Transmission d'origine hydrique :**

Plusieurs foyers d'infections à *E. coli* O157 : H7 ont été associés à la consommation d'eau potable contaminée [114] ou à la baignade dans des lacs ou des piscines [115]. *E. coli* O157 : H7 est capable de survivre tant dans l'eau de boisson que dans les eaux de loisirs pendant plusieurs semaines, surtout par temps froid [116]. Des études récentes suggèrent que *E. coli* O157 : H7 peut entrer dans un état viable, mais non cultivable, après une persistance dans l'eau pendant 12 semaines [116]. Une natation, une transmission d'origine hydrique associée à la natation peut se produire lorsque les nageurs avalent de l'eau contaminée. La faible quantité d'eau ingérée par les nageurs lors de cette éclosion [115] est en accord avec la faible dose infectieuse notée d'*E. Coli* O157 : H7.

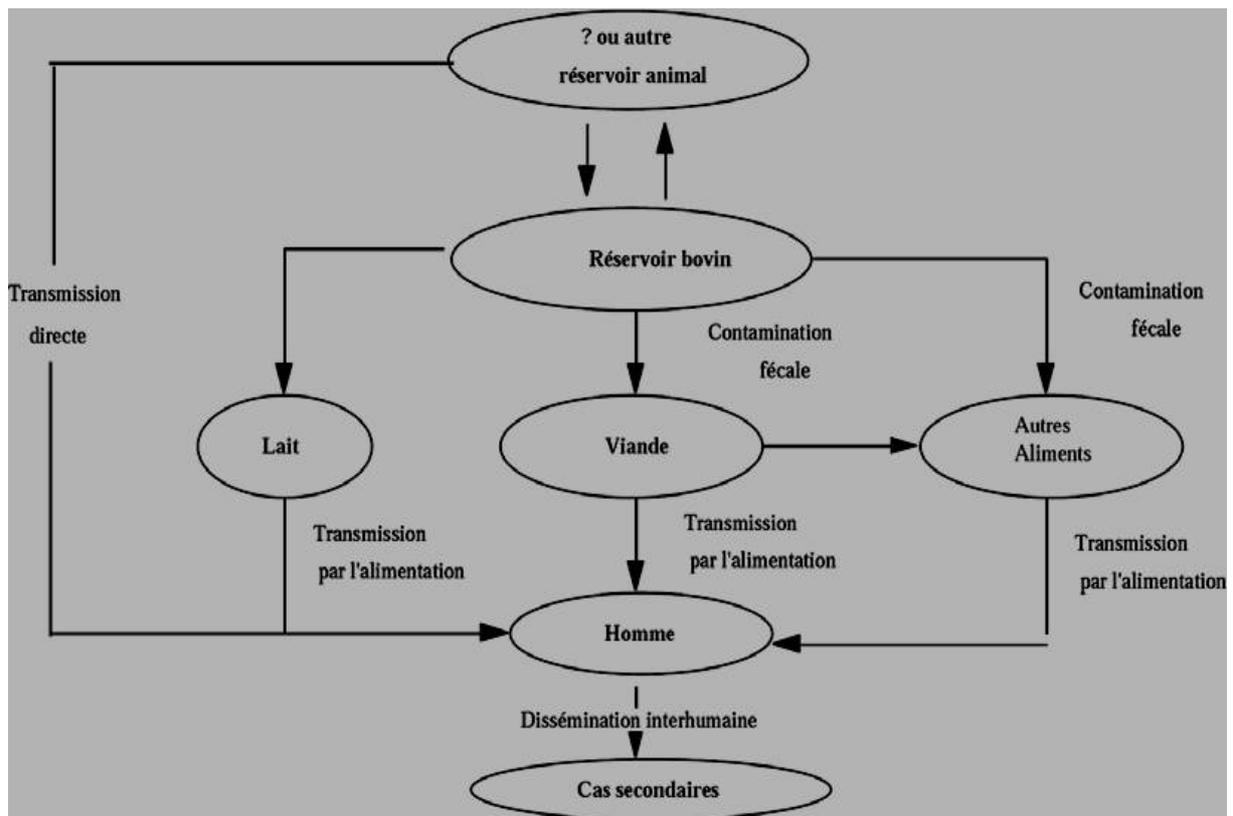


Figure 11 : Réservoirs et modes de transmission des *E. coli* producteurs de Shiga-toxine [109]

### 3.3 Transmission inter-humaine :

En raison de la faible dose infectieuse de *E. coli* O157 : H7, une transmission fécale-orale de personne à personne peut facilement se produire dans des situations de mauvaise hygiène et de contacts étroits. La transmission est devenue la principale voie d'infection dans les foyers d'*E. coli* O157 : H7 dans les crèches [112] ainsi que dans les établissements pour handicapés mentaux [117]. Dans certaines épidémies d'origine alimentaire, des cas secondaires imputables à la transmission interhumaine ont été notés [118]. Ce mode de transmission est également considéré comme responsable de la propagation de l'infection à STEC au sein des familles et des hôpitaux.

### **3.4 Contact avec des animaux :**

La transmission par contact direct avec des animaux a été signalée dans des épidémies et des infections sporadiques à *E. coli* O157 : H7 liée à des visites à la ferme [113]. Les contacts avec les animaux semblent être particulièrement importants au Royaume-Uni, où les visites éducatives dans les fermes, accueillant jusqu'à 100 000 visiteurs par an, sont populaires, en particulier chez les écoliers [119].

### **4. Distribution géographique :**

L'incidence des cas d'infections humaines à STEC varie considérablement d'un continent à un autre et d'une région à une autre. Dans les pays les plus touchés (Etats-Unis, Canada, Ecosse, Angleterre, Allemagne, Suède, Argentine et Japon), l'incidence annuelle de ces infections peut être supérieure à 8 pour 100.000 habitants [120].

**En 2004**, 2771, 795 et 702 cas d'infections à STEC ont été respectivement enregistrés au Japon, en Allemagne et en Angleterre et Pays de Galles (European Food Safety Authority, 2004).

Aux USA, de 1982 à 2002, 350 épidémies responsables de 8.598 cas dont 1.493 hospitalisations (17 %), 354 cas de SHU (syndrome hémolytique urémique) (4 %) et 40 décès (0,5 %) furent rapportés dans 49 états. Les aliments ont été impliqués dans 52 % des épidémies, l'eau dans 9 %, la contamination interhumaine dans 14 %. Le contact avec un animal contamine dans 3 % et 0,3 % ont eu pour cause une contamination de laboratoire. La viande hachée de bœuf a été responsable de la majorité des épidémies (41 % des épidémies d'origine alimentaire) [121].

Les plus importantes épidémies remontent à la fin de l'année 1992 et en début de 1993 lorsque quatre états de l'Ouest firent l'expérience d'une sévère épidémie liée à des hamburgers mal cuits contaminés provenant d'une même chaîne de restauration rapide. Plus de 700 personnes dans quatre états différents (Washington, Idaho, Californie, Nevada) furent infectées. Il y eut 51 cas de SHU et quatre morts. Depuis cette vague épidémique, l'incidence des infections à EHEC O157 n'a pas cessé d'augmenter jusqu'en 2000 (626 cas d'infections à STEC O157 et 57 cas à STEC non O157). A partir de cette année là, une légère diminution du nombre de cas a pu être observée : en 2001 (560 cas à STEC O157 et 61 à STEC non O157), en 2002 (638 cas à STEC O157 et 35 cas de STEC non O157) et en 2003 (444 cas à STEC O157 et 4 à STEC non O157) (Center for Disease Control, 2004)

Aux Etats-Unis, la fréquence estimée des infections liées aux EHEC non- O157 est aussi importante que celles dues au sérotype O157. Les STEC non-O157 causent environ 37.000 cas d'infections annuellement. Les sérotypes O26, O111 et O103 sont prédominants. STEC O111 est considéré comme le deuxième agent responsable des cas de SHU après STEC O157 :H7 [122].

Une forte prévalence d'infections à STEC O157 (5 fois plus élevée qu'en Amérique du Nord) est enregistrée dans les régions de l'Amérique du Sud et spécialement en Argentine où le SHU est endémique [120]. En moyenne, 300 nouveaux cas et une incidence de 9,2 pour 100.000 habitants (enfants de moins de cinq ans) sont reportés annuellement en Argentine.

Dans les deux hémisphères, les infections surviennent plus fréquemment en été qu'en hiver.

Deux mille trois cent vingt neuf cas d'infections à STEC ont été enregistrés dans 18 pays d'Europe en 2004 au lieu de 2.026 en 2000, soit une augmentation d'environ 15 % de cas enregistrés. Une prédominance du serogroupe O157 a été particulièrement constatée dans la majorité des pays d'Europe non continentale (Irlande, Royaume-Uni) tandis que dans certains pays d'Europe continentale comme le Danemark, l'Italie, l'Allemagne, le Grand-duché du Luxembourg et la Slovénie, les STEC non O157 sont plus importants. Les systèmes de surveillance n'étant pas les mêmes dans tous les pays, il est difficile de comparer les différentes données néanmoins le nombre de cas d'infections enregistrés en 2004 est élevé en Ecosse, en Suède, en Angleterre, et au Danemark, (European Food Safety Authority, 2004).

L'Ecosse est le pays européen qui a connu les deux plus grandes épidémies à STEC O157 : plus de 100 personnes dont 69 cas confirmés par le laboratoire et un décès ont été rapportés suite à une contamination à partir de lait cru en 1994. Lors de la deuxième épidémie, survenue en 1996, 500 personnes ont été malades, 272 cas ont été confirmés par le laboratoire et 20 personnes sont décédées. La consommation de viande contaminée provenant d'une même boucherie a été la cause de l'épidémie. En 2000, l'Ecosse a enregistré 5 épidémies (deux d'origine alimentaire) affectant plus de 31 personnes en 2000, 10 épidémies en 2001 et plus de 44 personnes atteintes.

L'Angleterre et le Pays de Galles ont aussi enregistré un plus grand nombre de cas d'infections à STEC pendant les années 1999 et 2000 (17 cas d'infections à STEC par million d'habitants en Angleterre, 751 cas cliniques confirmés de SHU et 16 épidémies en 2001). Quatre des épidémies enregistrées en 2001 ont impliqué, comme source de contamination, les matières fécales de lapins sauvages. L'année suivante (2002), la présence de STECO157 dans les matières fécales d'oiseaux ont été à l'origine d'une épidémie en Grande-Bretagne (European Commission – Health and Consumer Protection Directorate, 2002).

En Suède, le nombre de cas d'infections à STEC a varié entre 69 et 96 cas entre 1998 et 2001. La Suède a enregistré trois épidémies à STEC O157, une en 2000 affectant trois personnes qui ont été exposées aux animaux dans une ferme, deux autres en 2002 impliquant pour l'une l'eau de mer et pour l'autre des saucisses fumées de fabrication artisanale (European Commission – Health and Consumer Protection Directorate, 2002).

En Allemagne, l'incidence des cas d'infections à STEC est importante : 795 cas STEC ont été enregistrés en 2004. L'Allemagne a connu deux épidémies en 2002 impliquant particulièrement des STEC O157 non mobiles, fermentant le sorbitol (European Commission – Health and Consumer Protection Directorate, 2002).

En France, aucune épidémie à STEC n'a été identifiée jusqu'en 1992, date à laquelle des cas de SHU ont été décrits chez quatre personnes ayant consommé du lait cru de vache et de chèvre. L'agent causal n'a pas été identifié. Depuis, plusieurs épidémies à STEC ont été rapportées dont une à STEC O148 en 2001 à partir de couscous avec merguez (10 cas, 1 SHU et 0 décès), une en 2002 à STEC O148 :H8 à partir de viande de mouton (11 cas ; deux SHU et 0 décès) (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003) et une épidémie en 2004 à partir de fromage de chèvre contaminé (European Food Safety Authority, 2006). Deux importantes épidémies ont été signalées en France en 2005. Au cours de la première, 69 personnes dont 57 enfants ont été victimes d'une contamination à STECO157 à partir de steak hache surgelé. Seize enfants ont présenté un SHU, 7 ont été dialysés, aucun décès n'a été enregistré. La deuxième épidémie a impliqué un fromage « type camembert » au lait cru contaminé par STEC de serotype O26. L'Institut de Veille sanitaire a fait état de cas de SHU chez 6 enfants dans le nord de la France. Les fromages furent très vite retirés du commerce (Institut de Veille sanitaire, 2006).

En France, du fait de l'absence de surveillance épidémiologique des infections gastro-intestinales à STEC intégrant ou non des colites hémorragiques, la répartition des serogroupes n'est connue que dans le cadre de SHU d'enfants de moins de 15 ans. Il apparaît une forte proportion (45 %) du serogroupe O157 sur la période 1996-2003.

Les autres sérogroupes impliqués dans des cas de SHU depuis 2002 sont les sérotypes O145, O91, O17, O26, O103, O128, O111 [124].

En Belgique, deux petites épidémies à STEC O157 ont été signalées. La première en 2001 due à l'ingestion de filet américain provenant du même boucher et impliquant au moins 5 personnes (Ducoffre, 2003). La seconde en 2004, dans une institution psychiatrique, a donné lieu à 4 cas de SHU et à l'identification d'un porteur au sein du personnel de cuisine [125].

Le Danemark a enregistré les premières épidémies en 2004. Le serotype STEC O157 a été impliqué dans la plus importante, affectant plus de 25 personnes contaminées à partir de produits laitiers. Le contact d'enfants avec des animaux de ferme excréteurs a été également une des causes des épidémies (European Food Safety Authority, 2006).

En Italie, le nombre de cas d'infections à STEC a été de 24 cas en 2004. Les STEC non O157 et particulièrement le serogroupe O26 a été responsable de la majorité des cas (40 %) des infections.

En 2004, une épidémie a été enregistrée suite à la consommation de saucisse fabriquée à partir de viande de porc (European Food Safety Authority, 2006).

