



HAL
open science

DIARRHEE du NOUVEAU-NE : PROPRIETES et MECANISMES d'ACTION DES ESCHERICHIA COLI ENTEROPATHOGENES CHEZ LE VEAU ET LE PORCELET

H.C. Dubourguier, Ph. Gouet, M. Contrefois, J.P. Girardeau

► **To cite this version:**

H.C. Dubourguier, Ph. Gouet, M. Contrefois, J.P. Girardeau. DIARRHEE du NOUVEAU-NE : PROPRIETES et MECANISMES d'ACTION DES ESCHERICHIA COLI ENTEROPATHOGENES CHEZ LE VEAU ET LE PORCELET. Annales de Recherches Vétérinaires, 1978, 9 (1), pp.129-152. <hal-00900985>

HAL Id: hal-00900985

<https://hal.science/hal-00900985v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**DIARRHÉE du NOUVEAU-NE : PROPRIÉTÉS et MÉCANISMES d'ACTION
DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATHOGENES
CHEZ LE VEAU ET LE PORCELET**

H.C. DUBOURGUIER, Ph. GOUET, M. CONTREPOIS, J.P. GIRARDEAU

Laboratoire de Microbiologie, I.N.R.A. - C.R.Z.V. de Theix, 63110 Beaumont - France

Summary

DIARRHOEA OF THE NEWBORN : CHARACTERISTICS AND PATHOGENIC MECHANISMS OF ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN THE CALF AND THE PIGLET. A REVIEW. — The present knowledge of the enteropathogenic characteristics of *Escherichia coli* (adhesion and toxinogenesis) is reviewed in the calf, and compared with piglet data.

A pathogenic model of *E. coli* diarrhoea in the calf is proposed, taking into account the electromyographic, bacteriologic and physiologic data.

PLAN

1. Introduction
2. Ubiquité d'*Escherichia coli*
3. Sérotypes
4. Attachement à la muqueuse intestinale
5. Hémolysines
6. Endotoxines
7. Enterotoxines
 - 7.1. DETERMINATION DU POUVOIR ENTEROTOXINOGENE
 - 7.2. PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*
 - 7.3. PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VIVO*
 - 7.4. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ENTEROTOXINE THERMOSTABLE
 - 7.5. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ENTEROTOXINE THERMOLABILE
 - 7.6. DETERMINISME GENETIQUE

7.7. IMMUNOGENICITE ET SERONEUTRALISATION

8. Action physiologique des entérotoxines
9. Site de la sécrétion induite
10. Récepteurs cellulaires
11. Transport intestinal des ions
12. Action de l'entérotoxine thermostable sur le transport des ions
13. Rôle de l'AMP-cyclique
14. Inhibiteurs de la sécrétion induite
15. Conclusion

1. Introduction

Cinquante pour cent des maladies du veau nouveau-né se rattachent à un syndrome complexe dont un des symptômes majeurs est la présence de diarrhée. Des observations très anciennes (Jensen 1893, Dyar et Keith 1894, Nocard et Leclainche 1898...) avaient déjà souligné la présence dans le sang et en nombres anormalement élevés

dans les fèces d'*Escherichia coli*. Des études épidémiologiques plus récentes effectuées en France (Renault 1970, Contrepois et Gouet 1972, Scherrer *et al.* 1975, Gouet, Contrepois, Bordas non publié), aux U.S.A. (White *et al.* 1970, Sivaswamy et Gyles 1976, (Woode *et al.* 1974, Kilkenny et Rutter 1975), Moon *et al.* 1976), en Grande-Bretagne et en Belgique (Thomas 1975) confirment la grande fréquence d'*Escherichia coli* (30 à 60 % des fèces d'animaux diarrhéiques) mais révèlent aussi la présence de Rotavirus dans 50 à 60 % des cas. C'est encore au cours de ces dernières années que des résultats originaux ont apporté des preuves concrètes de la pathogénicité de certains types d'*E. coli* impliqués dans ces diarrhées et de leurs mécanismes d'action : présence d'antigènes d'attachement (K88 et K99) à la muqueuse intestinale, sécrétion d'entérotoxines thermostables et (ou) thermolabiles, déterminisme génétique de ces caractères par des plasmides, action physiologique de ces entérotoxines. Cette revue se propose de faire le point des résultats actuellement obtenus dans l'ensemble de ces domaines.

2. Ubiquité d'*E. coli*

La microflore digestive des veaux nouveau-nés sains ou diarrhéiques a été principalement décrite par Smith et Orcutt (1925) puis plus récemment par Smith (1962, 1965), Contrepois et Gouet (1973, 1977) et Hillaire (1976). Dès les premières heures de la vie (Smith 1965), *E. coli* non pathogène s'implante dans l'intestin du veau sain, mais seulement à partir de l'iléon où il atteint 10^5 - 10^6 /g et surtout au niveau du gros intestin (10^9 /g.) L'état diarrhéique se caractérise par un accroissement considérable des colibacilles dans le duodénum et le jéjunum qui peuvent atteindre et dépasser 10^9 /g de contenu. Dans la plupart des cas, les sérotypes isolés sont entérotoxigènes. A côté d'*E. coli* une flore très importante en nombre et variée dans ses espèces et biotypes va s'implanter. Les différents segments du tube digestif vont créer autant de niches écologiques particulières et entraîner des variations importantes dans la composition de la microflore. Chez les veaux sains *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus fermenti* s'implantent dès la caillette (10^5 - 10^6 /g) et le jéjunum où ils dominent très nettement

Streptococcus faecium et *Streptococcus avis* (10^2 /g). Au-delà on retrouve à des niveaux comparables (10^9 à 5.10^9 /g) *Lactobacillus*, *Streptococcus* et de nombreux genres d'anaérobies stricts : *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*.

Chez le veau diarrhéique, l'augmentation du nombre d'*E. coli* dans l'intestin grêle est accompagnée d'une élévation sensible des différentes espèces composant la microflore (Smith 1962, Hillaire 1976, Contrepois et Gouet 1977) pouvant traduire une hypomotricité de la caillette et de l'intestin grêle. Pour Smith (1962) ces nombres doublent ou triplent chez les veaux diarrhéiques ayant reçu du colostrum alors que l'accroissement atteint 10 fois pour les *Lactobacillus*, 10 à 100 fois pour les *Clostridium* chez les veaux privés de colostrum. Qualitativement Hillaire (1976) et Gouet (non publié) observent parmi les *Lactobacillus* une domination importante de *L. fermenti*, espèce hétérofermentaire, et ce depuis la caillette. Ces souches croissent en colonies irrégulières ouatées ou floconneuses et n'apparaissent pas chez le veau sain. Ceci contredit les résultats de Smith (1962) qui observe aussi bien chez les veaux sains que diarrhéiques des colonies « irrégulières » de lactobacilles sans autres précisions. Il faut enfin souligner le développement simultané et la coexistence parfaite de *Lactobacillus* et d'*E. coli* dès le duodénum chez le veau malade et dans le côlon et le cæcum du veau sain.

Escherichia coli est donc un hôte normal de l'intestin des mammifères où il constitue l'un des éléments d'une microflore complexe. Mais il faut distinguer à l'intérieur de cette espèce de nombreux biotypes caractérisés par un pouvoir pathogène et l'aptitude à survivre ou proliférer dans un environnement écologique donné. Ces biotypes peuvent être dépendant des nombreux plasmides et épisomes (ADN extra-chromosomal généralement transférable) qui codent pour des caractères particuliers. Les plus connus des généticiens sont les facteurs F de sexualité, les facteurs R de résistance aux antibiotiques et les plasmides Col responsables de la production de colicine. Ces ADN extra-chromosomaux peuvent aussi coder pour des caractères conférant à *E. coli* des avantages sélectifs (K99, Col V, K88) ou des fonctions pathogènes (Vir, Ent, Hly). Dans ces conditions, une telle espèce bactérienne ne peut être considérée comme responsable d'une

maladie sur le seul critère de son isolement, contrairement à des germes hautement pathogènes tels que *Clostridium novyi*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus anthracis*.

Il est donc nécessaire de compléter l'identification des souches d'*E. coli* isolées d'animaux malades, par la mise en évidence de certains de ces caractères spécifiques.

3. Sérotypes d'*Escherichia coli*

Les *Escherichia coli* peuvent posséder 3 types d'antigènes distincts :

— Les antigènes O ou antigènes somatiques localisés au niveau de la paroi et constituant l'endotoxine thermostable.

— Les antigènes K ou antigènes d'enveloppe. Ils sont subdivisés en trois groupes selon leur stabilité à la chaleur. Ils sont dits de type L si le chauffage à 100°C pendant une heure détruit leur antigénicité et leur affinité pour les sérums anti-K correspondants. Ils sont dits de type B s'ils perdent, dans les mêmes conditions, leur antigénicité mais conservent leur affinité. Les antigènes K de type A sont stables à 100°C mais sont détruits par chauffage à 121°C pendant deux heures.

— Les antigènes H ou antigènes flagellaires.

Chez l'Homme, certains sérotypes sont particulièrement fréquents dans les diarrhées néo-natales. Ce sont :

0111:KA(B)	0119:K14(B)
055:K5(B)	0124:K17(B)
026:K6(B)	0125:K15(B)
086:K7(B)	0126:K16(B)
0129:K12(B)	0127:K8(B)

Chacun de ces sérotypes d'origine humaine peut être mobile ou immobile et dans ce cas, il possède un antigène flagellaire de type H variable (Andremont 1976). Ces sérotypes sont reconnus comme ayant un pouvoir entéropathogène susceptible de provoquer des épidémies en milieu hospitalier. Mais il ne faut pas en déduire que le pouvoir pathogène est dû à la possession des antigènes cités. En effet, certains *Citrobacter* non pathogènes peuvent avoir les mêmes antigènes O et K que certains *E. coli* entéropathogènes (Le Minor 1974). De plus, certaines souches d'*E. coli* appartenant à ces sérotypes ne sont pas entérotoxigènes (Andremont 1976).

Chez le porcelet, on rencontre fréquemment les sérotypes 08, 09, 0101, 0138, 0149 et 0141 (Lapas 1970), associés le plus souvent à un antigène capsulaire particulier, K88 (Renault *et al.* 1975).

Chez le Veau, une étude portant sur 525 souches isolées de 216 veaux diarrhéiques (Vallée *et al.* 1970) a permis l'identification de l'antigène O de 318 d'entre elles. Leur fréquence est variable selon le sérotype :

08	13,07 %
09	11,11 %
0101	9,15 %
011	7,84 %
086	5,88 %
021, 0143, 0145	4,57 %
068, 0118	3,26 %
04, 06, 023	2,61 %

Renault (1970) confirme l'existence de ces sérotypes prédominants en France. Mais une étude systématique a montré que dans un même élevage bovin de l'I.N.R.A., les sérotypes d'*E. coli* variaient d'une année à l'autre. Ainsi, le sérotype 0101 qui était impliqué chez 48 % des animaux malades en 1971 était absent en 1972 dans cet élevage (Contrefois et Gouet, 1972).

La sérologie est un moyen complémentaire de classification et d'identification présomptive des *E. coli* entéropathogènes mais ne peut en aucun cas élucider le mécanisme de la diarrhée. De plus, la tentative de vaccination basée sur les sérotypes les plus fréquemment rencontrés se traduit par un échec (Contrefois et Gouet, 1972). Il est donc essentiel de tenir compte d'autres facteurs associés directement à la pathogénicité, en particulier l'attachement à la muqueuse intestinale et la production de toxines.

4. Attachement d'*Escherichia coli* à la muqueuse intestinale

Dès 1925, Smith et Orcutt avaient remarqué la disposition en « paquets » d'*E. coli* dans l'intestin grêle des veaux nouveau-nés atteints de diarrhée. Par ailleurs, Briggs *et al.* (1951) pensaient que le pouvoir protecteur du colostrum chez le veau était lié à la présence d'anticorps anti-K. Ces deux observations remarquables pour l'époque, ne furent pas exploitées.

Pour peu que le milieu leur soit favorable, l'attachement des bactéries à la muqueuse

intestinale leur confère un avantage « sélectif » dans la mesure où leur nombre sera moins dépendant du transit intestinal. Cet attachement est connu chez les bactéries non pathogènes (Gibbons et Van Houte, 1971, Fuller 1975) et chez les *E. coli* entéropathogènes.

Chez le porcelet diarrhéique, Arbuckle (1970) avait montré qu'*E. coli* était essentiellement localisé dans le mucus couvrant les villosités le long des bordures en brosse. Cette affinité particulière est indépendante de la production de mucinase puisque certaines souches non pathogènes et productrices de cette enzyme restent localisées dans la lumière intestinale (Arbuckle 1971). En microscopie électronique à transmission, les cellules bactériennes sont contiguës aux villosités et sont entourées d'un halo transparent aux électrons (Bertschinger *et al.* 1972). Parallèlement à ces travaux, Smith et Linggood (1971) attribuaient cette adhérence à l'antigène K88 spécifique des souches entéropathogènes d'*E. coli* d'origine porcine. Cette structure codée par un plasmide transférable favorise la prolifération *in vivo*, dans les segments antérieurs du tube digestif de jeunes porcelets. *In vitro*, seules les bactéries K88⁺ adhèrent aux cellules épithéliales de porcelets. Ces propriétés d'attachement sont inhibées par un sérum anti-K88 (Jones et Rutter 1972). A la différence des autres antigènes d'enveloppe, l'antigène K88 n'est pas polysaccharidique, mais protéique. L'analyse des acides aminés constitutifs révèle un fort taux de thréonine, d'acide aspartique et d'acide glutamique. Il ne contient ni cystéine, ni cystine. Morphologiquement, l'antigène K88 se présenterait comme de fins filaments à la surface des cellules bactériennes. Il leur confère des propriétés d'hémagglutination résistante au mannose, ce qui le différencie des fimbriae connus chez *E. coli* (Stirm *et al.* 1967).

En 1972, Smith et Linggood ont mis en évidence un antigène K commun (K « Co ») aux souches d'origine bovine et d'origine ovine qui a été inclus en 1975 (Orskov *et al.*) dans la nomenclature internationale sous le nom de K99. Comme le K88, l'antigène K99 est codé par un plasmide qui peut être ôté d'une bactérie par l'orangé d'acridine ou transféré dans une souche réceptrice par conjugaison. Cependant, ce plasmide ne serait pas autotransférable et nécessiterait une mobilisation par un plasmide de résis-

tance ou un plasmide (Ent) [Falkow *et al.* 1976]. Le curage par l'orangé d'acridine a été utilisé par Smith et Linggood (1972) pour obtenir une souche 08:K85,K99 à partir d'une souche 08:K85,K99⁺ d'origine bovine. Seuls les agneaux inoculés avec la souche K99⁺ ont eu la diarrhée et avaient un grand nombre d'*E. coli* dans l'intestin grêle. La fonction de l'antigène K99 est donc de favoriser le développement anormal d'*E. coli* dans l'intestin grêle de manière analogue à l'antigène K88 (Smith et Linggood 1971, Jones et Rutter 1972).

In vitro, la présence du plasmide K99 permet aux cellules bactériennes d'adhérer aux bordures en brosse isolées de muqueuse bovine. Comme l'antigène K88, de très fins filaments dénotent la présence de K99 (Burrows *et al.* 1976). Sa purification a été réalisée récemment par plusieurs équipes. Isaacson (1977) confirme une structure protéique et sépare par chromatographie sur DEAE-cellulose l'affinité pour un sérum anti-K99 et l'activité hémagglutinante résistante au mannose. Morris *et al.* (1977) proposent une nature glyco-protéique. Les expériences d'inhibition d'hémagglutination réalisées par ces auteurs indiqueraient qu'un groupement N-acétyl-glucosamine serait impliqué dans le (ou les) site responsable de l'activité hémagglutinante. Selon Selwood et Gibbons (communication personnelle) l'antigène K99 aurait un PM supérieur à 2 M, car il est exclu sur Sépharose 2B. En fait Girardeau *et al.* (travaux non publiés) ont isolé une substance, par précipitation à pH 4,5 et ultracentrifugation, d'un PM supérieur à 15 M.