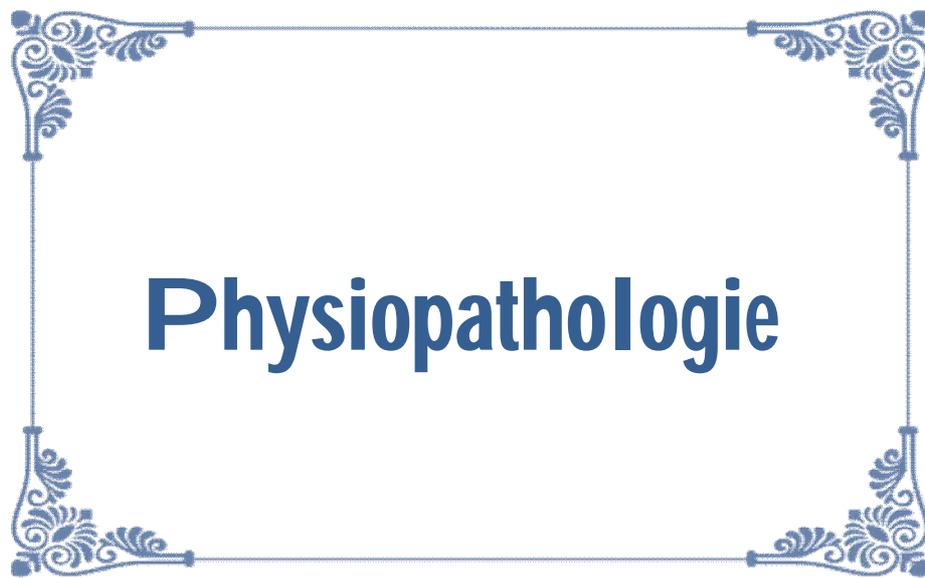
En Australie, la première épidémie date de 1995 suite à la contamination de saucisses sèches fermentées par des STEC O111 : H-. Vingt-trois cas de SHU et un décès ont été signalés lors de cette épidémie (Center for Disease Control, 1995).

Au Japon, une importante épidémie est survenue en juillet 1996 dans la ville de Sakai où 5.727 personnes furent contaminées par des germes de radis blancs dans une cantine scolaire.

Dans ce pays, le nombre de cas a varié de 100 à 1250 puis s'est élevé à 2771 cas entre 1994, 2000 et 2004 (European Food Safety Authority, 2004).

En Afrique, très peu de données sont disponibles. La première épidémie de diarrhée hémorragique est survenue en Afrique du Sud en novembre 1992. STEC O157 non mobile a été retrouvé dans l'eau et dans la viande de bœuf (probablement à l'origine de la contamination) [126].

Entre novembre 1997 et le 20 avril 1998, 298 personnes ont été atteintes de diarrhées sanglantes au Cameroun. Les analyses de laboratoire réalisées pendant l'épidémie (taux de létalité de 16,4 %) ont montré une amibiase chez un patient sur trois et trois types de bactéries pathogènes : *Shigella dysenteriae* multiresistante de type 1, *S. boydii* et *Escherichia coli* entérohémorragique.



# Physiopathologie

## VII. Physiopathologie :

L'intoxication par la toxine Shiga chez l'homme est principalement causée par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par les STEC, provoquant des infections bactériennes dans l'intestin. Les STEC n'expriment pas les toxines Shiga à leur état lysogène avant d'entrer dans le cycle lytique [9]. Sans stocker les toxines dans les cellules bactériennes, le niveau de toxines est très bas aux stades précoces des infections à STEC et les toxines Shiga ne sont toujours pas impliquées ici. A ce stade, les bactéries jouent leur rôle dans la colonisation et l'adhésion aux cellules intestinales. Les STEC interagissent avec la muqueuse intestinale et produisent l'intimine adhésine qui agit sur les entérocytes intestinaux, permettant ainsi à la bactérie d'adhérer à la paroi épithéliale [127]. Lorsque les bactéries entrent en contact avec les cellules épithéliales, elles produisent et libèrent des effecteurs qui entraînent un réarrangement de l'actine cellulaire épithéliale, formant des socles à proximité du site de contact, permettant ainsi aux produits bactériens de traverser la barrière cellulaire épithéliale et d'entrer dans le système circulatoire. Les lésions bactériennes infectieuses provoquent des troubles de la muqueuse intestinale, perturbant la structure des villosités, affectant l'absorption dans l'intestin et conduisant finalement à une diarrhée aqueuse [127].

En quelques jours, les toxines Shiga sont produites et libérées par le STEC. Bien que les entérocytes n'expriment pas les récepteurs Gb3 et ne soient pas intoxiqués par les toxines, les activités infectieuses de la bactérie ont perturbé la paroi intestinale. Ainsi, les toxines peuvent être transloquées par les jonctions détachées de l'épithélium, atteindre la lamina propria et être absorbées dans le système circulatoire [128]. Les toxines Shiga atteignent les cellules endothéliales intestinales exprimant Gb3, provoquant des lésions cellulaires et la mort cellulaire. Les dommages causés à l'endothélium intestinal entraînent un œdème muqueux et sous-muqueux, une hémorragie et une diarrhée sanglante. L'apparition de HC avec ces symptômes peut être un signe de développement du SHU après quelques jours.

Le SHU induit par STEC est caractérisé par la présence de lésions microvasculaires thrombotiques dans les organes cibles, dans lesquelles les cellules exprimant Gb3 permettent une intoxication par les toxines de Shiga. Les toxines attaquent les cellules rénales épithéliales, endothéliales, mésangiales et glomérulaires exprimant le Gb3 ; cellules

endothéliales microvasculaires intestinales ; et les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales [129], causant de graves dommages aux reins, aux intestins et au cerveau, pouvant éventuellement entraîner la mort. L'endothélium intestinal est situé près de la source de l'infection ; ainsi, il n'est pas nécessaire de faire un long voyage dans le sang pour que les toxines de Shiga exercent leur toxicité. Pour développer le SHU dans les reins et le cerveau, les toxines Shiga peuvent être transportées vers la cible par le biais de certains transporteurs dans le sang. Les toxines interagissent avec les globules rouges, les plaquettes et certains monocytes présentant du Gb3 sur la membrane. Les TLR4 présents sur les neutrophiles interagissent également avec les chaînes A des toxines de Shiga [130]. Lorsque la toxine liée aux neutrophiles atteint les cellules endothéliales des reins et du cerveau exprimant Gb3, la haute affinité entre la chaîne B et les récepteurs Gb3 permet à la toxine de se fixer aux cellules endothéliales.

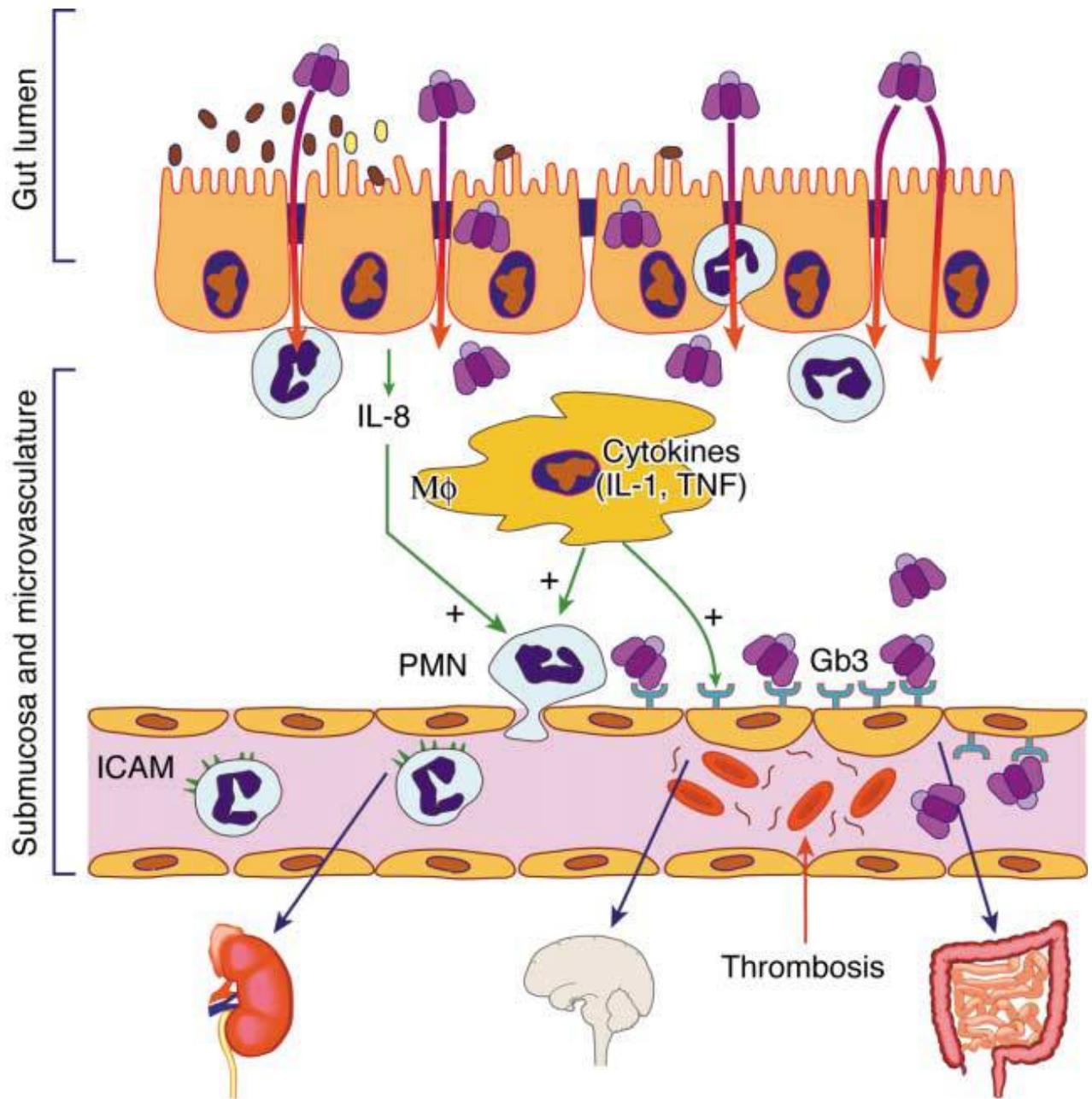


Figure 12 : Pathogenèse de la toxine Shiga [109]

La médiation de la production de cytokines contribue également à la toxicité des toxines Shiga. À des doses élevées de toxines dans les cellules endothéliales, la mort cellulaire est déclenchée, tandis qu'à des concentrations non létales plus faibles, le stress ribotoxique induit par la toxine provoque des régulations sur IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF. Production d' $\alpha$ , induisant des réponses pro-inflammatoires et favorisant le recrutement de leucocytes. Les monocytes exprimant le Gb3 qui sont attirés sont également susceptibles de se lier à la toxine Shiga. Les monocytes sont également soumis à une régulation dans la production de cytokines telles que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , et ces cytokines renforcent l'expression des récepteurs de Gb 3 sur les cellules endothéliales, ce qui les rend plus sensibles aux toxines. La production continue de cytokines induites par la toxine de Shiga entraîne des effets pro-inflammatoires excessifs, entraînant des lésions graves des lésions endothéliales.

Les toxines Shiga sont directement impliquées dans l'activation et l'agrégation des plaquettes. Cela réduit à son tour la thromborésistance dans les cellules endothéliales, entraînant une thrombose microvasculaire.

Les toxines de Shiga interfèrent également directement avec le système du complément du patient [131]. Le système fait partie de la défense immunitaire innée impliquée dans l'élimination des cellules étrangères ou apoptotiques. Il comprend la voie classique induite par l'agent pathogène et la voie de la lectine, ainsi que la voie alternative avec un mécanisme de retardement. Le système est médié par l'activation du complément C3 convertase qui clive le composant du complément C3. C3 est clivé en C3a et C3b. C3b se décompose facilement dans le sang mais peut également se lier à la surface de la cellule en tant que signal, ce qui déclenche une boucle d'amplification qui favorise une décomposition plus poussée de C3, ainsi que la formation de complexes d'attaque membranaire. Certains patients souffrant de SHU induit par STEC ont présenté une réduction de C3 [131]. Ceci est dû à la capacité de la toxine Shiga à induire une régulation à la hausse de la P-sélectine, une molécule d'adhésion membranaire, qui lie le C3b avec une haute affinité. La liaison de C3b autour des cellules endothéliales favorise l'activation de AP. C3a est une anaphylatoxine qui induit une dégranulation des cellules endothéliales, déclenchant une réponse inflammatoire locale. Les toxines Shiga se lient également au facteur H [131], qui protège les cellules hôtes des activités

du système du complément. La liaison de la toxine Shiga empêche le facteur H de se lier à la surface des cellules endothéliales et les cellules deviennent sensibles aux dommages causés par l'activation du PA.

Les toxines Shiga contribuent au développement du SHU par le biais d'effets multiples sur les cellules endothéliales et d'autres cellules comme les monocytes. Les mécanismes principaux impliquent des effets pro-inflammatoires, des effets pro-apoptotiques et des effets pro-thrombotiques. Aux doses inférieures de toxines Shiga, les cellules exprimant Gb3 dans les reins et le cerveau sont stimulées par la régulation des cytokines qui favorisent les réponses inflammatoires locales ; les cellules immunitaires sensibles à la toxine amplifient davantage la réponse. La réponse inflammatoire sursensibilisée nuit aux zones avoisinantes. À des doses de toxines plus élevées, le stress ribotoxique et le stress exercé sur les cellules entraînent la mort des cellules. Les effets thrombotiques entraînent non seulement une thrombocytopénie, mais également une thrombose microvasculaire perturbant la circulation dans les zones touchées. Comme de nombreux types de cellules autour des reins expriment le Gb3, les reins sont extrêmement sensibles aux toxines et l'insuffisance rénale est l'une des conséquences majeures du SHU induit par la toxine de Shiga [132]. La dialyse est souvent nécessaire chez les patients souffrant d'insuffisance rénale aiguë. Certains patients peuvent présenter des lésions rénales permanentes accompagnées de protéinurie, d'hypertension et / ou de diminution du taux de filtration glomérulaire, même après leur guérison du SHU. Comme les cellules endothéliales du cerveau présentent également le Gb3, le système nerveux central (SNC) est également menacé par les toxines de Shiga. La proportion de patients développant un SHU dans le système nerveux central est moins fréquente que celle de patients développant un SHU dans les reins, mais les lésions du système nerveux central peuvent entraîner de graves complications. Il implique un large éventail de symptômes, tels que l'apnée, le coma, des convulsions, la cécité corticale et l'hémiplégie, et peut même entraîner la mort subite. Les dommages peuvent également avoir des effets à long terme même après le rétablissement. Des études suggèrent que certains enfants guéris du SHU présentent des résultats de test anormaux dans certaines parties du profil neurocognitif, mais que des études de suivi à long terme sur ces patients restent nécessaires. Pour fournir plus de preuves sur les interférences neurologiques.



# **Etude clinique**

## **VIII. Etude clinique :**

### **1. Dysenterie bacillaire :**

*Shigella spp*, sont les agents responsables de la dysenterie bacillaire, une maladie caractérisée par des crampes abdominales, de la fièvre et une diarrhée avec du sang et du mucus dans les selles. *Shigella spp* sont des agents pathogènes adaptés aux humains, transmis par voie fécale-orale. La dose infectieuse peut être aussi faible que 10 à 100 organismes. L'incidence de la dysenterie bacillaire mortelle est estimée à plus d'un million de cas par an [133]. Toutes les espèces de *Shigella* sont invasives. Après l'internalisation par les cellules M, les bactéries induisent une endocytose dirigée par un agent pathogène aux surfaces basolatérales des cellules épithéliales intestinales. Une fois internalisées, les bactéries s'échappent rapidement de l'endosome pour se répliquer dans le cytoplasme. La polymérisation unipolaire dirigée par un agent pathogène d'éléments cytosquelettiques de la cellule hôte propulse les bactéries dans des cellules épithéliales non infectées adjacentes. Après la réplication dans les cellules infectées, les cellules hôtes se lysent en libérant des bactéries. Ainsi, la dysenterie bacillaire est caractérisée par une ulcération du côlon et une réponse inflammatoire vive. Stx semble être un déterminant de la virulence auxiliaire dans la dysenterie bacillaire. Parmi les quatre espèces de *Shigella*, seul *S. dysenteriae* de sérotype 1 exprime Stx. Des études sur l'alimentation de singes macaques utilisant des souches isogéniques toxigènes et atoxigènes de *S. dysenteriae* ont révélé que les deux souches provoquaient une dysenterie fulminante, mais que seule la souche toxigène endommageait les capillaires coliques, suggérant que Stx cible la destruction des cellules endothéliales vasculaires [134]. Des informations supplémentaires sur la pathogenèse de la dysenterie bacillaire sont disponibles dans Schroeder et Hilbi.

### **2. Colite hémorragique :**

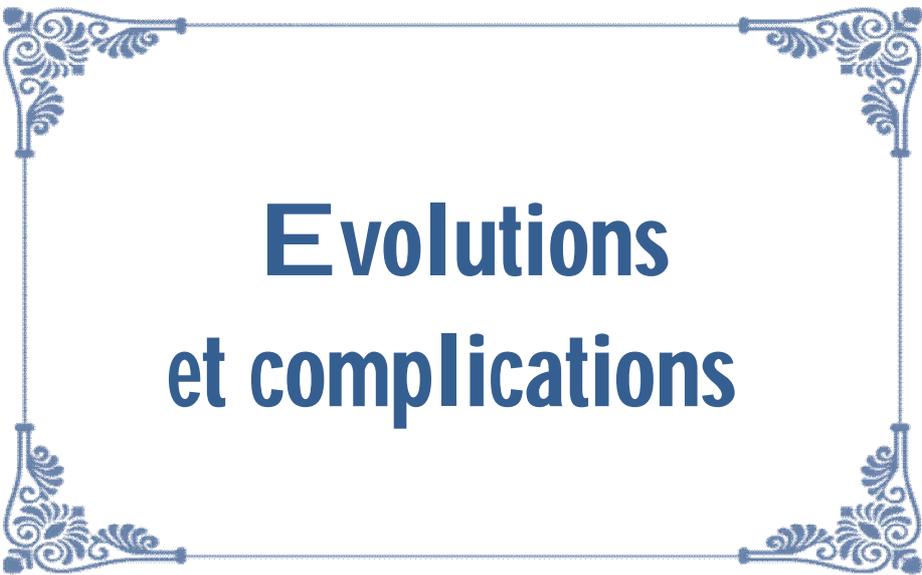
Les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines sont les agents responsables de la diarrhée sanglante ou de la colite hémorragique. Les STEC ne sont pas invasifs, mais de nombreuses souches sont capables de bien adhérer à l'épithélium intestinal, entraînant des modifications substantielles de l'histologie intestinale. Les ruminants utilisés dans la production alimentaire

semblent être les principaux réservoirs naturels de STEC, bien que des épidémies de diarrhée sanglante aient été liées à l'ingestion de légumes mal lavés, de jus de fruits non pasteurisés, d'eau de puits contaminée, d'eau de piscine sous-chlorée et au contact des animaux visites de zoo pour enfants [135]. La transmission entre personnes est également responsable de la propagation de la maladie. Près de 500 sérotypes différents de STEC ont été isolés chez des humains souffrant de diarrhée sanglante [135] ; cependant, *E. coli* O157 : H7 est le sérotype prédominant des STEC associé à des épidémies de diarrhée sanglante dans de nombreux pays et est le plus souvent associé à une maladie grave [49]. Aux États-Unis, l'incidence annuelle estimée des maladies d'origine alimentaire causées par *E. coli* O157 : H7 est d'environ 73 000 cas par an, tandis que les souches non O157 : H7 sont à l'origine d'environ 37 000 cas par an [136]. Comme chez les *Shigellae*, la dose infectieuse de STEC chez l'homme peut être aussi faible que 50 bactéries. De 3 à 8 jours après l'ingestion de STEC, les patients développent une diarrhée aqueuse, qui peut évoluer en diarrhée sanglante avec crampes abdominales, nausées et vomissements. La fièvre n'est pas un signe courant après l'ingestion de STEC. L'utilisation d'antibiotiques ou d'agents antimotilité est contre-indiquée ; il a été démontré que certains antibiotiques augmentaient l'expression des toxines par les STEC et que les agents antimotilité pouvaient augmenter la rétention de toxines dans le tractus gastro-intestinal [137].

### **3. Syndrome hémolytique et urémique :**

Les patients infectés par des bactéries productrices de Stx ont un risque accru de développer une maladie extra-intestinale représentant un danger de mort, appelée syndrome hémolytique et urémique (SHU). Le SHU est principalement dû à la production et à la translocation de Stx à travers la barrière épithéliale intestinale. Le SHU peut se manifester après que STEC ne soit plus détectable dans les selles. Après une lésion des vaisseaux sanguins du côlon provoquée par des toxines, les Stx peuvent pénétrer dans la circulation sanguine bien que des toxines libres n'aient pas été détectées dans la circulation des patients atteints de SHU. Le risque de progression vers des complications extra-intestinales est accru chez les patients infectés par STEC exprimant Stx2, seul ou associé à Stx1 ou Stx2c [138].

Les reins et le système nerveux central sont le plus souvent endommagés par Stx. L'SHU est une constellation de complications hématologiques, rénales et neurologiques qui se développent chez 10 à 15% des patients atteints de colite hémorragique. Les complications comprennent la thrombocytopénie et l'anémie hémolytique avec schistocytes (érythrocytes fragmentés) présents dans le sang frottis. Les caractéristiques de l'insuffisance rénale aiguë, pouvant éventuellement suivre une infection par STEC, incluent une oligurie ou une anurie, des cellules endothéliales glomérulaires enflées détachées de la membrane basale, un dépôt intraglomérulaire de fibrine et une microangiopathie thrombotique. Une lésion tubulaire rénale peut être présente mais ne constitue pas une conclusion cohérente tardive au cours du SHU [139]. Environ 66% des patients atteints de SHU ont besoin d'une dialyse. Les atteintes du système nerveux central peuvent se présenter sous forme de léthargie, d'irritabilité, de convulsions, de parésie et de coma. Les séquelles à long terme comprennent l'insuffisance rénale, l'hypertension, l'hyperactivité et la distractibilité, ainsi que le diabète sucré insulino-dépendant. La mortalité par SHU est de 3 à 5%. Il existe une variabilité dans les signes et symptômes suivant l'ingestion de STEC. Les patients peuvent présenter une insuffisance rénale aiguë en l'absence de diarrhée sanglante [139].



# **Evolutions et complications**

## **IX. Evolutions et complications :**

La maladie à STEC présente un spectre de manifestations allant du portage asymptomatique à la diarrhée et au SHU. La période d'incubation moyenne d'une infection à STEC est de 3,7 jours [140]. La maladie débute par une diarrhée non sanglante, qui dure 1 à 3 jours, suivie dans 90% des cas par une diarrhée sanglante due à une colite hémorragique grave. La plupart des patients restent apyrétiques et la douleur abdominale est plus grave que celle des autres gastro-entérites bactériennes [141]. La sensibilité abdominale et la défécation douloureuse sont également des symptômes courants de la maladie à STEC. Fait intéressant, les patients STEC ne développent pas de bactériémie. Ainsi, les patients présentant une diarrhée sanglante aiguë et douloureuse sans fièvre sont considérés comme potentiellement infectés par les STEC.

Dans la plupart des cas, les maladies diarrhéiques disparaissent d'elles-mêmes, mais certaines personnes développent des complications graves dont la plus meurtrière est le SHU.

Les lésions histopathologiques caractéristiques du SHU comprennent les thrombus microvasculaires et les cellules endothéliales enflées, reflétant la nature thrombotique de ce trouble. La maladie rénale est marquée par une hématurie, une protéinurie, une oligurie et, dans les cas graves, une insuffisance rénale [141]. L'activité accrue de l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1) entraîne l'inhibition de la fibrinolyse chez les patients atteints de SHU, entraînant une augmentation de la production intravasculaire de fibrine et de thrombine, qui se traduisent respectivement par des taux plasmatiques élevés de D-dimère et de fragment de thrombine 1 + 2 [142]. Par conséquent, on pense que les fortes concentrations de D-dimères et de fragments 1 + 2 en présence de diarrhée sont des facteurs de risque de développement du SHU.

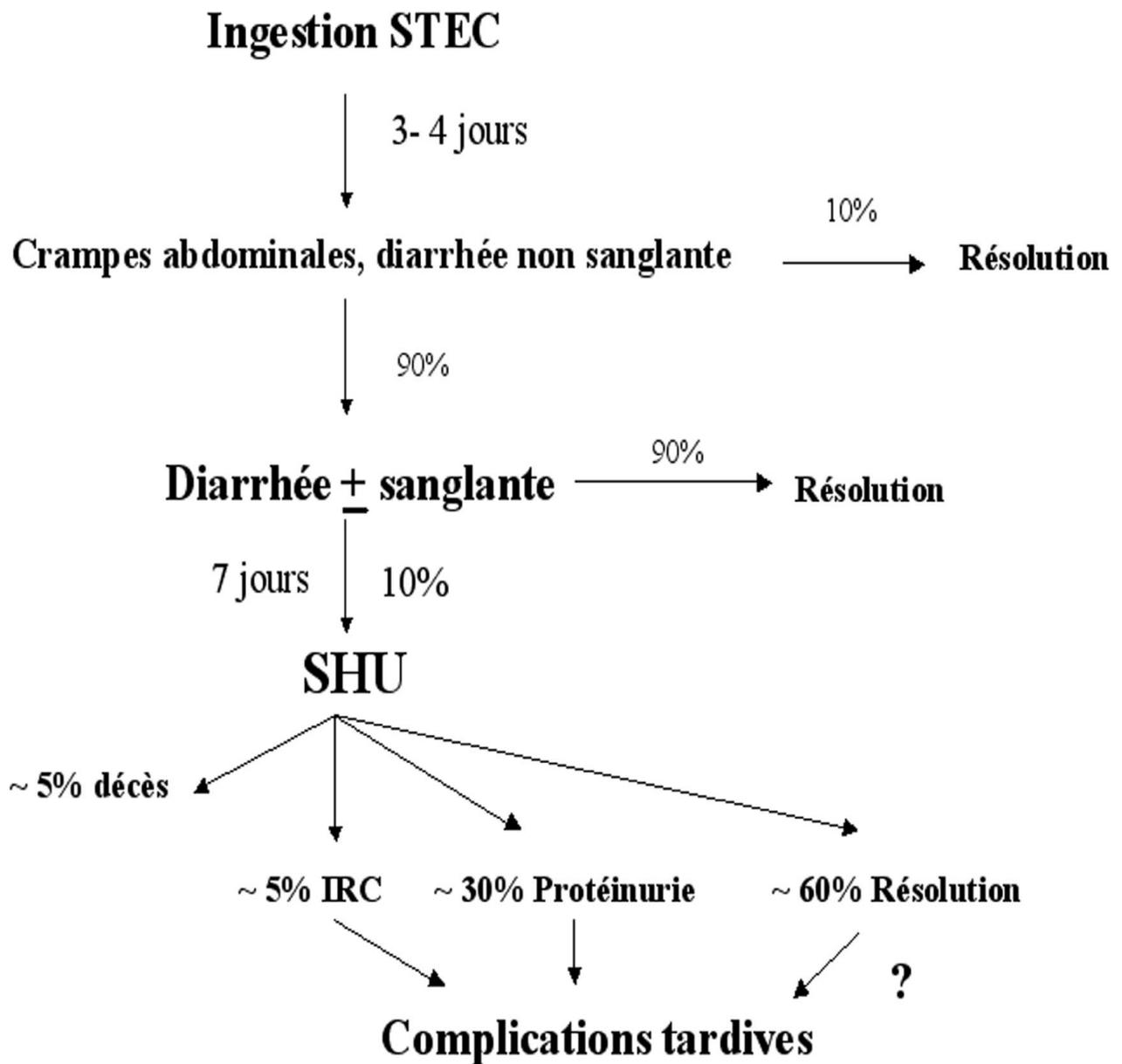


Figure 13 : Evolution clinique après ingestion de STEC [150]

Bien que la plupart des patients guérissent d'une insuffisance rénale aiguë, ils conservent un risque d'insuffisance rénale à long terme, même de nombreuses années après la guérison. En outre, dans certains cas, la toxicité des STEC affecte d'autres systèmes organiques tels que le système pulmonaire, cardiovasculaire et le système nerveux central (SNC). La surcharge liquidienne, les épanchements pleuraux et la détresse respiratoire de l'adulte sont des complications pulmonaires fréquentes. Les patients atteints de SHU chez l'adulte sont plus sujets à l'insuffisance cardiaque congestive, tandis que d'autres troubles cardiaques sont fréquents chez les enfants. En outre, des complications telles que des perforations intestinales et une nécrose, une acidose, une pancréatite et une intolérance au glucose peuvent se développer pendant le SHU [141]. Fait important, les complications du SNC, qui se développent dans 25% des cas de SHU, sont les plus périlleuses et constituent le principal précédent de la létalité du SHU [143]. Une ischémie-hypoxie résultant d'un thrombi microvasculaire cérébral, associée à une toxicité directe de Stx sur le système nerveux central, peut entraîner de l'irritabilité, de la léthargie et de la confusion. Environ 10% des patients développent un AVC, des convulsions et un coma.