L'identité de l'activité HMR et de l'antigène K99 n'est pas encore évidente. En effet, Tixier et Gouet (1975) avaient mis en évidence une hémagglutination résistante au mannose (HMR) vis-à-vis d'hématies de cheval spécifiques des souches entérotoxinogènes d'origine bovine, puis émis l'hypothèse que HMR et K99 étaient identiques. En 1976, Burrows *et al.* puis Guinee *et al.* en 1977, ont fait la même assimilation qui nous semble maintenant devoir être nuancée. En effet, dans nos recherches, nous n'avons jamais mis en évidence de souches HMR K99⁺ mais nous avons rencontré des souches HMR K99⁻. Si HMR et K99 appartiennent réellement à la même structure, l'existence de telles souches pourrait être due à une différence de sensibilité des tech-

niques de détection. Mais on peut avancer l'hypothèse que K99 n'est pas transférable seul (Falkow *et al.* 1976) et qu'il devrait être mobilisé par un autre plasmide codant en particulier pour l'antigène HMR.

Dans ces conditions, toute souche K99⁺ serait HMR, mais les deux structures étant différentes, il serait possible de les dissocier (Isaacson 1977). Cette hypothèse reste à confirmer mais soulève deux problèmes importants : les fins filaments observés en microscopie électronique sont-ils la structure K99 ou la structure HMR ? L'attachement est-il dû à l'antigène K99 ou à HMR ?

Quoi qu'il en soit, le rôle *in vivo* de K99 (ou de HMR) démontré chez l'agneau par Smith et Linggood (1971) a été confirmé chez le veau conventionnel. Une souche B41 Ent⁺K99⁺ d'origine bovine est retrouvée à raison de 10⁶ bact/g de fèces 7 jours après administration orale chez le veau conventionnel et on la retrouve encore pendant plus de 15 jours. Par contre, la même souche, curée de plasmide K99 n'est plus qu'à 10³ bact/g de fèces, 7 jours après l'inoculation et une souche d'*E. coli* K12 est éliminée en 3 jours. Par contre, si elle reçoit un plasmide Ent conjointement ou non à un plasmide K99, la souche est à 10⁴ bact/g de fèces 7 jours après inoculation et encore présente 11 jours après. Les expériences ayant été menées chez le veau conventionnel âgé de 5 à 10 jours, Falkow *et al.* (1976) concluent que l'antigène K99 peut conférer un avantage aux souches pathogènes dans les premiers jours de la vie, mais que cet avantage est perdu très rapidement. Par contre, selon eux, le plasmide (Ent) conférerait une persistance plus importante des souches porteuses de ce plasmide soit par production d'entérotoxines, soit par un autre gène codé par le même plasmide. En fait, dans l'hypothèse où les veaux utilisés ont reçu un colostrum riche en anticorps anti K, ce que les auteurs ne précisent pas, les résultats de ces expériences peuvent être faussés.

L'attachement d'*Escherichia coli* semble donc nécessaire à l'expression de la pathogénicité que ce soit chez le porc, chez l'agneau ou chez le veau. Les antigènes d'attachement (K88 ou K99) favoriseraient l'action des toxines de par la localisation des cellules bactériennes. La multiplication bactérienne accrue au contact de la muqueuse permettrait une action plus efficace des

entérotoxines en particulier. L'utilisation de ce type de marqueur en épidémiologie est donc très importante. Elle devrait permettre l'identification des *E. coli* entéropathogènes, car toutes les études effectuées à ce jour montrent que ce type particulier d'antigène est obligatoirement associé à la présence du plasmide (Ent) [Tixier et Gouet 1975, Moon *et al.* 1976, Guinee *et al.* 1976]. Mais des précautions particulières doivent être prises pour l'isolement des souches d'*E. coli* compte tenu de l'instabilité de ces caractères. L'antigène K99 est perdu dans la plupart des cas lors du passage des *E. coli* sur des milieux tels que le DCA ou le Mac Conkey, sans doute par la présence de sels biliaires (Guinee *et al.* 1977). De plus, ce critère est une étape dans les recherches épidémiologiques, car toutes les souches Ent⁺ ne possèdent pas ce caractère. Celles-ci seraient porteuses d'autres antigènes d'attachement, mais ces derniers ne sont encore qu'hypothétiques (Guinee *et al.*, Moon *et al.* 1977).

5. Hémolysines

La plupart des souches d'*E. coli* isolées de la maladie de l'œdème du porcelet, et même de diarrhée du porcelet, ont un pouvoir hémolytique *in vitro* (Sojka 1965). L'hémolysine d'*E. coli* est une exotoxine protéique de poids moléculaire élevé (PM = 580 000) dont l'injection intraveineuse n'est pas mortelle chez la souris ou le lapin et ne provoque pas l'accumulation de fluide dans les anses ligaturées de lapin. Par contre, l'injection intradermique provoque un œdème important (Rennie et Arbuthnott 1974), cette toxine est rare chez les souches d'origine bovine et n'intervient donc pas dans la diarrhée du veau nouveau-né.

6. Endotoxines

Les endotoxines sont des substances faisant partie de la paroi de certaines bactéries. Libérées lors de la lyse des cellules bactériennes elles peuvent jouer un rôle important dans un grand nombre de maladies par leurs effets locaux et généraux. Elles sont le plus fréquemment rencontrées dans les formes « smooth » des bactéries Gram négatives, notamment chez les *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae*, *Brucella* et *Pas-*

teurella mais elles ont aussi été mises en évidence chez des bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Fusobacterium* et *Sphaerophorus* (Hofstad et al. 1972).

Les endotoxines d'*E. coli* sont liées aux antigènes somatiques « O » complexes de nature glucido-lipidoprotéique (Sojka 1965). Elles se caractérisent par la présence d'une fraction phospholipidique particulière appelée « lipide A ». Ce lipide contient notamment de l'acide β -hydroxymyristique. Il est lié à la fraction protéique par liaison covalente. La toxicité des endotoxines est en grande partie due à la présence de ce lipide (Wober et Alaupovic 1971). Les techniques classiques de détection des endotoxines sont soit l'induction de fièvre chez le lapin, soit la gélification d'un lysat d'amebocytes du crabe *Limulus* (Cooper et al., 1971).

Les réactions aux endotoxines sont très variables suivant l'espèce animale et selon l'individu (Van Miert et Frens 1968). Des stress divers tels que l'environnement ou l'alimentation (Osborne et Meredith 1970) ainsi que l'âge du sujet (Davis et Colmano 1971) modifient la sensibilité aux endotoxines. Cependant, chez la plupart des espèces animales, elles induisent une augmentation de la température rectale (Nielsen et Clugston 1971, Kadlecova et al. 1972, Cooper et al. 1971), accompagnée chez le lapin d'une chute brutale et prononcée de la température de l'oreille liée à une vasoconstriction (Castrova et al. 1972). Le système lymphocytaire joue un rôle essentiel dans les réactions thermiques (Zweifach et Janoff 1964, Castrova et al. 1972). Le système nerveux est également affecté par les endotoxines. L'atonie et la perte d'appétit sont la règle chez le porc (Nielsen et Clugston 1971) et chez le cobaye (Bibinova et al. 1972). Chez le rat, Kadlecova et al. (1972) ont observé que les phases de sommeil lent et paradoxal sont réduites. L'état de stress, induit par l'injection d'endotoxines, se traduit par une glycolyse accrue (Woods et al. 1961). Chez le porc, l'hypoglycémie s'accompagne d'une augmentation du taux de corticostéroïdes (Davis et Colmano 1971). Les endotoxines induisent par ailleurs une leucopénie marquée, soit par fixation locale des lymphocytes, soit par lyse des ces cellules (Van Miert et Frens 1968, Wray et Thomlinson 1972). Chez le rat, les endotoxines induisent une hypotension, une diminution du débit cardiaque et une

acidose métabolique sévère (Parratt et Winslow 1974). Chez le veau, on observe une hypertension pulmonaire liée à une vasoconstriction capillaire. Celle-ci entraîne par ailleurs, une diminution de la pO_2 sanguine (Reeves et al. 1972). Les observations de Reece et Wahlstrom (1973) sont comparables et dénotent une tachycardie importante et une acidose sanguine sévère. L'injection I.V. de doses mortelles (Wray et Thomlinson 1972) induit des lésions sévères du tube digestif en particulier une infiltration de la sous-muqueuse par des éosinophiles et des neutrophiles ainsi qu'un œdème abomasal dans certains cas. Ces mêmes auteurs ont par ailleurs démontré la possibilité de phénomènes d'anaphylaxie passive dus au colostrum, pouvant potentialiser la toxicité des endotoxines d'*E. coli*. L'apparition de diarrhée dépend de l'espèce animale. Elle est liée à une inflammation intestinale. Chez le porc, la défécation est plus abondante et plus liquide sans que l'on puisse parler de diarrhée (Nielsen et Clugston 1971). Chez le veau, l'injection d'endotoxines induit des sécrétions de mucus importantes mais pas de diarrhée (Wray et Thomlinson 1972). Par contre, l'injection simultanée d'endotoxines et de réserpine se traduit par une déshydratation très rapide entraînant la mort de l'animal (Verdura 1972).