## **X. Diagnostic :**

Le diagnostic microbiologique des infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines est difficile pour plusieurs raisons, la diminution rapide du nombre de bactéries excrétées dans les selles dans les quelques jours suivant le début des symptômes, la diversité des caractéristiques biochimiques et des sérotypes de STEC. Pour améliorer le diagnostic, le protocole de recherche de ces bactéries doit inclure des méthodes d'analyse sensibles et une phase d'enrichissement spécifique. De plus, les échantillons de selles doivent être obtenus le plus précocement possible après le début des symptômes (au maximum 4 à 6 jours), puis être analysés immédiatement

Le pouvoir pathogène des STEC étant lié à la présence des gènes *stx* codant pour les Shiga-toxines et du gène *eae* responsable des lésions d'attachement-effacement au niveau des cellules intestinales, le diagnostic repose donc sur la mise en évidence dans les selles de ces gènes de virulence et /ou de souches d'*E. coli* producteurs de shiga-toxine et sur l'augmentation du titre sérique des anticorps spécifiques anti-lipopolysaccharide de STEC [144].

### **1. Prélèvements :**

Le diagnostic des infections à STEC est difficile, ces bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif. La quantité présente dans les selles est très faible ( $< 10^2$  UFC/g de selles), surtout au moment du SHU. Une étude réalisée par Tarr et al. a montré qu'au cours d'un SHU, le recueil des selles doit s'effectuer au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs pour que l'analyse soit contributive [145]. Les selles peuvent être recueillies également par écouvillonnage rectal, les patients admis pour SHU présentant souvent un arrêt du transit intestinal. Le prélèvement doit être fait avant toute prise d'antibiotique et doit être transporté rapidement au laboratoire, ou conservé à + 4°C et envoyé dans un milieu de transport si l'analyse n'est pas réalisée sur place.

### **2. Culture :**

Comme ils sont présents en quantité parfois très faible dans les selles, il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles [145]. En médecine humaine, il est classique d'utiliser de l'eau peptonée tamponnée. Après cette phase d'enrichissement de 4 à 6 heures, la selle est mise en culture sur des milieux spécifiques [146].

## **2.1. Méthodes de culture pour STEC O157 :**

Depuis plusieurs années, la culture de gélose sorbitol-MacConkey (SMAC) est la méthode la plus couramment utilisée pour l'isolement des STEC, en raison de la prédominance des souches O157 : H7 et O157 : H2 en tant qu'agents étiologiques de la maladie humaine en Amérique du Nord et en Europe. La plupart de ces souches sont incapables de fermenter le sorbitol, ce qui les distingue de la majorité des *E. coli* fécaux appartenant à d'autres sérotypes [147]. Les plaques de gélose Sorbitol-MacConkey sont ensemencées avec le spécimen fécal et examinées après 18 à 24 h d'incubation pour détecter la présence de colonies incolores négatives au sorbitol. Les colonies individuelles sont testées par agglutination sur lame ou sur tube avec des antisérums O157 et H7.

## **2.2. Méthodes de culture pour STEC non-O157 :**

Les souches d'*E. coli* appartenant à un large éventail de sérotypes, ainsi que d'autres espèces bactériennes, peuvent produire la STX et provoquer une maladie chez l'homme. Malheureusement, aucune caractéristique biochimique définitive ne permet de distinguer les souches de STEC appartenant à des sérogroupes autres que O157 des souches commensales de *E. coli*, ce qui complique considérablement l'isolement de ces organismes. Comme discuté, cependant, presque toutes les souches de O157 STEC et une proportion significative de souches de STEC non-O157 produisent EHEC-Hly. Ces organismes peuvent être distingués phénotypiquement des souches alpha-hémolytiques. Les souches productrices d'EHEC-Hly ne sont pas hémolytiques sur une gélose au sang standard, mais produisent de petites zones hémolytiques troubles sur une gélose RBC lavée (additionnée de Ca<sup>2+</sup>) après 18 à 24 h d'incubation à 37 ° C. Les souches alpha-hémolytiques forment de grandes zones claires d'hémolyse sur des géloses au gélose au sang standard ou au gélose RBC lavées après 4 à 6 heures d'incubation à 37 ° C. La production d'EHEC-Hly a une valeur prédictive positive élevée, puisque Beutin et al. [148] n'ont trouvé aucune souche entérohémolytique parmi 267 isolats fécaux de *E. coli* ne produisant pas de STX. Cependant, la valeur prédictive d'un résultat négatif EHEC-Hly est faible. Schmidt et Karch [149] ont étudié les profils génotypiques et phénotypiques entérohémolytiques de 36 souches de STEC O111: H2 isolées chez des patients atteints de SHU et de diarrhée.

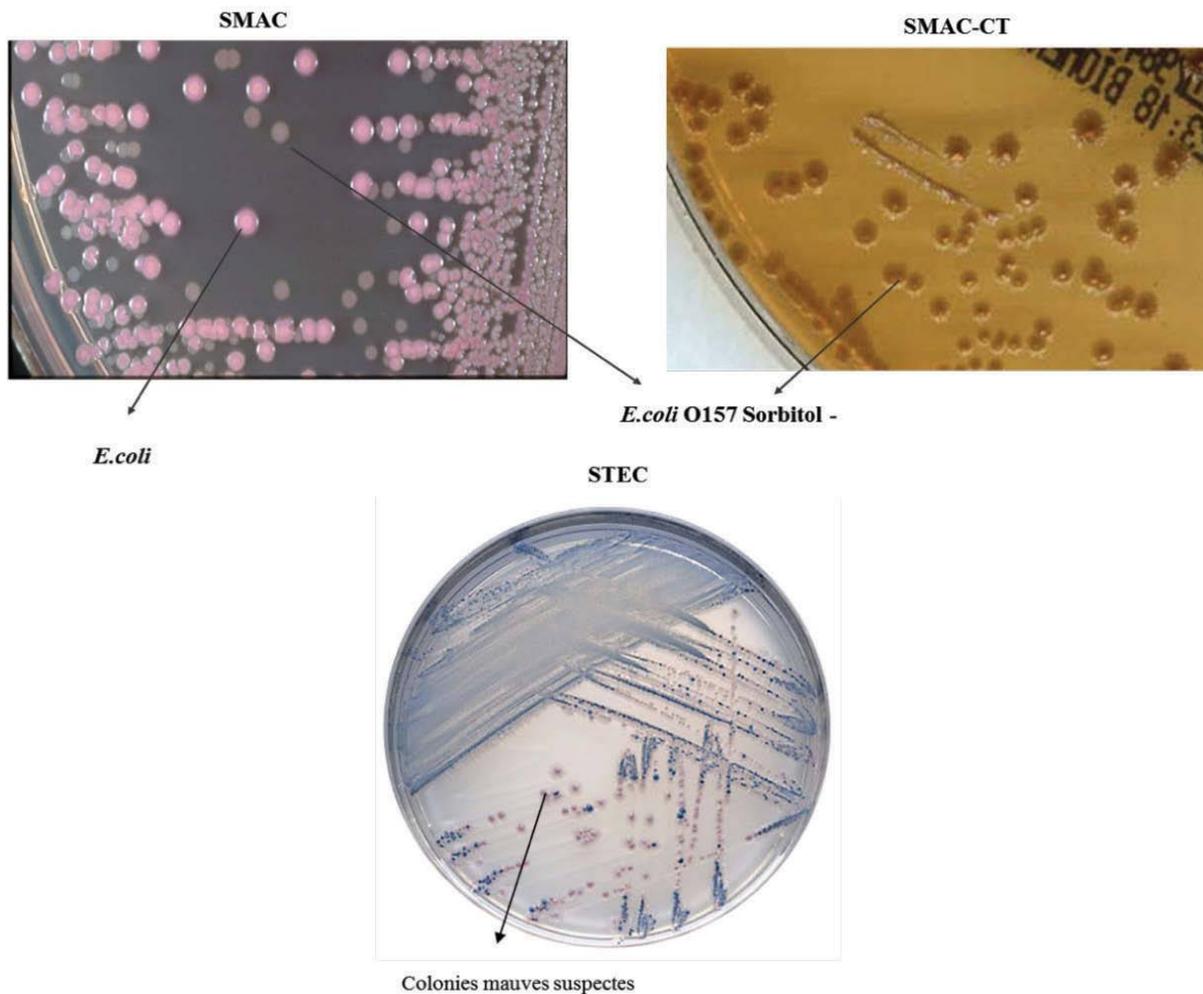


Figure 14 : Morphologie des colonnies d'*E.coli* O157 :H7 sur Milieu SMAC, SMC-CT et STEC [147].

### 3. Détection du gène :

#### 3.1 Effet cytopathogène :

La technique de référence pour la recherche de toxines Stx libres dans les selles ou sur des souches isolées, est la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa, qui doit être neutralisée par un antisérum anti-Stx pour affirmer que la cytotoxicité observée est bien liée à la présence d'une activité toxique de type Stx. Ce test est spécifique, mais il est difficile à mettre en oeuvre et ne peut être effectué qu'en laboratoire spécialisé [150]. Il n'est pas réalisé en France.

### **3.1 Méthodes moléculaires :**

Compte tenu de la présence en très faible quantité des Bactéries dans les selles, l'amplification génique *in situ* par PCR des gènes *stx* et/ou du gène *eae* représente une méthode de choix. Elle constitue la méthode la plus sensible pour une détection à partir des selles, généralement après un enrichissement de 4 à 6 heures en eau peptonée. Le bouillon est repiqué sur milieu de Drigalski. La PCR peut être réalisée directement sur le bouillon et/ou sur la nappe de colonies bactériennes ayant poussé sur le milieu de Drigalski.

De très nombreux systèmes de PCR ont été décrits. Les gènes *stx* (*stx1*, *stx2* et variants) et *eae* peuvent être recherchés séparément ou par PCR multiplex. Les méthodes de PCR en temps réel permettent un diagnostic plus rapide que les méthodes conventionnelles de PCR [151].

En cas de positivité de la PCR, l'isolement de la bactérie est indispensable dans un but épidémiologique mais aussi pour caractériser les facteurs de pathogénicité de la souche en cause et en particulier les variants *stx* considérés comme un facteur prédictif de sévérité des infections.

Cependant, l'isolement de la souche est parfois très difficile et nécessite de pratiquer de nombreuses PCR sur colonies isolées. Cette recherche peut malgré tout s'avérer infructueuse.

### **4. Tests immunologiques :**

De nombreux tests immunologiques permettent la détection du STEC directement dans les selles ou après une phase d'enrichissement en bouillon : tests EIA (*Enzyme ImmunoAssay*), OIA (*Optical ImmunoAssay*), immunochromatographie, etc. Ces tests détectent l'antigène O157 et/ou les toxines Stx. Ils doivent être utilisés selon les instructions strictes des industriels. Ils sont faciles à mettre en oeuvre et constituent lorsqu'ils sont positifs une alerte pour le clinicien. Cependant, aucune étude solide (nombre de selles et durée de l'étude suffisants, contexte épidémique et non-épidémique, technique de référence en parallèle...) publiée n'a permis de mettre en évidence une sensibilité ou une spécificité permettant leur validation à partir des selles. De plus la lecture de ces tests est parfois difficile et ils peuvent donner des résultats faussement positifs par des réactions croisées avec des virus entériques ou d'autres bactéries. Ils doivent toujours être confirmés par des méthodes moléculaires [152].

## 5. Sérologie :

Chez les patients ayant présenté un SHU et dont la recherche de STEC dans les selles s'est révélée négative au moment du SHU, le diagnostic sérologique est particulièrement utile. Il s'agit de mettre en évidence des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharides de la bactérie.

Dans la majorité des infections à STEC, les malades développent, dans les 7 à 10 jours, des anticorps (IgG, IgM et IgA) anti-lipopolysaccharides (LPS) qui sont détectables à un titre souvent très élevé même plusieurs semaines après le début des symptômes.

Le diagnostic sérologique doit être réalisé sur un sérum précoce et un sérum tardif (le plus souvent 2 à 3 semaines après le premier), afin de rechercher une augmentation du titre des anticorps attestant l'infection. Cependant, un titre élevé, même sur un seul sérum, peut parfois être un indicateur fiable d'une infection récente à *E. coli* O157. Actuellement, la détection des anticorps LPS du séro groupe O157, mais aussi d'autres séro groupes (O26, O91, O103, O111, O128, et O145), peut être réalisée par différentes techniques : ELISA, Western-blot, immunoblotting ou hémagglutination indirecte [144].

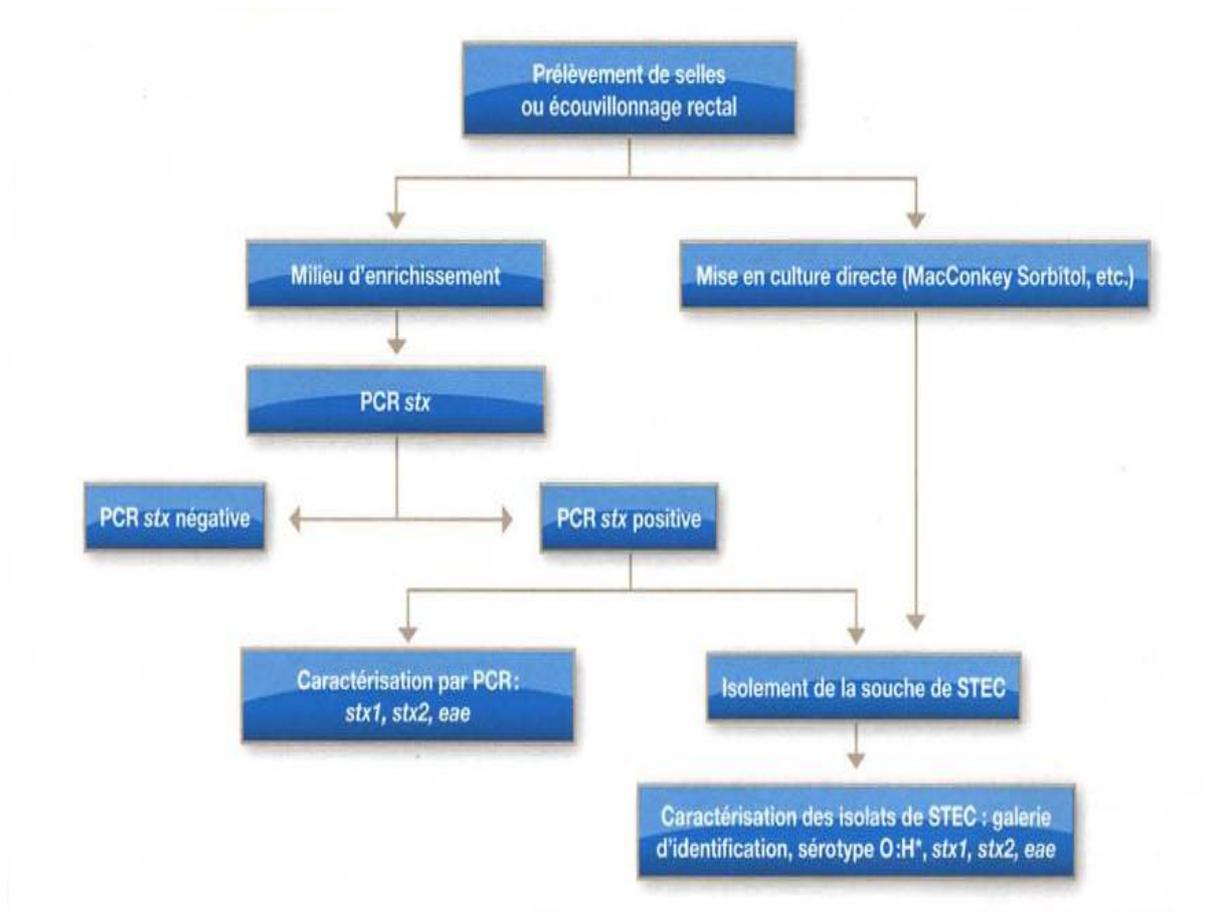
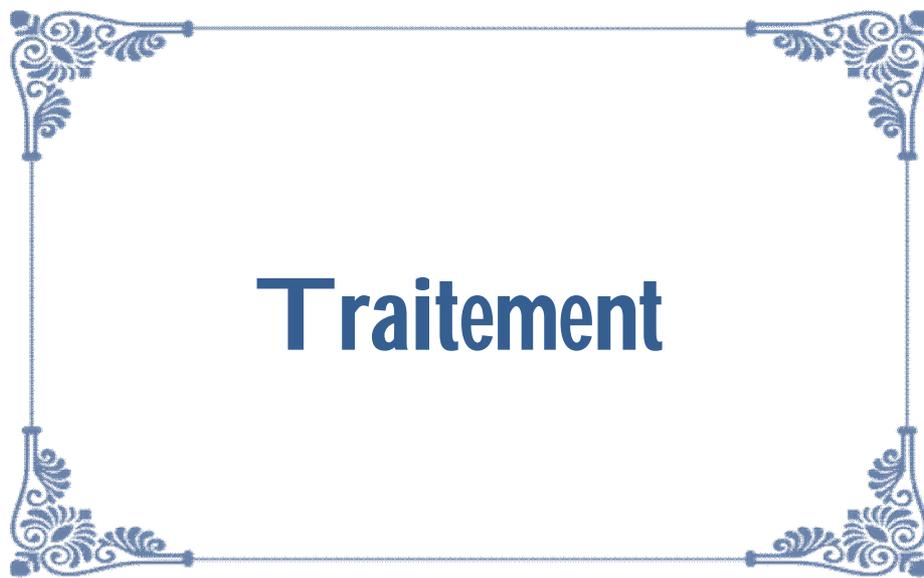