Il est donc probable que les endotoxines jouent un rôle dans la diarrhée néo-natale des veaux en induisant des perturbations circulatoires générales et des inflammations et (ou) des œdèmes intestinaux. Mais elles ne sont pas responsables de la sécrétion de fluide par l'intestin.

7. Entérotoxines

Une souche bactérienne est dite entérotoxinogène lorsqu'elle est capable d'induire un flux net d'eau et d'électrolytes vers la lumière de l'intestin au travers de la muqueuse, les bactéries elles-mêmes restant localisées dans la lumière intestinale. Cette propriété est associée à une exotoxine à tropisme intestinal, appelée entérotoxine. De telles substances ont été trouvées chez *Vibrio cholerae* (De et Chatterjee 1953), *Shigella dysenteriae* (Keusch et al. 1972), *Staphylococcus aureus* (Sullivan 1969), *Clostridium perfringens* (Duncan et Strong 1969),

Pseudomonas aeruginosa (Kubota et Liu 1971). *Salmonella typhi* induit également une sécrétion de fluide dans l'intestin, mais l'intervention d'une entérotoxine n'a pas été démontrée (Giannella et al. 1973). Nous n'envisagerons dans cet article que les entérotoxines d'*E. coli* en faisant parfois appel à des notions acquises avec la toxine cholérique. Précisons dès maintenant que deux entérotoxines ont été mises en évidence à partir d'*E. coli*, l'une nommée thermolabile (TL - Gyles et Barnum 1969), l'autre thermostable (TS - Smith et Halls 1967).

7.1. DETERMINATION DU POUVOIR ENTEROTOXINOGENE

— Les anses ligaturées d'intestin grêle ont été le premier modèle utilisé. La méthode consiste à isoler entre deux ligatures un segment de quelques centimètres d'intestin. Un surnageant acellulaire de culture, injecté dans ce segment sous un faible volume induit une dilatation par un liquide clair et isotopique si le surnageant contient une entérotoxine. Mis au point par De et Chatterjee (1953) pour l'étude de *V. cholerae* chez le lapin, ce modèle a été étendu aux entérotoxines d'*E. coli* chez de nombreuses espèces animales en 1967.

En ce qui concerne les souches d'origine humaine, Evans et al. (1973) ont standardisé le modèle lapin. La détermination du rapport du volume de fluide sécrété à la longueur du segment intestinal permet une mesure de la quantité d'entérotoxine thermostable ou thermolabile selon que la lecture est effectuée 6 ou 18 heures après l'injection du surnageant. Cependant, il existe un gradient de sensibilité de l'intestin grêle aux entérotoxines et les résultats varient d'un animal à l'autre. Chaque surnageant doit donc être injecté chez 8 lapins différents en faisant varier la position du segment inoculé (Larivière et al. 1972). Chez le veau, seul le jéjunum distal donne des réponses fiables car l'iléon est insensible par ce test et le duodénum et le jéjunum antérieur donnent des réponses positives par le simple fait des ligatures (Smith et Halls 1967). De plus, la sensibilité de l'intestin grêle aux entérotoxines varie selon l'espèce de l'animal expérimental et l'origine de la souche (Moon et Whipp 1971). Ces inconvénients sont à l'ori-

gine d'un abandon progressif de cette méthode qui a été remplacée par des techniques plus fiables et plus faciles à réaliser.

— Les animaux nouveau-nés sont sensibles à l'action des entérotoxines. Chez le lapin âgé de 9 jours, le surnageant étant injecté par sonde gastrique, la mesure peut être effectuée 7 heures après par estimation du rapport du volume du liquide intestinal au poids de l'intestin vide. Ce test n'a été utilisé, à notre connaissance, que par Gorbach et al. (1972).

Le souriceau nouveau-né est largement utilisé. Mis au point par Dean et al. (1972), il a été standardisé par Giannella (1976). Il consiste à injecter par voie externe 0,1 ml du surnageant acellulaire d'une culture d'*E. coli* dans l'estomac des souriceaux. La lecture est effectuée 3 heures après l'injection par estimation du rapport du poids de l'intestin de trois souriceaux au poids des trois carcasses restantes. Andremont (1976) a utilisé ce modèle pour quantifier l'entérotoxine thermostable d'*E. coli* par dilution. Il définit une dose effective 85 (ED₈₅) comme la quantité de matériel toxique produisant un rapport du poids intestinal au poids corporel de 0,085. Cependant, l'aspect macroscopique de l'intestin, dès l'ouverture de l'abdomen du souriceau permet de conclure sur l'entérototoxicité du filtrat testé. Cette technique a été également utilisée par Moon et al. (1976) pour la détermination du pouvoir entérotoxino-gène de souches d'*E. coli* isolées de veaux.

— Le test épicutané du lapin mis au point par Craig (1965) pour la toxine cholérique, a été adapté par Evans et al. (1973) à l'étude des entérotoxines colibacillaires. Lorsqu'une entérotoxine thermolabile de *V. cholerae* ou d'*E. coli* est injectée dans le derme dorsal de lapin, elle induit une augmentation de la perméabilité vasculaire locale avec apparition d'un œdème circonscrit au point d'injection. Il suffit d'injecter par voie intraveineuse un colorant se liant aux protéines sériques (tel le bleu Evans) 24 heures après l'injection intradermique de la toxine. La mesure du diamètre de la tache bleue et l'estimation de l'intensité permettent de mesurer la quantité de toxine thermolabile présente dans le surnageant. Une dose bleuissante de 4 mm (ou BD₄) est la quantité de matériel toxique qui donne une lésion de

diamètre moyen de 4 mm (Andremont 1976). Il est maintenant bien démontré que l'entérotoxine active sur le tube digestif et le facteur de perméabilité actif sur les capillaires cutanés, ne sont que deux activités biologiques de la même molécule et ceci aussi bien chez *V. cholerae* que chez *E. coli* (Craig 1971, Evans *et al.* 1973). Les entérotoxines thermolabiles d'origine porcine sont également mises en évidence par ce modèle (Holmgren 1973).

— La détermination du pouvoir entérotoxinogène d'*E. coli* à l'aide de cultures cellulaires est très récente. Keusch (1973) signale que l'entérotoxine TS d'*E. coli* n'a aucun effet sur les cultures de cellules He-La. Mais par la suite trois lignées cellulaires ont permis des travaux importants. Rutter et Luther (1973) ont démontré que l'entérotoxine thermolabile possédait un pouvoir cytopathogène sur cultures primaires de cellules thyroïdiennes de porc. En culture de cellules Y₁ de surrénales de souris, Donta *et al.* (1974) induisent un arrondissement des cellules parallèlement à une stimulation de la toxine cholérique et l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* (Donta *et al.* 1973, Donta et Smith 1974). Cette action est dépendante de l'AMP-cyclique (Kwan et Wishnow 1974). La microculture de ces cellules Y₁ rend possible la détermination sur de nombreuses souches d'*E. coli* permettant ainsi les enquêtes épidémiologiques (Sack et Sack 1975). D'autres cellules ont été également utilisées pour l'étude de l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli*. Elle induit une lipolyse dans les cellules graisseuses de l'épididyme de rat, ce phénomène étant mis en évidence par dosage du glycérol libéré (Evans *et al.* 1972). Guarrant *et al.* (1974) utilisent une lignée cellulaire CHO-K1 d'ovaire de hamster chinois. L'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* ainsi que la toxine cholérique induisent un allongement de ces cellules et une stimulation de la synthèse d'AMP-cyclique.

7.2. PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VITRO*

Divers milieux et conditions de culture ont été proposés pour l'obtention d'entérotoxines d'*E. coli*. Le milieu de Smith et Halls (1967) est une gélose molle d'extrait de viande glucosé et l'incubation est effectuée

à 37 °C en flacons de Roux. Cette méthode est peu pratique car elle exige de nombreuses manipulations et l'élimination de la gélose après culture est délicate. L'étude de trois milieux différents (Gianella 1976) a montré que l'entérotoxine thermostable n'était pas produite sur bouillon Trypticase-soja, même aéré. Les meilleurs rendements sont obtenus en culture agitée avec le milieu Casamino-acid Extrait de levure de Evans *et al.* (1973). La production d'entérotoxine est encore accrue si on augmente la concentration en extrait de levure jusqu'à 6 g/l. Par ailleurs, l'entérotoxine thermostable (TS) est libérée pendant la phase de croissance et atteint un maximum en phase stationnaire. La production d'entérotoxine thermolabile (TL) intervient plus tardivement et continue pendant au moins 48 heures avec le début de la phase stationnaire. Andremont (1976) pense donc que l'entérotoxine TS est sécrétée par les bactéries vivantes alors que l'entérotoxine TL serait libérée lors de leur mort. Cependant Mundel *et al.* (1976) observent la libération de TL quatre heures après l'inoculation du milieu, elle atteint un maximum après 24 à 30 heures d'incubation. Ces résultats sont donc en contradiction avec ceux d'Andremont (1976). Enfin, quand la souche possède les deux capacités de production, aucun milieu de culture ne permet d'obtenir pure, l'une ou l'autre des entérotoxines.

7.3. PRODUCTION D'ENTEROTOXINES *IN VIVO*

L'activité d'entérotoxines produites *in vitro* ne fait aucun doute. Cependant, on peut se demander si elles sont effectivement produites *in vivo* et jouent un rôle dans les diarrhées colibacillaires. Miniats et Gyles (1972) montraient la présence de la toxine TL dans les contenus intestinaux de porcs gnotoxéniques inoculés avec une souche d'*E. coli* TS-TL (productrice des deux types d'entérotoxines). Récemment, Donta *et al.* (1974) démontraient avec les cellules Y₁ la présence de TL dans les fèces de porcelets inoculés avec une souche TS-TL. Mais cette toxine TL est absente si les porcelets ont une diarrhée due à une souche TS. Ils attribuèrent donc la diarrhée observée, à la toxine TS. Grâce au développement du modèle du souriceau nouveau-né, Whipp *et al.* (1975) ont

pu démontrer la présence de TS dans les contenus intestinaux de porcelets inoculés par des souches TS ou des souches TS-TL, confirmant ainsi l'hypothèse de Donta *et al.* (1974).

Il n'y a donc aucun doute quant à l'importance des entérotoxines dans les diarrhées colibacillaires du porcelet. Cependant, chez le veau, Whipp et Donta (1976) ont confirmé indirectement ces résultats par titration des anticorps anti-TL chez l'animal adulte. Chez les truies, 94 % des sérums présentent des titres anti-TL de 1/1 à 1/64, alors que chez les vaches, 38 % seulement présentent des titres anti-TL, très faibles d'ailleurs (1/1 à 1/4). Si TL a une importance considérable chez le porc, il n'en est pas de même chez le veau. Il est donc logique de penser que si une entérotoxine intervient, elle sera dans la majorité des cas thermostable. Cette hypothèse a été confirmée récemment. En effet, sur plus de 700 souches isolées de cas de diarrhées du veau, aucune n'a produit d'entérotoxine thermolabile (Kaeckenbeeck *et al.* 1977).

7.4. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ENTEROTOXINE THERMOSTABLE

La nature chimique de l'entérotoxine thermostable d'*E. coli* est encore inconnue bien que deux équipes aient tenté sa purification. Lee *et al.* (1973) ont obtenu, par chromatographie sur Séphadex G-15 une fraction entérotoxique. L'analyse par électrophorèse en disque ne donne qu'une seule bande. Cette fraction contient 6 % de protéines et 57 % de glucides. Le poids moléculaire, déterminé par la position du pic d'élu-tion serait de 1 000 à 1 200. Plus récemment, Jacks et Wu (1974) ont obtenu par alternance d'ultrafiltrations et de chromatographies sur Séphadex G-200 une fraction entérotoxique contenant 2 % de glucides et 15 % de protéines. Mais on ne sait si ces fractions sont pures.

Selon les auteurs, la dialyse en sac de cellophane donne des résultats variables. Si elle est diffusible pour Smith et Gyles (1970), Kohler (1968) et Bywater (1972), elle ne l'est qu'à 10 % pour Andremont (1976). Par ailleurs, Jacks et Wu (1974) ont montré qu'elle était résistante à la pronase et à la trypsine. Stable de pH 1 à pH 9, elle est détruite à pH 11 (Kohler 1968, Jacks et Wu

1974). TS est précipitable à l'acétone et non précipitable au sulfate d'ammonium (Bywater 1970, Smith et Halls 1967). Les résultats quant à la stabilité thermique de cette toxine sont variables. Kohler (1968) l'inactive à 121 °C pendant une heure, Smith et Gyles (1970) à 121 °C pendant 30 mn, alors qu'Evans *et al.* (1973) et Jacks et Wu (1974) l'inactivent à 100 °C pendant 30 mn. En fait, la courbe de dénaturation thermique de cette toxine présente une décroissance douce. Elle perd 50 % de son activité par chauffage à 70-80 °C pendant 30 mn. A 100 °C pendant le même temps, il subsiste une activité résiduelle de 10 % (Andremont 1976).

Les propriétés de TS quant à la dénaturation thermique et la variation de sa diffusibilité font penser à une hétérogénéité moléculaire. Nous reviendrons d'ailleurs sur ce sujet lors de l'étude du déterminisme génétique de la production de cette toxine.

7.5. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ENTEROTOXINE THERMOLABILE

Là encore, la thermosensibilité de l'entérotoxine thermolabile est différente selon les auteurs. Pour Sack *et al.* (1971), elle est dénaturée à 56 °C pendant 30 mn, pour Evans *et al.* (1973) à 100 °C pendant 15 mn et enfin à 65 °C pendant 10 mn pour Bywater (1973) et Gyles (1971). En fait, Andremont (1976) en analysant le phénomène avec précision a montré que la toxine TL était totalement inactivée par chauffage à 56-60 °C pendant 30 mn. Si l'on ajoute à cette thermosensibilité la non diffusibilité par dialyse (Gyles 1971, Bywater 1973, Andremont 1976) et sa précipitabilité par le sulfate d'ammonium (Evans *et al.* 1973), il y a tout lieu de penser que l'entérotoxine TL est de nature protéique. Elle est d'ailleurs détruite par la pronase mais non par la trypsine. Son poids moléculaire serait supérieur à 100 000. Elle est labile à pH 5 mais stable à pH 9 (Jacks *et al.* 1973).

L'action de la trypsine sur cette toxine est remarquable. Rappaport *et al.* (1976) ont montré que cet enzyme digestif activait la toxine aussi bien vis-à-vis de la sécrétion que vis-à-vis de la production d'hormone de croissance par des cellules pituitaires en culture et du pouvoir vasodilatateur (test épicutané du lapin). Cependant, l'entérotoxicité proprement dite (anse ligaturée de lapin)

n'est pas augmentée. Si un inhibiteur de la trypsine est ajouté à la préparation injectée dans les anses ligaturées, l'entérotoxicité est réduite de moitié. Ceci indique que la toxine TL est peu active lors de sa libération dans l'intestin et que les enzymes digestifs de l'hôte peuvent augmenter son entérotoxicité. D'autre part, ces résultats indiquent également que les fonctions entérotoxique et vasodilatatrice de l'entérotoxine TL ne sont pas situées dans le même site actif.