Figure 15 : Etapes du diagnostic des infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxine [144]



## **XI. Traitement :**

Une thérapie de soutien intensive destinée à maintenir l'homéostasie (par exemple, dialyse péritonéale ou hémodialyse, équilibre hydrique et traitement de l'hypertension) est bien sûr le pilier de la prise en charge du SHU. Cependant, la disponibilité de méthodes rapides et sensibles pour le diagnostic de l'infection par STEC au début de l'évolution de la maladie a créé une fenêtre d'opportunité pour une intervention thérapeutique spécifique supplémentaire. Les objectifs des stratégies thérapeutiques seraient triples : limiter la gravité et / ou la durée des symptômes gastro-intestinaux, prévenir les complications systémiques mettant en jeu le pronostic vital, telles que le SHU, et prévenir la propagation de l'infection à proximité contacts.

### **1 Antibiotiques :**

On peut s'attendre à ce que l'antibiothérapie satisfasse à ces trois objectifs. Cependant, des études rétrospectives sur son efficacité dans la prévention de la progression de l'infection par les STEC causée par une diarrhée ou une diarrhée sanglante au SHU ont suscité des doutes. Ces analyses ont été aggravées par les variations des types d'antibiotiques utilisés, le moment du début du traitement en fonction du début du traitement, en fonction du début des symptômes et la possibilité que la gravité de la maladie ait pu influencer la décision de mettre en œuvre une thérapie. Néanmoins, la majorité de ces études suggéraient qu'il n'y avait pas de bénéfice significatif associé à l'administration d'antibiotiques ou que le traitement (pendant ou avant l'infection) augmentait en fait le risque de développer un SHU [152]. Cependant, dans une étude, des patients atteints de SHU à qui on avait administré des antibiotiques au cours du prodrome diarrhéique avaient une maladie moins grave. L'examen de l'utilisation des antibiotiques lors de deux importantes épidémies de STEC causées par O157 : H7 en Ecosse et au Japon a également donné lieu à des résultats contradictoires. Stewart et al. [153] ont trouvé une association significative entre l'utilisation antérieure d'antibiotiques et le développement ultérieur du SHU. De l'autre côté, Takeda et al. [154] ont constaté que la proportion de patients passant d'une diarrhée sanglante au SHU était significativement plus faible lorsque les antibiotiques avaient été administrés dans les 3 jours suivant l'apparition des symptômes, par rapport aux patients non traités ou à ceux ayant reçu des antibiotiques plus

tard au cours de l'infection. Très peu d'études prospectives ont été réalisées, mais Proulx et al. [155], ont constaté que l'administration de triméthoprim-sulfaméthoxazole à des patients infectés par O157 STEC (même tardivement au cours de l'infection) n'empêchait pas l'évolution vers le SHU.

Outre l'absence de preuves irréfutables pour un bénéfice clinique, il existe des arguments théoriques contre l'utilisation d'antibiotiques. Premièrement, bien que STX soit extracellulaire, une grande partie de la toxine reste associée à la surface des cellules STEC. Ainsi, les antibiotiques qui entraînent une lyse cellulaire pourraient en réalité augmenter la quantité de STX libre dans la lumière de l'intestin disponible pour l'absorption systémique. De plus, des études *in vitro* ont montré que le traitement de STEC O157 : H7 avec des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques entraînait une augmentation significative (jusqu'à 50 fois) de la quantité de STX libre dans le milieu de culture. L'effet était surtout prononcé avec des antibiotiques tels que le triméthoprim-sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine, qui interfèrent avec la synthèse de l'ADN bactérien et étaient corrélés à une induction accrue de bactériophages convertisseurs de la toxine [156]. Deuxièmement, Cordovez et al. [157] ont noté un taux élevé de résistance aux antibiotiques chez les STEC. Un traitement empirique avec un médicament approprié pourrait donc conférer un avantage sélectif à STEC par rapport aux autres membres de la flore intestinale et provoquer une prolifération excessive. Les mêmes considérations de risque / bénéfice sont également pertinentes lorsqu'il faut administrer des antibiotiques soit à des porteurs de STEC asymptomatiques pour limiter la propagation de l'infection, soit à des contacts proches non infectés de patients présentant une infection avérée pour prévenir l'acquisition; En effet, les cas de prophylaxie sont affaiblis par les informations selon lesquelles des patients seraient infectés par STEC O157: H7 alors qu'ils suivaient un traitement pour une affection non apparentée avec un antibiotique auquel le STEC était sensible [158]. Des essais contrôlés randomisés plus étendus sont nécessaires pour déterminer si un traitement prophylactique à base d'antibiotiques ou un traitement par antibiotiques peut jouer un rôle dans la maladie à STEC.

Il existe également des raisons valables de ne pas administrer d'agents antimotilité aux patients atteints de maladie diarrhéique causée par les STEC, dans la mesure où ils pourraient entraver l'élimination des STEC de l'intestin et ainsi prolonger l'exposition à STX. En effet, des analyses rétrospectives ont montré que l'administration de ces agents à des patients infectés par le virus O157 : H7 prolongeait la durée de la diarrhée sanglante et augmentait le risque de développer un SHU et des lésions du système nerveux central [159]. À l'heure actuelle, les risques ou les avantages de l'administration d'autres agents antidiarrhéiques tels que le kaolin ou le bismuth ne sont pas connus.

## **2 Stratégies thérapeutiques dirigées contre Stx:**

Comme discuté ci-dessus, Stx est principalement responsable des manifestations cliniques de l'infection à STEC, en particulier des complications systémiques graves. Ainsi, la liaison ou la neutralisation *in vivo* de Stx constitue une alternative thérapeutique intéressante, en particulier eu égard aux risques possibles associés à l'utilisation d'antibiotiques. De telles stratégies peuvent potentiellement limiter la gravité ou la durée de la maladie, mais ne devraient bien entendu pas réduire la transmission des STEC. Des stratégies thérapeutiques exploitant le haut degré de spécificité et la force de l'interaction entre Stx et son récepteur glycolipidique sont en cours de développement. Un agent particulièrement prometteur est Synsorb-Pk (Chembiomed, Edmonton, Canada), composé du composant oligosaccharide de Gb3 (Gala [134] Galb [134] Glc-) lié de manière covalente par l'intermédiaire d'un espaceur à 8 carbones à des particules de silice dérivées de diatomées terre [160]. Synsorb-Pk était capable de lier et de neutraliser Stx1 et Stx2 dans des extraits de polymyxine B de cultures de STEC et dans les fèces de patients atteints de HC et / ou de SHU. Un essai clinique de phase I n'a pas mis en évidence d'effet indésirable associé à une administration par voie orale et Synsorb-Pk a conservé sa capacité de liaison à la Stx même après son passage dans le tractus gastro-intestinal humain [161]. Armstrong et al. [161] ont proposé que, si le traitement par cet agent est commencé suffisamment tôt, si la majeure partie de la Stx libre dans la lumière intestinale est liée, ce qui limite encore absorption systémique et développement subséquent du SHU. Les composés capables de se lier à Stx dans l'intestin pourraient également jouer un rôle en complément de la thérapie antibiotique. Des études préliminaires avec des souris

traitées à la streptomycine ont montré que Synsorb-Pk par voie orale ne protégeait pas les souris contre la provocation orale avec des STEC hautement virulents, mais qu'il retardait la mort d'un jour [162]. Des essais randomisés en double aveugle sur Synsorb-Pk versus placebo, visant à déterminer l'efficacité clinique de Synsorb-Pk chez l'homme infecté par les STEC, sont en cours.

Une limitation probable de Synsorb-Pk ou d'autres agents administrés par voie orale est qu'ils ne seraient pas supposés être actifs contre Stx déjà absorbé par les intestins. Bien que l'absorption de la toxine dans le sang n'ait jamais été démontrée directement chez l'homme ou l'animal, elle est déduite de la génération de lésions vasculaires sur des sites distants. Ainsi, les agents administrés par voie parentérale peuvent présenter des avantages, en particulier du fait que la quantité totale de toxine absorbée ne représente qu'une fraction infime de celle présente dans la lumière intestinale. Des études récentes indiquent que des analogues de récepteurs hydrosolubles pourraient convenir à cette fin. Boyd et al. [163] ont synthétisé un analogue de galabiosyle dimérisé via la position méta du benzène, qui est capable de bloquer les deux sites de liaison Gb3 sur la sous-unité Stx1B. L'analogue protégeait également les cellules Vero contre la cytotoxicité Stx1 et, dans une moindre mesure, contre Stx2.

L'administration par voie parentérale d'anticorps monoclonal anti-Stx2 protège les souris contre les lésions rénales mortelles résultant d'une provocation orale avec STEC. Clairement, les Ig murins ne conviennent pas à l'administration parentérale chez l'homme. Cependant, des anticorps monoclonaux anti-Stx1 et anti-Stx2 ont maintenant été « humanisés » en clonant un ADNc de région variable à partir des lignées cellulaires d'hybridome de souris dans un vecteur d'expression de mammifère, de telle sorte que des anticorps chimériques région / variable de souris chimériques soient produits [164]. La caractérisation in vitro de ces anticorps est en cours. Une alternative aux anticorps monoclonaux humanisés qui pourrait être envisagée est l'Ig humaine hyperimmune de donneurs vaccinés avec l'anatoxine STX, une fois que ces antigènes sont autorisés à être utilisés.

Une caractéristique commune de tous ces agents thérapeutiques proposés est que l'efficacité dépendra probablement du début du traitement, c'est-à-dire avant que des quantités significatives de STX aient été absorbées par l'intestin. En effet, une analyse préliminaire des essais cliniques de Synsorb-Pk suggère que le traitement doit éventuellement commencer dans les 3 jours suivant l'apparition des symptômes [165]. Cela souligne la nécessité de procédures de diagnostic rapides et sensibles. Cependant, ces agents peuvent également être utiles en cas d'épidémie, lorsqu'on sait que des personnes ont été exposées à un véhicule impliqué, ou dans des environnements tels que des centres de la petite enfance ou des maisons de retraite, dans lesquels le risque de transmission secondaire est élevé. Cas sporadique ou index. Dans ces circonstances, une proportion élevée de la population à risque pourrait recevoir un traitement avant même que les symptômes ne deviennent apparents et tirerait ainsi un bénéfice maximal de l'agent thérapeutique.



## **XII. Prévention :**

Le contrôle et la prévention de l'infection par les STEC revêt une importance capitale en raison de l'absence de traitements spécifiques pour ce pathogène puissant. Les tentatives visant à développer des vaccins humains contre les STEC basés sur Stx, les protéines T3SS et les antigènes STEP LPS ont été infructueuses, et les mesures préventives actuelles consistent principalement à rompre le cycle de transmission en contrôlant la contamination des aliments. La plupart des épidémies de STEC passées étaient associées à un non-respect des mesures de contrôle appropriées. La déclaration de *E. coli* O157 : H7 en 1994 en tant qu'adultère du bœuf haché aux États-Unis a abouti à une politique de tolérance zéro et accru la responsabilité légale de l'industrie de la viande [166]. Depuis lors, d'importantes avancées dans les mesures de contrôle avant et après récolte dans l'industrie de la viande, réglementées par le service d'inspection et de contrôle des denrées alimentaires (FSA) de l'USDA, ont contribué à la réduction des épidémies associées à la viande bovine aux États-Unis [167]. Récemment, une mise à jour de la politique du FSIS a classé six nouveaux sérogroupes STEC non-O157 comme adultérants dans la viande de bœuf et nécessitant des tests. Ces souches, appelées «Big Six *E. coli*», incluent les sérogroupes O26, O45, O103, O111, O121 et O145 [168].