Plusieurs équipes ont tenté de purifier l'entérotoxine thermolabile. Dorner *et al.* (1976) ont obtenu une fraction pure à partir de la souche P263 d'origine porcine, selon les critères couramment admis (immuno-électrophorèse, électrophorèse en gel, ultracentrifugation). Les techniques mises en jeu pour la purification sont successivement : chromatographie sur Biogel Agar de 5 M puis Séphadex G-75, deux isofocalisations préparatives successives sur Ampholine. Le point isoélectrique de la toxine ainsi purifiée est de 6,9. La teneur en lipides et en hexoses est inférieure à 1 %. Les poids moléculaires estimés par ultracentrifugation, filtration sur Séphadex G-150 ou encore par électrophorèse en gel de polycramide -SDS sont de 102 000 daltons. L'activité spécifique de cette toxine est de 10 000 fois plus élevée que la toxine brute.

Schenkein *et al.* (1976) ont purifié une entérotoxine thermolabile à partir d'une souche d'*E. coli* K12 ayant reçu un plasmide Ent. d'origine porcine. Par précipitation au sulfate d'ammonium suivie de deux chromatographies, l'une sur Séphadex G-200, l'autre sur DEAE-Séphadex A-25, ces auteurs obtiennent une toxine pure en ultra centrifugation d'un poids moléculaire de 180 000 à 200 000 daltons. Mais par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, la dissociation conduit à deux sous-unités (PM 70 000 et 14 000). Si la toxine purifiée est portée à 100 °C dans le SDS à 0,2 % avant l'électrophorèse, la sous-unité 70 000 est transformée en sous-unité de 40 000. Ces sous-unités sont inactives en cellules Y₁ alors que la toxine purifiée est 2 à 3 fois plus active que la toxine brute.

Evans *et al.* (1976) obtiennent une fraction purifiée d'entérotoxine thermolabile préparée à partir d'une souche d'*E. coli* traitée par la polymixine-B. Après précipitation au sulfate d'ammonium, l'entérotoxine TL est obtenue

directement par chromatographie d'affinité sur Affi-Gel 202. La toxine ainsi préparée est pratiquement pure en immunoélectrophorèse. Son poids moléculaire est de 20 000 daltons.

Finkelstein *et al.* (1976) montrent que suivant la souche et le milieu de culture utilisé, les entérotoxines TL ont des poids moléculaires allant de 35 000 à plus de 100 000.

L'ensemble de ces résultats montre l'hétérogénéité de l'entérotoxine thermolabile selon les souches d'*E. coli* utilisées et le milieu de culture. Quoi qu'il en soit, tous les travaux signalent la thermolabilité, l'activation par la trypsine et envisagent la nature protéique de cette toxine. Schenkein *et al.* (1976) ont même publié une composition en acides aminés indiquant une teneur élevée en glycine, alanine et glutamine.

7.6. DETERMINISME GENETIQUE

La production de l'entérotoxine thermostable d'*E. coli* est régie par un matériel génétique extrachromosomal appelé plasmide. Ce plasmide peut être transmis à d'autres souches d'*E. coli* ou même à d'autres espèces d'entérobactéries telles que *Salmonella* (Smith et Halls 1968). La production de la toxine thermolabile est également sous le contrôle d'un plasmide (Smith et Gyles 1970).

Chez les souches d'*E. coli* entérotoxogènes d'origine porcine, la toxine TS est toujours produite alors que la forme TL ne l'est pas systématiquement (Gyles 1971). Dans des expériences de croisements dans lesquelles *E. coli* donneur est TS⁺TL⁺, toutes les souches réceptrices Ent⁺ obtenues produisent les deux toxines (Smith et Gyles 1970). Il pouvait donc exister soit deux plasmides distincts chacun d'eux codant pour la production d'une seule toxine ou un seul plasmide codant pour deux toxines distinctes. Par examen en ultracentrifugation du DNA-extrachromosomal de souches K12 réceptrices, Gyles *et al.* (1974) ont montré qu'en fait il existe deux plasmides. L'un (TS) code pour la production de l'entérotoxine TS seule, l'autre (TS + TL) code pour la production de deux toxines. Quel que soit la souche, les plasmides (TS + TL) ont un poids moléculaire de 20 à 80.10⁶ daltons et un (G + C) % variable. Cette hétérogénéité de taille des plasmides TS se traduit d'ailleurs par l'hétérogénéité des entérotoxines TS déjà signalée.

L'analyse de trois plasmides (TS + TL) par hybridation hétérologue DNA-DNA a montré une grande homologie (87 %) de leurs séquences. Par contre, aucune homologie n'a pu être démontrée entre (TS + TL) et (TS) ou même (TS + TL) et DNA de *V. cholerae*. Ces plasmides (TS + TL) appartiennent au groupe d'incompatibilité F (So *et al.* 1975). L'examen en microscopie électronique d'hétéroduplex de (TS + TL) avec le facteur F a permis de compter 4 régions d'homologie entre ces deux plasmides engageant ainsi 50 % de la longueur de (TS + TL). (TS + TL) est d'ailleurs incompatible avec F qu'il soit intégré (Hfr) ou autonome (F'). La répression du transfert d'un plasmide R appartenant au groupe R_{II} indique que (TS + TL) est fi⁺. Ceci pourrait expliquer le fait que l'on ne peut transférer ce plasmide seul (Santos *et al.* 1975).

De même le plasmide (TS) n'est pas transférable seul (Wachsmuth *et al.* 1976). Un fragment de 5,7 × 10⁶ daltons a été isolé par clivage de (TS) par l'endonucléase EcoR1, alors que le plasmide (TS) initial est de 65.10⁶ daltons. Ce fragment est introduit par manipulation génétique dans un autre plasmide pSC 101 porteur d'une résistance à la tétracycline (So *et al.* 1976). Ceci permet d'obtenir une souche K12 Tc^r TS⁺ porteuse du plasmide (pSC 101-TS). Ce nouveau plasmide clivé à nouveau par Eco R1 et couplé à un plasmide Col E1 modifié, conduit à une nouvelle souche K12 productrice de trois fois plus de toxine que la souche TS⁺ sauvage ou la souche K12 (pSC 101-TS). Ceci est dû au plasmide Col E1 qui a la propriété de se dupliquer dans la cellule bactérienne jusqu'à atteindre 20 à 30 copies par cellule.

Ces manipulations génétiques posent des problèmes de sécurité importants. Cependant, elles ont permis à So *et al.* (1976) d'obtenir une souche pouvant être le matériel d'étude de la régulation de la biosynthèse de l'entérotoxine thermostable. Elle peut aussi simplifier la purification de cette toxine.

Le problème de la régulation a déjà été abordé par Levner *et al.* (1977). Ces auteurs ont remarqué que la lincomycine induit une augmentation considérable de la production d'entérotoxine TL par *E. coli* alors que le nombre de copies du plasmide (TS + TL) par cellule n'est pas augmenté. Or la lincomycine est un inhibiteur de la synthèse protéique. Levner *et al.* (1977) émettent l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de

répression. Normalement, la synthèse de l'entérotoxine serait inhibée par des (ou un) médiateur protéiques. La lincomycine inhiberait la synthèse de ces médiateurs et lèverait donc cette inhibition.

7.7. IMMUNOGENICITE ET SERONEUTRALISATION

La vaccination des truies gestantes par injections répétées de filtrats stériles de cultures provoque une apparition d'anticorps sériques anti-O. Les porcelets nourris avec le colostrum de ces mères ne présentent cependant pas de résistance aux entérotoxines thermostables (Kohler 1968). Chez le lapin ce type de préparations détermine également l'apparition d'agglutinines sériques. Mais l'examen immunoélectrophorétique de ces préparations ne permet pas de déceler un arc caractéristique de l'entérotoxine TS. Les arcs obtenus disparaissent lorsque le sérum anti-filtrat est épuisé par l'antigène O (Truszczynski et Ciosek 1972). Les expériences de Smith et Gyles (1970) en anses ligaturées montrent qu'un sérum anti-TS ne neutralise pas l'activité biologique de TS, même après incubation du mélange sérum TS avant inoculation.