### **1. Intervention pré-récolte :**

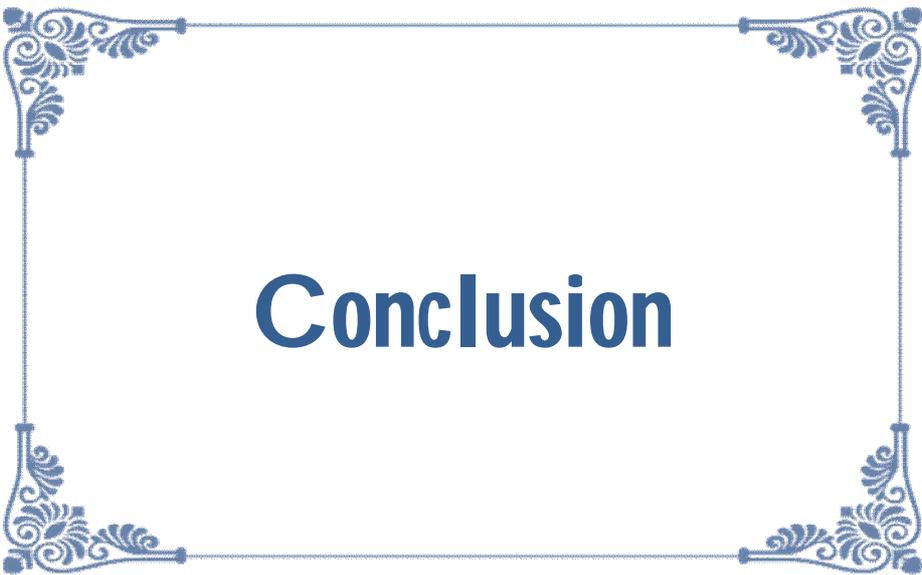
L'intervention pré-récolte réduit la contamination des carcasses de bœuf, qui est étroitement associée à l'excrétion fécale des STEC et à la prévalence de la peau, et réduit également la prévalence environnementale des STEC, diminuant ainsi le risque de contamination d'autres produits alimentaires tels que les légumes à feuilles. Les vaccins qui empêchent la colonisation du bétail par les STEC sont une nouvelle mesure de contrôle avant la récolte. EpiTopix, qui cible les récepteurs des sidérophores et les protéines des porines, est actuellement utilisé dans les vaccins bovins homologués aux États-Unis ; il a été démontré qu'il réduit l'excrétion fécale de *E. coli* O157 : H7. La vaccination des bovins d'engraissement avec les protéines T3SS, indispensables à la colonisation du bétail, a permis de réduire la contamination de l'environnement par les STEC et la fréquence des peaux positives pour *E. coli* O157 : H7. Ce vaccin est disponible dans le commerce au Canada (Econiche MC, Bioniche Life Sciences Inc) et est actuellement homologué aux États-Unis. D'autres vaccins expérimentaux ciblant l'intimin, EspA, et une combinaison de protéines T3SS sont à l'étude.

Les mesures de contrôle avant la récolte comprennent également des probiotiques, des bactériophages et un traitement au chlorate, au sulfate de néomycine et à d'autres suppléments alimentaires. Les probiotiques peuvent prévenir la colonisation en concurrençant les STEC pour des niches environnementales, en produisant des composés antibactériens ou en promouvant un système immunitaire sain. Il a été démontré que *Lactobacillus acidophilus* seul ou associé à d'autres probiotiques réduit l'attaque de *E. coli* O157 : H7 chez les bovins et leur prévalence sur les peaux. Il a été démontré que les bactériophages qui lyse directement le STEC éliminent *E. coli* O157 : H7 *in vitro*, mais les résultats chez les modèles animaux ont été variables. L'USDA examine actuellement le traitement du bovin au chlorate, qui est toxique pour *E. coli* O157 : H7 après sa réduction du tochlorite intestinal. Enfin, les mesures qui contrôlent la persistance des STEC dans le fumier (par exemple, traitement avec un carbonate ou un alcali) ou les surfaces des enclos à bétail (par exemple, en fournissant une litière sèche) peuvent également réduire la prévalence de *E. coli* O157 : H7 [169].

## **2. Intervention post-récolte**

Les mesures post-récolte sont axées sur la réduction de la contamination des carcasses de bovins par les STEC, par lavage de la peau, pasteurisation à la vapeur, lavage à l'acide organique ou à l'eau chaude, ou par une combinaison de ces traitements [170]. En outre, les usines de transformation de bœuf et le FSIS collectent et testent régulièrement des échantillons de bœuf haché et de parures de bœuf pour la contamination par *E. coli* O157 : H7 [167]. En outre, la FDA a récemment approuvé l'irradiation gamma du bœuf haché afin d'éliminer les bactéries contaminantes telles que l'EHEC [171]. En outre, les foyers liés au bœuf haché provenant de restaurants à service rapide aux États-Unis ont été atténués par la hausse des températures de cuisson et ceux associés aux produits laitiers et aux jus de fruits ont été diminués par la pasteurisation [170]. Il est conseillé aux consommateurs de tuer les bactéries contaminantes en faisant cuire du bœuf haché à une température interne de 160 ° F et d'éviter la contamination croisée entre la viande et d'autres produits alimentaires grâce à des pratiques d'hygiène strictes dans la cuisine.

La récente augmentation de la fréquence des épidémies de STEC associées aux légumes a mis en évidence la nécessité de développer des traitements efficaces pour éliminer la contamination par les légumes provenant de STEC. Par rapport aux efforts de prévention de la contamination du bœuf, le développement de mesures de contrôle post-récolte pour d'autres sources alimentaires de STEC est toujours est encore à ses débuts. À cet égard, l'efficacité de plusieurs agents antimicrobiens tels que l'hypochlorite de sodium, l'acide peroxyacétique, l'eau électrolysée acide, le dioxyde de chlore aqueux et l'irradiation est actuellement à l'étude [169].



# Conclusion

Les toxines Shiga sont hautement toxiques pour l'homme. Ils possèdent des domaines catalytiques qui inactivent les ribosomes cellulaires et induisent des dommages cellulaires. La principale cause d'intoxication à la toxine Shiga chez l'homme est l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par les STEC. La toxine nécessite une série d'étapes avant que la toxine puisse exercer sa toxicité sur l'hôte. La toxine doit permettre au STEC d'infecter l'intestin de l'hôte et de générer des chemins pour la translocation de la toxine dans le système circulatoire. La toxine a également besoin de l'aide des porteurs du sang pour les acheminer vers les cellules cibles. Lorsque la toxine arrive aux cellules cibles, elle doit interagir avec les récepteurs spécifiques (principalement Gb3) situés à la surface de la cellule. Elle dépend de voies cellulaires complexes et de mécanismes d'endocytose dans la cellule, de transport rétrograde vers Golgi et réticulum endoplasmique et de libération dans le cytosol. La toxine nécessite également une liaison appropriée avec la structure ribosomale pour exercer son activité d'inactivation des ribosomes. La perturbation de ces étapes du transport de la toxine Shiga protège souvent l'hôte de la toxicité, ce qui permet aux chercheurs d'étudier les stratégies thérapeutiques contre les toxines Shiga. Néanmoins, le meilleur moyen de lutter contre les toxines Shiga est de faire très attention à la qualité des la nourriture et l'eau sont propres et / ou bien cuites / bouillies afin d'éviter toute ingestion de STEC vivants pouvant menacer notre santé.



## Résumé

**Titre :** Production de Shiga-Toxine

**Auteur :** Mlle MATRANE Asmaa

**Rapporteur :** Pr SEKHSOKH Yassine

**Mots clés :** Dysentérie, *Escherichia coli*, Hémolyse, Shiga-toxine.

Les toxines Shiga, sont des toxines particulières codées par les gènes *Stx*. Elles sont sécrétées par certaines souches de bactéries *Escherichia coli* : les *E. coli* produisant des shiga-toxines (STEC), anciennement connues sous le nom de Verotoxin Producing *Escherichia coli* ou *E. coli* produisant des vérotoxines. Elles sont principalement produites par *Shigella dysenteriae* de sérotype 1, qui est un agent intestinal associé aux épidémies de dysenterie bacillaire. Il existe deux types de Shiga-toxines : Type 1 très proche de la Shiga toxine produite par la *Shigella dysenteriae* sérotype et type 2 qui représente moins de 60% d'homologie avec la séquence en acides aminés des Shiga-toxines 1.

Les Shiga-toxines sont les facteurs de virulence essentiels des STEC. Elles appartiennent au groupe des toxines protéiques bactériennes AB5 composées de deux sous unités, et elles ont pour cibles les cellules endothéliales du côlon, des reins et du cerveau chez l'homme. Toutes les souches d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines se caractérisent par la présence dans leur génome des gènes codant pour les Shiga toxines. Ces toxines présentent des homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1.

L'objectif de ce travail est de donner d'une part un aperçu sur la toxine Shiga en décrivant sa découverte, son organisme, sa structure, son mécanisme d'action et sa pathogénicité et de l'autre côté nous avons visé à souligner la symptomatologie clinique associée à la production de ces toxines par les STEC et d'élaborer les méthodes de diagnostic et les modalités thérapeutiques des maladies induites par ces toxines.

## Abstract

**Title:** Shiga-Toxin Production

**Author:** Miss MATRANE Asmaa

**Protractor:** Mr Professor SEKHSOKH Yassine

**Key words:** Dysentery, *Escherichia coli*, Hemolysis, Shiga-toxin.

Shiga toxins are special toxins encoded by Stx genes. They are secreted by certain strains of *Escherichia coli* bacteria: Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC), formerly known as Verotoxin Producing *Escherichia coli* or Verotoxin producing *E. coli*. They are mainly produced by *Shigella dysenteriae* serotype 1, which is an intestinal agent associated with bacillary dysentery epidemics. There are two types of Shiga-toxins: Type 1 very close to the Shiga toxin produced by the *Shigella dysenteriae* serotype and type 2 which represents less than 60% homology with the amino acid sequence of Shiga-toxins 1.

Shiga-toxins (Stxs) are the essential virulence factors of STEC. They belong to the group of AB5 bacterial protein toxins composed of two subunits, and they target the endothelial cells of the colon, kidneys and brain in humans. All strains of *Escherichia coli* producing Shiga toxins are characterized by the presence in their genome of the genes encoding Shiga toxins. These toxins have homologies with the toxin of *Shigella dysenteriae* type 1.

The aim of this work is to give an insight into the Shiga toxin by describing its discovery, its organism, its structure, its mechanism of action and its pathogenicity, and on the other side we aimed to highlight the clinical symptomatology associated with the production of these toxins by the STEC and to elaborate the methods of diagnosis and the therapeutic modalities of the diseases induced by these toxins.

## ملخص

العنوان: إنتاج شيغا - توكسين

المؤلف: أسماء مطران

المشرف: ياسين سخسوخ

الكلمات الأساسية: زحار، الإشريكية القولونية، انحلال الدم، شيغا توكسين

السموم شيغا هي سموم خاصة مشفرة بجينات شيغا – توكسين . يتم إفرازها بواسطة سلالات معينة من بكتيريا الإشريكية القولونية : القولونية المنتجة للسموم شيغا، المعروف سابقا باسم الإشريكية القولونية تنتج فيرو- توكسين.

يتم إنتاجها بشكل رئيسي من جرثومة الشيجلا الزحار المصلي 1، وهو عامل معوي مرتبط بأوبئة الدوسنتاريا العسوية.

تم استخدام مصطلح شيغا – توكسين لأول مرة لتحديد السموم التي تنتجها الشيجلا الزحار المصلي 1 مما أدى إلى مصطلح سموم شبيهة بالشيغا ، أو شيغا-توكسين.

هناك نوعان من سموم الشيغا: النوع الأول قريب جداً من سموم شيغا الذي أنتج بواسطة النمط المشع الشيجلا الزحار والنوع 2 الذي يمثل أقل من 60% من التوائم مع تسلسل الأحماض الأمينية لسموم الشيغا توكسين 1.

السموم شيغا هي عوامل فوعة أساسية لإيشيريشيا كولي المنتجة للشيغا – توكسين .وهي تنتمي إلى مجموعة من سموم البروتين أب5 البكتيرية المكونة من وحدتين فرعيتين ، وتستهدف الخلايا البطانية للقولون والكليتين والمخ في الإنسان.

تتميز جميع سلالات الإشريكية القولونية التي تنتج سموم شيغا بوجود جينوم الجينات التي تقوم بتشفير سموم الشيغا. هذه السموم لديها تماثل مع سموم الشيجلا الزحار من النوع 1.

الهدف من هذا العمل هو إعطاء فكرة عن سموم الشيغا عن طريق وصف اكتشافه ، وكائنه ، وبنيته ، وآلية عمله ومسببه المرضي ، وعلى الجانب الآخر كنا نهدف إلى إبراز الأعراض السريرية المرتبطة بإنتاج هذه السموم من قبل لإيشيريشيا كولي المنتجة شيغا-توكسين ووضع طرق التشخيص والطرائق العلاجية للأمراض الناجمة عن هذه السموم.



# Références

- [1] **O'Brien A.D, Kaper J.B** . Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday today and tomorrow, in: Kaper J.B., O'Brien A.D. (Eds.), *Escherichia coli* and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, ASM, Washington, 1998: 1–11.
- [2] **Keusch G.T, Grady G.F, Mata L.J, McIver J**. The pathogenesis of *Shigella* diarrhea 1. Enterotoxin production by *Shigella dysenteriae* 1, *J. Clin. Invest* 1972; 51: 1212-18.
- [3] **O'Brien A.D, Lively T.A, Chang T.W, Gorbach S.L**. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis, *Lancet* ii, 1983 : 573.
- [4] **O'Brien A.D, Newland J.W, Miller S.F, Holmes R.K, Williams Smith H. Formal S.B.**, Shiga-like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhoea, *Science* 1984; 226: 694–96
- [5] **Stockbine N.A, Marques L.R.M, Newland J.W, Williams Smith H, Holmes R.K, O'Brien A.D.**Two toxinconverting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities, *Infect. Immun* 1986; 53: 135–40.
- [6] **Edward V, O'Loughlina, Roy M, Robins-Browneb.** Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells *Microbes and Infection* 2001; 3: 493–507
- [7] **Gregory Hall, Shinichiro Kurosawa, Deborah J, Stearns-Kurosawa** .Shiga Toxin 120.Jonas Bergan, Anne Berit Dyve Lingelem , Roger Simma , Tore Skotland , Kirsten Sandvig Shiga toxins *Toxicon* 2012; 60: 1085–1107
- [8] **Bergan J, Dyve Lingelem A. B, Simm R, Skotland T, Sandvig K.** Shiga toxins. *Toxicon* 2012; 60 (6):1085-1107.
- [9] **Gamage SD, Patton AK, Hanson JF, Weiss A.** Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infect Immun* 2004; 72(12):7131–39

- [10] **Fogg PC, Saunders JR, McCarthy AJ, Allison HE.** Cumulative effect of prophage burden on Shiga toxin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* 2012; 158(2):488–97
- [11] **Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M.** The CI repressors of Shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of Shiga toxin 2. *J Bacteriol* 2008;190(13):4722–35
- [12] **Charlotte Balière.** Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC. *Microbiologie et Parasitologie*. Université de Bretagne occidentale – Brest 2016. Français.
- [13] **Imamovic, L, E. Ballesté, J. Jofre, M. Muniesa.** Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 76 (17):5693-5701.
- [14] **Rooks, D. J, Y. Yan, J. E. McDonald, M. J. Woodward, A. J. McCarthy, H. E. Allison.** Development and validation of a qPCR-based method for quantifying Shiga toxin-encoding and other lambdoid bacteriophages. *Environmental Microbiology* 2010; 12 (5):1194-1204.
- [15] **Yan Y, Y. Shi, D. Cao, X. Meng, L. Xia, J. Sun.** Prevalence of Stx Phages in Environments of a Pig Farm and Lysogenic Infection of the Field *E. coli* O157 Isolates with a Recombinant Converting Phage. *Current Microbiology* 2011; 62 (2):458-64.
- [16] **Allue-Guardia A, Martinez-Castillo A, and Muniesa M.** Persistence of Infectious Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages after Disinfection Treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 2014; 80 (7):2142-49.

- [17] **Grau Leal, F, P. Quirós, A. Martínez Castillo, and M. Muniesa.** Free Shiga toxin 1 encoding bacteriophages are less prevalent than Shiga toxin 2 phages in extraintestinal environments. *Environmental Microbiology* 2015;17 (11): 4790-4801.
- [18] **Garred , van Deurs B, Sandvig K.** Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 1995; 270:10817–21.
- [19] **Fraser ME, Chernaia MM, Kozlov YV, James MN.** Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1994;1:59–64.
- [20] **Lingwood CA, Binnington B, Manis A, Branch DR.** Globotriaosyl ceramide receptor function—where membrane structure and pathology intersect. *FEBS Lett* 2010; 584:1879–86.
- [21] **Cavanagh JB, Howard JG, Whitby JL.** The neurotoxin of *Shigella shigae*, A comparative study of the effects produced in various laboratory animals. *Br J Exp Pathol* 1956; 37: 272-8
- [22] **Bridgewater FAJ, Morgan RS, Rowson KEK, Wright GP.**The neurotoxin of *Shigella shigae*: Morphological and functional lesions produced in the central nervous system of rabbits. *Br J Exp Pathol* 1955; 36:447-53
- [23] **KeuschGT, JacewiczM, Hirschman SZ.**Quantitative microassay in cell culture for enterotoxin of *Shigella dysenteriae*1. *J Infect Dis*, 1972; 125:539-41
- [24] **Olsnes S, Eiklid K.** Isolation and characterization of *Shigella shigae* cytotoxin. *J Biol Chem* 1980; 255:284-9
- [25] **Brown JE, Griffin DE, Rothman SW, Doctor BP.** Purification and biological characterization of shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1. *Infect Immun* 1982; 36:996-1005

- [26] **J. Robert**, Cantey Shiga Toxin: An Expanding Role in the Pathogenesis of Infectious Diseases *The Journal of Infectious Diseases* May 1985; 151 (5):766-71
- [27] **Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD.** Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2951–88
- [28] **Melton-Celsa, AR.** Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr* 2014; 2(4): 0024-2013
- [29] **Schmitt CK, McKee ML, O'Brien AD.** Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157: H strain E32511. *Infect Immun* 1991; 59: 1065–73
- [30] **Kokai-Kun JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD.** Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J Biol Chem* 2000; 275: 3713–21.
- [31] **Lindgren SW, Samuel JE, Schmitt CK, O'Brien AD.** The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect Immun* 1994; 62: 623–31.
- [32] **Stein P. E., Boodhoo A, Tyrrell J et al,** Crystal structure of the cell-binding B oligomer of vero toxin-1 from *E. coli*. *Nature* 1992; 355:748-50.
- [33] **Jackson M. R, Wadolkowski E. A, Weinstein D. L et al.** Functional analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin type II variant binding subunit by using site-directed mutagenesis. *J. Bacterial* 1990; 172: 653-58.

- [34] **Melton-Celsa, A Kokai-Kun, J, O'Brien A. D.**, Shiga toxins: Activatable or not is just a clip of the tail. In Proceedings of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)—Producing *Escherichia coli* Infections 2000 October 29–November 2, Kyoto, Japan
- [35] **Hovde C. J, Calderwood S. B, Mekalanos J. J et Collier R. J.** Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2568–72.
- [36] **Fagerquist C.K, Sultan O.** Top-down proteomic identification of furin-cleaved a-subunit of Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 using Maldi–Tof–Tof–MS/MS. J. Biomed. Biotechnol 2010: 123–460.
- [36a] **Chiron M.F, Fryling, C.M, FitzGerald, D.J.** Cleavage of Pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. J. Biol. Chem 1994; 269: 18167–76.
- [37] **Garred O, Dubinina E, Polesskaya A, Olsnes S, Kozlov J, Sandvig K.** Role of the disulfide bond in Shiga toxin A-chain for toxin entry into cells. J. Biol. Chem 1997; 272: 11414–19.
- [38] **Fraser M.E, Fujinaga M, Cherney M.M, Melton-Celsa A.R, Twiddy E.M, O'Brien A.D, James M.N.G.** Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. J. Biol. Chem 2004; 279: 27511–17.
- [39] **Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K.** Site of action of a vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. Eur. J. Biochem., 1988; 171: 45–50.
- [40] **Lingwood C.A.** Shiga toxin receptor glycolipid binding. Pathology and utility. Methods Mol. Med 2003; 73: 165–86.

- [41] **Moo-Seung Lee , Sunwoo Koo ,Dae Gwin Jeong 2 ,Vernon L. Tesh 4** Shiga Toxins as Multi-Functional Proteins: Induction of Host Cellular Stress Responses, Role in Pathogenesis and Therapeutic Applications Toxins (Basel) 2016 Mar 17; 8(3):77.
- [42] **Ling, H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings M.D, Armstrong G.D, Brunton J.L, Read R.J.** Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. Biochemistry 1998; 37 : 1777-88.
- [43] **Newland J. W, Strockbine N. A, Neill R. J.** Cloning of genes for the production of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II. Infect. Immun 1987; 5: 2675-80.
- [44] **Smith H. W, Linggood M. A.** The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol 1971; 4: 301-5.
- [45] **Huang A, Friesen J, Brunton J. L.** Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-like toxin I in *Escherichia coli*. f. Bacteriol 1987; 169: 4308-12.
- [46] **Strockbine N. A, Jackson M. P, Sung L. M et al** Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type I.J. Baderiol 1988; 179:1116-22.
- [47] **Habib N. E, Jackson M. P.** Identification of a B subunit gene promoter in the Shiga toxin operon of *Shigella dysenteriae* I. J. Bacterial 1992; 174 :6498-6507.
- [48] **Habib N. E, Jackson M. P.** Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes. J. Baderiol 1993; 175:597-603.

- [49] **Melton-Celsa A. R, O'Brien A. D.** Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin—Producing *E. coli* Strains, Washington: American Society for Microbiology 1998:121-28.
- [50] **Weinstein D. L, Jackson M. P, Samuel J. E et al.** Cloning and sequencing of a Shiga- Uke toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol* 1988; 170: 4223-30.
- [51] **Morabito S, Dell'Omo G, Agrimi U et al.** Detection and characterization of Shiga toxin—producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet. Microbiol* 2001; 82:275-83.
- [52] **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.
- [53] **Zhang W. L, Kohler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A., Suerbaum S, Schmidt H.** Genetic diversity effacing *Escherichia coli* strains. of intimin genes of *J. Clin. Microbiol* 2002; 40: 4486-92.
- [54] **Burk C, Dietrich R, Acar G, Moravek M, Bulte M, Martlbauer E.** Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of 2003; 41: 2106-12.
- [55] **Friedrich A.W, Bielaszewska M, Zhang W.L, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H.** *coli* harboring Shiga toxin *Escherichia2* gene variants : frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis* 2002; 185: 74-84.

- [56] **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: 7549-53.
- [57] **Chahed A, China B, Daube G.** Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines dans les toxi-infections d'origine alimentaire 2007, 151 :215-46.
- [58] **Ito H, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Nishibuchi M.** Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91: H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb. Pathog* 1990 ; 8 : 47-60.
- [59] **Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD, Samuel JE.** Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun* 1993 ; 61:3392–3402.
- [60] **Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MA, Smith MJ, O'Brien DA.** Oral intoxication of mice with Shiga toxin type 2a (Stx2a) and protection by anti-Stx2a monoclonal antibody 11E10. *Infect Immun* 2013; 82:1213–21.
- [61] **Louise, C.B, Obrig T.G.** Specific interaction of *Escherichia coli* 0157: H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect. Dis* 1995; 172: 1397–1401.
- [62] **Kitova EN, Kitov PI, Paszkiewicz E, Kim J, Mulvey GL, Armstrong GD, Bundle DR, Klassen JS.** Affinities of Shiga toxins 1 and 2 for univalent and oligovalent Pk-trisaccharide analogs measured by electrospray ionization mass spectrometry. *Glycobiology* 2007;17:1127–37.
- [63] **Head S, Karmali M, Lingwood C.** Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. Evidence for B subunit modulation of a subunit function. *J. Biol. Chem* 1991; 266: 3617–21.

- [64] **Stearns-Kurosawa DJ, Collins V, Freeman S, Tesh VL, Kurosawa S.** Distinct physiologic and inflammatory responses elicited in baboons after challenge with Shiga toxin type 1 or 2 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2010; 78:2497–2504.
- [65] **Wadolowski E, Sung, L Burris, J, Samuel, J, O'brien A.** Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect. Immun* 1990; 58: 3959–65.
- [66] **Debaleena Basu, Nilgun E, Tumer.** Do the A Subunits Contribute to the Differences in the Toxicity of Shiga Toxin 1 and Shiga Toxin 2 Toxins 2015;7: 1467-85.
- [67] **Bauwens A, Bielaszewska M, Kemper B, Langehanenberg P, von Bally G, Reichelt R, Mulac D, Humpf H.U, Friedrich A.W, Kim K.S.** Differential cytotoxic actions of Shiga toxin1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thromb. Haemost* 2011; 105: 515–28.
- [68] **Karve S.S, Weiss A.A.** Glycolipid binding preferences of Shiga toxin variants. *PLoS One* 2014; 9: 101-73.
- [69] **Di, R Kyu, E Shete, Saidasan H, Kahn P, Tumer N.** Identification of amino acids critical for the cytotoxicity of Shiga toxin 1 and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicon* 2011; 57: 525–39.
- [70] **Pierce M, Kahn J.N, Chiou, J Tumer, N.E.** Development of a quantitative RT-PCR assay to examine the kinetics of ribosome depurination by ribosome inactivating proteins using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. *RNA* 2011; 17: 201–10.
- [71] **Sturm M.B, Schramm V.L.** Detecting ricin: Sensitive luminescent assay for ricin A-chain ribosome depurination kinetics. *Anal. Chem* 2009; 81: 2847–53.

- [72] **Sandvig K, van Deurs B.** Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* 2005; 12: 865-72.
- [73] **Torgersen, Maria L, Engedal, Nikolai, Bergan, Jonas et al.** The intracellular journey of Shiga toxins. *Open Toxinology Journal* 2010; 3(1): 3-12.
- [74] **Arab S, Lingwood CA.** Influence of phospholipid chain length on verotoxin/globotriaosyl ceramide binding in model membranes: comparison of a supported bilayer film and liposomes. *Glycoconj* 1996; 13: 159-66.
- [75] **Mahfoud R, Manis A, Lingwood CA.** Fatty acid-dependent globotriaosyl ceramide receptor function in detergent resistant model membranes. *J Lipid Res* 2009; 50(9): 1744-55.
- [76] **Tam P, Mahfoud R, Nutikka A, et al.** Differential intracellular transport and binding of verotoxin 1 and verotoxin 2 to globotriaosylceramide-containing lipid assemblies. *J Cell Physiol* 2008; 216: 750-63.
- [77] **Saint-Pol A. et al.** Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev. Cell* 2004; 6:525–38
- [78] **Romer W et al.** Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 2007; 450: 670–75.
- [79] **Johannes L, Popoff V.** Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* 2008; 135:1175–87.
- [80] **Bonifacino J. S, Hurley J. H, Retromer.** *Curr. Opin. Cell Biol* 2008; 20: 427–36 .
- [81] **Johannes, Ludger et Romer Winfried.** Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8(2):105.

- [82] **Falguieres, T et al.** Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol. Biol Cell*, 2001;12:2453–68
- [83] **Olsnes S, Reisbig R, Eiklid K.** Subunit structure of *Shigella* cytotoxin. *J. Biol. Chem* 1981; 256:8732–38
- [84] **Yu M, Haslam D. B.** Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect. Immun*, 2005; 73: 2524–32
- [85] **Tesh V.L.** Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol* 2010; 5:431–53.
- [86] **Smith W.E, Kane A.V, Campbell S.T, Acheson D.W.K, Cochran B.H, Thorpe C.M.** Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect. Immun* 2003; 71:1497–1504.
- [87] **Jandhyala D.M, Ahluwalia A, Obrig T, Thorpe C.M.** MAP3Kinase that transduces Shiga toxin- and ricin-induced proinflammatory cytokine expression. *Cell. Microbiol* 2008; 10: 1468–77.
- [88] **Tabas I, Ron, D.** Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell. Biol* 2011; 13:184–90.
- [89] **Lee S Y, Lee M.S, Cherla R.P, Tesh V.L.** Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell. Microbiol* 2008 ;10 :770–80.
- [90] **Hurley B.P, Jacewicz M, Thorpe C.M, Lincicome L.L, King A.J, Keusch G.T, Acheson D.W.K.** Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect. Immun* 1999; 67:6670-77.

- [91] **Liu J, Akahoshi T, Sasahana T, Kitasato H, Namai R, Sasaki T, Inoue M, Kondo H.** Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun* 67 1999: 6203-05.
- [92] **Suzuki A, Doi H, Matsuzawa F, Aikawa S, Takiguchi K, Kawano H, Hayashida M, Ohno S.** Bcl-2 antiapoptotic protein mediates verotoxin II-induced cell death: possible association between Bcl-2 and tissue failure by *E. coli* O157:H7. *Genes Dev* 2000:14, 1734-40.
- [93] **Cherla, Rama P., LEE, Sang-Yun, et Tesh, Vernon L.** Shiga toxins and apoptosis. *FEMS microbiology letters* 2003; 228(2):159-66.
- [94] **Ching J.C.Y, Jones N.L, Ceponis P.J.M, 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.
- [95] **Nakagawa I., Nakata M, Kawabata S et Hamada S.** (1999) Regulated expression of the Shiga toxin B gene induces apoptosis in mammalian fibroblastic cells. *Mol. Microbiol* 1999; 33:1190-99.
- [96] **Fujii, J, Matsui, T, Heatherley D.P, Schlegel K.H, Lobo P.I., Yutsudo T, Ciraolo G.M, Morris R.E et Obrig T.G.** Rapid apoptosis induced by Shiga toxin in HeLa cells. *Infect. Immun* 2003; 71:2724-35.
- [97] **Erwert R.D, Winn R.K, Harlan J.M, Bannerman D.D.** Shiga-like toxin inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression sensitizes endothelial cells to bacterial lipopolysaccharide- induced apoptosis. *J. Biol. Chem* 2002; 277:40567-574.