Il faut donc admettre que l'entérotoxine TS n'est pas immunogène sous la forme native. Cependant à l'heure actuelle, aucun travail ne fait état de couplage de cette toxine sur une protéine support. Il y a là une voie de recherche qui serait d'une importance considérable pour la mise au point d'une sérothérapie efficace.

L'entérotoxine thermolabile TL est immunogène. Son activité biologique en anses ligaturées est neutralisée par un sérum anti-TL préparé chez le lapin par injections répétées de lysats cellulaires (Gyles et Barnum 1969). Le titre de l'immun-sérum est déterminé par la dilution de sérum qui neutralise 50 % de l'activité entérotoxique mesurée dans les segments ligaturés. Les titres obtenus sont de l'ordre du 1/30-1/60 alors que la toxine cholérique purifiée donne des titres de l'ordre du 1/2 000 (Etkin et Gorbach 1971). Il existe des relations croisées non seulement entre les toxines TL d'origine porcine mais également avec la toxine cholérique (Gyles 1974). Ces réactions croisées observées en anses ligaturées de

porc ou de lapin se retrouvent également chez le jeune lapereau ayant reçu *per os* la toxine TL. Les antitoxines cholériques ou les antitoxines d'*E. coli* neutralisent réciproquement les toxines d'*E. coli* ou de *V. cholerae*. Les jeunes lapereaux ne présentent plus de diarrhée (Smith 1972).

L'obtention de sérums anti-TL à titre plus élevé (1/256) a permis de montrer qu'il existait des déterminants antigéniques communs non seulement aux toxines TL d'origine porcine mais aussi aux toxines TL d'origine humaine et à la toxine cholérique (Gyles 1974). L'analyse des sérums antitoxines par la méthode d'Ouchterlony révèle que la toxine cholérique possède au moins deux déterminants antigéniques dont un commun aux entérotoxines TL d'*E. coli* quelle que soit leur origine. Ceci pourrait expliquer que l'activité biologique de la toxine cholérique ne soit inhibée qu'en partie par un sérum anti-TL (Gyles 1974). En fait la toxine cholérique peut être dissociée en deux sous-unités A et B, la toxine pure ayant la structure AB₄. Chacune de ces sous-unités porte des déterminants antigéniques différents sans relation antigénique. La sous-unité A responsable de l'activité entérotoxique est peu immunogène et n'est pratiquement pas neutralisée par le sérum anti-toxine cholérique. Le fragment B, cholérage noïde n'est pas toxique mais immunogène (Van Heyningen 1976). Les résultats de Gyles (1974) indiqueraient que les déterminants communs en TL et la toxine cholérique sont portés par le fragment B.

L'immunogénicité de l'entérotoxine TL permet d'espérer la mise au point de systèmes de protection des jeunes animaux (porcelets), soit par vaccination des mères, soit par vaccination dès la naissance des jeunes. Notons par ailleurs, que dans des conditions naturelles, 94 % de truies adultes présentent un titre sérique anti-TL de 1/7 à 1/64. Chez les bovins la présence d'anticorps anti-TL est moins fréquente (38 %) et leur titre moins élevé de 1/1 à 1/4 (Whipp et Donta 1976).

8. Action physiologique des entérotoxines

Différents auteurs (Smith et Halls 1967, Bywater 1970, Tennant *et al.* 1972, Dubourguier 1977) ont montré qu'il existe un gradient de sensibilité de l'intestin grêle aux

entérotoxines, la zone duodénale étant généralement la plus sensible. Excepté chez le lapin, l'iléon ne réagit pas après injection d'entérotoxines dans les segments ligaturés. Cette insensibilité apparente démontrée chez le veau (Smith et Halls 1967, Tennant *et al.* 1972) est en désaccord avec les résultats de Bywater (1970) qui mettent en évidence une sécrétion nette d'eau dans la demi-heure suivant l'injection d'entérotoxines dans les anses iléales de Thiry-Vella. Cette contradiction apparente est en fait due à l'action très rapide de durée limitée de l'entérotoxine TS même à des doses très faibles (Evans *et al.* 1973). Or l'examen des résultats en anses ligaturées est effectué 4 à 18 heures après inoculation et il est probable qu'il y a réabsorption du fluide sécrété. En ce qui concerne le côlon, Donowitz et Binder (1976) ont montré que chez le rat, cet organe est insensible à l'action d'une entérotoxine TL d'*E. coli* d'origine porcine alors que la toxine cholérique est active. Chez le veau, les échanges d'eau dans le côlon ne sont pas modifiés par l'entérotoxine thermostable (Dubourguier 1977). L'entérotoxine TL agit d'une manière comparable à la toxine cholérique. A faible dose la réponse est tardive alors que de fortes doses induisent une réponse dans l'heure suivant l'inoculation. Cette réponse peut durer plus de 18 heures (Evans *et al.* 1973).

Les fluides sécrétés sous l'action des entérotoxines sont généralement alcalins et isotoniques. Que ce soit chez le veau (Tennant *et al.* 1972) ou chez le porc (Moon et Whipp 1971), les concentrations en ions Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ et anions totaux (Cl⁻ + HCO₃⁻) sont relativement constantes et comparables à celles du plasma. Par contre, les teneurs en K⁺ et HCO₃⁻ sont beaucoup plus élevées que dans les contenus intestinaux normaux. La teneur en protéines est faible, ce qui indique que les entérotoxines n'agissent pas par augmentation de la perméabilité capillaire.

Tous ces travaux ont été effectués soit selon des méthodes aiguës (technique de DE, anses ligaturées perfusées) soit dans des organes isolés *in vivo* (anses de Thiry-Vella). Les effets des entérotoxines sur l'ensemble du tube digestif et leur responsabilité dans la diarrhée sont donc restés inconnus jusqu'en 1977. Par perfusion intraduodénale de surnageant stérile de culture d'*E. coli* B41 d'origine bovine (entérotoxine TS), Dubourguier

(1977) induit une diarrhée prononcée chez le jeune veau. Les symptômes cliniques (déshydratation, paramètres biochimiques sanguins) sont sévères. La motricité intestinale, enregistrée par électromyographie est profondément perturbée. Ainsi la caillette est paralysée et une activité rythmique anormale apparaît dans le jéjunum et l'iléon. Toutes les observations sont analogues à celles effectuées chez le veau à diarrhée spontanée (Dardillat 1975, Fisher 1971).

Les entérotoxines d'*E. coli* jouent donc un rôle primordial dans le syndrome diarrhéique, aussi bien au niveau local (perte d'eau et d'électrolytes au travers de la muqueuse intestinale) qu'au niveau général (déshydratation, acidose, hyperkaliémie).

9. Site de la sécrétion induite

Dans l'intestin la réponse aux entérotoxines est locale car ces substances n'agissent que dans les segments inoculés et non dans les segments adjacents (Smith et Halls 1967, Moon et Whipp 1971). La sécrétion de fluide a lieu sans altération de la structure de l'épithélium intestinal bien qu'il y ait décharge des cellules à mucus et modification de l'architecture du tissu intestinal, attribuées à la distension des tissus (Pierce et Wallace 1972, Guerrant *et al.* 1973, Donowitz et Binder 1976). Par ailleurs, l'action de l'entérotoxine TL d'*E. coli* est comparable avec celle de la toxine cholérique sur le plan histologique (Elliott *et al.* 1970). En ce qui concerne la toxine TS d'*E. coli*, son action diffère de celle de la toxine cholérique ou de la toxine TL par son mécanisme d'action. Mais la sécrétion induite et l'histologie ont des caractères similaires.

Hendrix et Bayless (1970) pensent que dans l'intestin grêle normal ou diarrhéique, la sécrétion est le fait des cryptes de Lieberkühn alors que l'absorption est due aux villosités. Les arguments en faveur d'une telle hypothèse sont les suivants :

- 1° La *lamina propria* est abondamment irriguée par un réseau sanguin dans la région des cryptes. Ce réseau est continu avec les capillaires villeux (Bellamy *et al.* 1973).
- 2° La réponse de la toxine cholérique est inhibée par la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique). Cette inhibition s'accompagne de lésions cellulaires au

niveau des cryptes mais pas des villosités. L'épithélium villeux et l'absorption du glucose ne sont pas modifiés (Serebro *et al.* 1969, Kimberg *et al.* 1973).