- [98] **Ansaruzzaman M, Kibriya AKMG, Rahman A, Neogi PKB, Faruque ASG, Rowe B et al.** Detection of provisional serovars of *Shigella dysenteriae* and designation as dysenteriae serotypes 14 and 15. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1423-5.
- [99] **Xavier Nicolas<sup>1</sup>, Hervé Granier<sup>1</sup>, Patrick.** Le Guen<sup>2</sup>Shigellose ou dysenterie bacillaire *Presse Med* 2007; 36: 1606–18.
- [100] **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* 2013; 26: 822–80.
- [101] **Mariani-Kurkdjian P. Bingen É.** Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines *Réanimation* 2012 ;21:268-79
- [102] **Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. 2005; 36(3):289-311.
- [103] **Mamovic L, Muniesa M.** Quantification and evaluation of infectivity of shiga toxin-encoding bacteriophages in beef and salad. *Appl. Environ. Microbiol* 2011; 77 :3536–40
- [104] **Karmali M.A, Gannon V, Sargeant J.M.** Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol* 2010;140 :360–70
- [105] **Karmali M. A, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R et al.** Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol* 2003; 41:4930–40
- [106] **F.Guérin .** Infections à *Enterobacter cloacae* complex : résistance aux antibiotiques et traitement *Journal des Anti-infectieux*, October 2015 ;17(3) : 79-89.

- [107] **Fatma Lakhal , Monia El Bour 1, Bouhawalla Balkis, Amor El Abed.** Etude préliminaire des caractéristiques biochimiques et moléculaires d'*Aeromonas hydrophila* isolées du milieu marin Mar. Life 2005 ; 15 (1-2) : 13-18.
- [108] **Holmes B, Aucken H. M.** Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia and other members of the Enterobacteriaceae. In L. Collier, A. Balows & M. Sussman (Eds.), Microbiology and Microbial infections : Systematic Bacteriology 1998 ; 9: 999-1033.
- [109] **Mariani-Kurkdjian P. Bingen É.** Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines Réanimation 2012 ;21:268-79
- [110] **Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG Jr.** Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol Rev 1996; 18: 29–51.
- [111] **Anonymous.** VTEC O157 infection in West Yorkshire associated with the consumption of raw milk. Commun Dis Rep CDR Wkly 1996; 6:181.
- [112] **Spika JS .** Shiga toxin-producing *E. coli* infections in Canada. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Eds, Kaper JB and O'Brien AD. Washington, D.C.: American Society for Microbiology 1998:23–29.
- [113] **HelgeKarch, Martina Bielaszewska ,Martin Bitzan ,Herbert Schmidt.** Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 1999; 34(3):229-43.
- [114] **Jones IG, Roworth M.** An outbreak of *Escherichia coli* O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. Public Healt 1996; 110: 277–82.

- [115] **Keene WE, McAnulty JM, Hoesly FC, Williams LP Jr, Hedberg K, Oxman GL, Barrett TJ, Pfaller MA, Fleming DW** . A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 1994; 331:579–84.
- [116] **Wang G, Doyle MP** Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot* 1998; 61:662–67.
- [117] **Pavia AT, Nichols CR, Green DP, Tauxe RV, Mottice S, Greene KD, Wells JG, Siegler RL, Brewer ED, Hannon D et al.** Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: Clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr* 1990; 116:544–51.
- [118] **Griffin PM, Tauxe RV.** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991 ;13:60–98.
- [119] **Smith HR, Rowe B, Adak GK, Reilly WJ** . Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Eds, Kaper JB and O'Brien AD. Washington, D.C.: American Society for Microbiology 1998 :49–58.
- [120] **Mead P.S, Griffin P.M.** *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1998; 35: 1207-12.
- [121] **Ranjel J.M, Sparling P.H, Crowe C, Griffin P.M, Swerdlow D.L.** Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks United States, 1982-2002. *Emerg. Inf. Dis* 2005; 11:603-9.
- [122] **Brooks J.T, Sowers E.G, Wells J.G, Greene K.D, Griffin P.M, Hoekstra R.M, Strockbine N.A.** Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis* 2005; 192:1422-29.

- [123] **Cowden JM, Christie P.** Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157. Health Bull Edinb 1997 ; 55:9–10.
- [124] **Es pie E, Haeghe Baerts S, Bouvet P, Gri Mont F, Mariani P, Vaillant V.** Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France, 2002 et 2003. Bull. Epidemiol. Hebd 2004 ; 42 :203-04.
- [125] **Ducoffre G.** Surveillance des maladies infectieuses par un reseau de laboratoires de microbiologie, 2004 : tendances epidemiologiques 1983-2003. [En <http://www.iph.fgov.be/epidemio/epifr/plabfr/plabanfr/index04.htm>].
- [126] **Effler E, Isaacson M, Arntzen L, Heenan R, Canter P, Barrett T, Lee L, Mambo C, Levine W, Zaidi A, Griffin P.M.** Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. Emerg. Infect. Dis 2001; 7 :812-19.
- [127] **Zoja C, Buelli S, Morigi M.** Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. Pediatr Nephrol 2010; 25(11):2231–40.
- [128] **Schüller S.** Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. Toxins (Basel) 2011 ;3(6):626–39
- [129] **Lingwood CA.** Verotoxin/globotriaosyl ceramide recognition: angiopathy, angiogenesis and antineoplasia. Biosci Rep 1999; 19(5): 345–54
- [130] **Brigotti M, Carnicelli D, Arfilli V, Tamassia N, Borsetti F, Fabbri E, Tazzari PL, Ricci F, Pagliaro P, Spisni E, Cassatella MA .** Identification of TLR4 as the receptor that recognizes Shiga toxins in human neutrophils. J Immunol 2013; 191(9):4748–58
- [131] **Keir LS .** Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. Hematol Oncol Clin North Am 2015; 29(3):525–39

- [132] **Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, Sargeant JM, Stapleton J, Angulo FJ, Yeung DH, Kirk MD.** Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog Dis* 2014;11(6):447–55
- [133] **Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B et al.** Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull* 1999; 77:651–66.
- [134] **Fontaine A, Arondel J, Sansonetti PJ.** Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery studied by using a Tox- mutant of *Shigella dysenteriae* 1. *Infect. Immun* 1988; 56:3099–3109.
- [135] **Gyles CL.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci* 2007; 85:45–62.
- [136] **Mead PS, Slutsker L, Dietz V et al.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis* 1999; 5: 607–25.
- [137] **Tarr PI, Gordon CA, Chandler WI.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005 ; 365 :1073–86.
- [138] **Orth D, Grif K, Khan AB, Naim A, Dierich MP, Würzner R.** 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* 2007; 59: 235–42.
- [139] **Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB.** Treatment and outcome of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr. Nephrol* 2008; 23:1749–60.

- [140] **Bell B.P, Goldoft M, Griffin P.M et al.** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience JAMA 1994; 272 (17) : 1349–53.
- [141] **Tarr P.I, Gordon C.A, Chandler W.L.** Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet 2005; 365 (9464) :1073–86.
- [142] **Nevard C.H, Jurd K.M, Lane D.A et al.** Activation of coagulation and fibrinolysis in childhood diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. Thromb. Haemost 1997; 78 (6) :1450–55.
- [143] **Eriksson K.J, Boyd S.G, Tasker R.C.** Acute neurology and neurophysiology of haemolytic-uraemic syndrome. Arch. Dis. Child 2001; 84 (5) : 434–35.
- [144] **Espié, Emmanuelle, Mariani-Kurkdjann P, Filliol, Ingrid et al.** Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France: aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. Revue francophone des laboratoires 2008 ; 400 :59-65.
- [145] **Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO.** *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. J Infect Dis 1990 ; 162 (2) : 553-6.
- [146] **Brugère H, Auvray F, Mariani-Kurkdjian P, King L, Loukiadis E.** *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). Feuillet de Biologie 2013 ; 311 : 1- 8.
- [147] **March S. B, Ratnam S.** Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol 1986; 23:869–72.

- [148] **Beutin L, M. A. Montenegro, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R.** Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol 1989; 27:2559–64.
- [149] **Schmidt H, Karch H.** Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol 1996; 34:2364–67.
- [150] Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Maisons-Alfort : Afssa ; 2003. 220 p. Disponible à : <http://www.anses.fr/Documents/MICRa-STEC.pdf>
- [151] **Paton JC, Paton AW.** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 450-79.
- [152] **Carter A. O, Borczyk A. A, Carlson J. A. K, Harvey B, Hockin J. C, Karmali M. A, Krishnan C, Korn D. A, H. Lior.** A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. N. Engl. J. Med 1987;317:1496–1500.
- [153] **Stewart A. I, Jones G. A, McMenamin J, Chaudhuri A. K. R, Todd W. T. A.** Central Scotland *Escherichia coli* O157 outbreak— clinical aspects, abstr 1997;(211):115.
- [154] **Takeda T, Tanimura M, Yoshino K, Matsuda E, Uchida H, Ikeda N.** Early use of antibiotics for STEC O157:H7 infection reduces the risk of hemolytic uremic syndrome. Presented at the 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc., Melville, N.Y 1997.

- [155] **Proulx F, Turgeon J. P, Delage G, Lafleur L, Chicoine L.** Randomized controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J. Pediatr* 1992; 121:299–303.
- [156] **Wolf L. E, D. W. Acheson, L. L. Lincicome, et G. T. Keusch.** Subinhibitory concentrations of antibiotics increase the release of Shiga toxin from *E. coli* O157:H7 in vitro, *In 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia coli Infections.* Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc., Melville, N.Y abstr 1997; 145: 60.
- [157] **Cordovez A, Prado V, Maggi J, Cordero J, Martinez A, Misraji R, Rios G, Soza A, Ojeda, M. M. Levine.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J. Clin. Microbiol* 1992; 30:2153–57.
- [158] **Tarr P. I.,** *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis* 1995; 20:1–8.
- [159] **Bell B. P, Griffin P. M, Lozano P, Christie D. L, Kobayashi J. M, Tarr P. I.** Predictors of hemolytic uremic syndrome during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 1997 ;100 :127(12).
- [160] **Armstrong G. D, Fodor E, Vanmaele R.** Investigation of Shigalike toxin binding to chemically synthesized oligosaccharide sequences. *J. Infect. Dis* 1991;164:1160–67.
- [161] **Armstrong G. D, Rowe P. C, Goodyer P, Orrbine E, Klassen T. P, Wells G, MacKenzie A, Lior H, Blanchard C, Auclair F, Thompson B, Rafter D. J, McLaine P. N.** A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. *J. Infect. Dis* 1995; 171: 1042–45.

- [162] **Rogers J. E, Armstrong G, O'Brien A. D.** Therapeutic value of Stx-specific antibodies or Synsorb in Streptomycin (STR)-treated mice orally infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) 1997: 114.
- [163] **Boyd B, H. C, Hansen G, Magnusson C. A, Lingwood. A.** divalent galabiosyl analogue inhibits VT1/Gb3 binding in vitro and protects cells against VT1 and VT2 1997; 94: 53.
- [164] **Edwards, A., K. Arbuthnott, J. R. Stinson, H. C. Wong, C. Schmitt, and A. D. O'Brien.** 1997. Humanization of monoclonal antibodies against *Escherichia coli* toxins Stx1 and Stx2 1997;110: 113
- [165] **Armstrong G. D et Rowe P.** Clinical trials of Synsorb-Pk in preventing HUS. Presented at the 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc., Melville, N.Y.1997.
- [166] **Dodd C, Powell D.** Regulatory management and communication of risk associated with *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. Foodborne Pathog. Dis 2009; 6 (6):743–47.
- [167] **Koohmaraie M, Arthur T.M, Bosilevac J.M et al.** Interventions to reduce/eliminate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. Meat Sci 2007; 77 (1):90–6.
- [168] **Kalchayanand N, Arthur T.M, Bosilevac J.M, et al.** Evaluation of commonly used antimicrobial interventions for fresh beef inoculated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157:H7. J. Food Prot 2012; 75 (7):1207–12.

- [169] **Sivapriya KailasanVanaja ,Dakshina M. Jandhyala , Emily M.Mallick , John M, Leong Sowmya Balasubramanian .**Chapter 5 - Enterohemorrhagic and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli**Escherichia coli* (Second Edition) Pathotypes and Principles of Pathogenesis 2013: 121-82
- [170] **Berry E.D, Wells J.E.** *Escherichia coli* O157:H7 recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. Adv. Food Nutr. Res 2010; 60: 67–117.
- [171] **Hijaz, F.M., Smith, J.S.**Levels of 2-dodecylcyclobutanone in ground beef patties irradiated by low-energy X-ray and gamma rays. J. Food Sci 2010; 75 (9): 156– 60.
- [172] **AFSSA.** Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d’une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l’avis Afssa du 15 juillet 2008. Maisons-Alfort: Afssa 2010:19.
- [173] **Johannes, Ludger, Romer, Winfried.** Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications. Nature Reviews Microbiology 2010 ; 8(2) : 105.



## *Serment de Galien*

*Je jure en présence des maîtres de cette faculté :*

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس  
كلية الطب والصيدلة  
- الرياض -

قسم الصيدلي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَأَحْسِنُ بِاللَّهِ وَالْعَظِيمِ

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- ◀ أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأداب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- ◀ لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



المملكة المغربية  
جامعة محمد الخامس بالرباط  
كلية الطب والصيدلة  
الرباط



جامعة محمد الخامس بالرباط  
Université Mohammed V de Rabat

أطروحة رقم: 09

سنة : 2019

## إنتاج شيغا - توكسين

### أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : / / 2019

### من طرفه

السيدة أسماء مطران

المزادة في 28 فبراير 1993 بسطات

لنيل شهادة

دكتور في الصيدلة

الكلمات الأساسية : زحار؛ الإشريكية القولونية؛ انحلال الدم؛ شيغا- توكسين

### أعضاء لجنة التحكيم:

رئيس

السيد أحمد كاوزي

أستاذ في طب الأطفال

مشرف

السيد ياسين سخسوخ

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

عضو

السيدة سعيدة طلال

أستاذة في الكيمياء الحيوية

عضو

السيد خليل أبو العلاء

أستاذ في الإنعاش والتخدير