- 3° Une solution hypertonique de sulfate de sodium induit une sécrétion nette de fluide avec altération de l'épithélium villeux. L'absorption du glucose est réduite. Mais il n'y a aucune lésion des cryptes, ni de la réponse aux entérotoxines cholériques (Roggin *et al.* 1972).
- 4° La fonction villositaire estimée par l'absorption des acides aminés ou du glucose, n'est pas modifiée par les entérotoxines d'*E. coli* ou de *V. cholerae* (Bywater 1970, Moon et Whipp 1973).

Ce modèle de Hendrix et Bayless semble donc satisfaisant d'un point de vue structural. Les *E. coli* entéropathogènes, comme d'ailleurs *V. cholerae* adhèrent aux villosités mais sont absents des cryptes (Waxler *et al.* 1971). Cette discordance entre la localisation des bactéries et le site d'action de l'entérotoxine n'est qu'apparente. Bien qu'aucune étude n'ait été effectuée à ce sujet sur les entérotoxines d'*E. coli*, la toxine cholérique est uniformément répartie sur les cellules épithéliales peu de temps après son inoculation. Puis elle diffuse rapidement vers les cryptes où elle est absorbée ou incluse dans les cellules (Peterson *et al.* 1972, Kao *et al.* 1972). Cependant ce modèle ne tient compte ni de la différenciation anatomique et fonctionnelle du jéjunum et de l'iléon, ni des anomalies observées au niveau des ionogrammes réalisés sur les fluides sécrétés.

10. Récepteurs cellulaires

A notre connaissance, aucun travail ne fait état de récepteur cellulaire spécifique de l'entérotoxine thermostable T.S. Cependant le type de réponse de l'intestin grêle à cette toxine indique un mécanisme mettant en jeu une liaison muqueuse-toxine. La réponse sécrétoire est proportionnelle à la dose dans les anses de Thiry-Vella chez le chien. Mais il existe une sécrétion maximale pour une dose de 250 µg d'entérotoxine TS (Pierce et Wallace 1972). L'effet rapide observé par ces auteurs apparaissant dans les 15 minutes suivant l'administration de la toxine disparaît partiellement par rinçage de la muqueuse intestinale (Evans *et al.* 1973) et même parfois totalement une heure

après le contact toxine-muqueuse (Nalin *et al.* 1974). La réponse ne peut être abolie par rinçage de l'anse. Elle persiste pendant 5 heures environ. Deux hypothèses peuvent expliquer ces phénomènes : l'existence de récepteurs spécifiques auxquels la toxine TS serait faiblement liée et l'altération de mécanismes sécrétoires, persistante même après élimination de la toxine. Dans les deux cas, le rinçage serait plus ou moins effectif suivant la dose de toxine utilisée.

Contrairement à l'entérotoxine TS, la toxine thermolabile TL a une action tardive et prolongée. La réponse sécrétoire de l'intestin, analogue à celle induite par la toxine cholérique (Evans *et al.* 1973, Sack *et al.* 1976), ainsi que les relations immunologiques entre ces deux toxines ont conduit à rechercher un récepteur spécifique de l'entérotoxine thermolabile.

Il était donc logique de recourir à des expériences de compétition vis-à-vis du (ou des) récepteur de ces toxines. Une des techniques possibles consiste à saturer le (ou les) site actif de la toxine étudiée par une fraction contenant le récepteur libre ou par des analogues structuraux de ce récepteur. Il est possible également de saturer le site récepteur tissulaire avec une substance empêchant l'action de la toxine. Grâce à ces techniques d'inhibition, Van Heyninghen *et al.* (1971) ont montré qu'un extrait gangliosidique de membrane cellulaire inhibe l'action de la toxine cholérique. L'analyse plus fine du phénomène à l'aide de gangliosides purifiés a révélé que seul le G_{M_1} se fixait et inhibait la toxine cholérique avec une affinité indiquant que le G_{M_1} constituait tout ou partie du site récepteur (Holmgren *et al.* 1973). En fait des fractions plus simples préparées à partir du G_{M_1} peuvent inhiber la toxine. L'acétylsphingosine G_{M_1} est la fraction responsable de l'affinité. L'oligosaccharide G_{M_1} ne suffit pas puisqu'il est 20 000 fois moins actif que l'acétylsphingosine ou le G_{M_1} lui-même (Holmgren *et al.* 1974).

Par ailleurs, l'anatoxine cholérique naturelle présente une affinité similaire pour le G_{M_1} . Mais ce ganglioside n'inhibe qu'en partie l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* et l'anatoxine cholérique est sans action (Holmgren 1973, Pierce 1973). Le site récepteur de l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* ne peut donc être identique à celui de la toxine cholérique et le G_{M_1} n'en est pas un constituant

essentiel. Les récepteurs mettent sans doute en jeu des phospholipides car la polymyxine inhibe l'activité de l'entérotoxine thermolabile *in vivo*, ainsi que celle de la toxine cholérique (Maimon *et al.* 1972). Cet antibiotique polypeptidique se fixe sur les liaisons polyphosphates des phospholipides membranaires, bloquant ainsi l'activité biologique des toxines cholériques et colibacillaires.

11. Transport intestinal des ions

Avant d'envisager l'action des entérotoxines sur les échanges d'eau et d'électrolytes au travers de la muqueuse intestinale, nous rappellerons aussi brièvement que possible les mécanismes de transport des ions au travers de l'épithélium, sur la base des revues de Schultz *et al.* (1974) et Soergel (1973). Le transport des solutés au travers de l'épithélium intestinal est effectué par deux voies :

- l'une intercellulaire ou voie « shunt »,
- l'autre transcellulaire, ce qui implique le passage des solutés au travers des deux membranes, l'une située du côté lumière intestinale (muqueuse), l'autre constituée par la membrane baso-latérale.

1° VOIE « SHUNT »

La plupart des travaux de recherche dans ce domaine indiquent que la voie « shunt » joue un rôle essentiel dans le transport des ions, des petites molécules non chargées et de l'eau. C'est la voie principale du transport des ions Na^+ , K^+ , Cl^- . La perméabilité vis-à-vis de ces ions est plus élevée dans le jéjunum antérieur que dans l'iléon. Kedem et Katschalsky (1958) ont montré qu'il existait une relation entre le flux d'eau et les flux de solutés. Ces auteurs ont proposé un modèle :

$$J_{net}^s = (1 - \sigma_s) J_{net}^{H_2O} \bar{C}_s + WRT \cdot \Delta C_s$$

dans lequel :

J_{net}^s est le flux de soluté

$J_{net}^{H_2O}$ le flux net d'eau

\bar{C}_s est la concentration moyenne du soluté

WRT le coefficient de perméabilité du soluté

ΔC_s la différence de concentration entre la lumière intestinale et le compartiment séreux

σ_s le coefficient de réflexion qui peut varier de 1 pour des solutés imperméants à 0 pour des solutés dont la perméabilité est égale à celle de l'eau.

Cette voie « shunt » est anatomiquement constituée par les complexes de jonction cellulaire et l'espace intercellulaire. Les dimensions des « pores » varient selon les espèces, la région de l'intestin considérée et la technique de mesure. Dans le jéjunum de l'homme et du chien, ces « pores » auraient un diamètre de plus de 10 à 15 Å. Dans l'iléon, ils seraient nettement plus petits. Le diamètre de ces « pores » est variable. Ainsi bien qu'une hypertonicité du compartiment luminal induit un collapsus de l'espace interstitiel, la sécrétion de fluide provoquée par l'accroissement de la pression du compartiment séreux est associée à un élargissement des espaces intercellulaires et à une augmentation de la perméabilité des complexes de jonction. Précisons enfin que l'AMP-cyclique ne joue aucun rôle dans cette voie de transport.

2° VOIE TRANSCELLULAIRE

Le jéjunum des mammifères (homme, rat, lapin, chien) est capable d'absorber activement des ions Na^+ , Cl^- et HCO_3^- . L'absorption active de Na^+ se ferait par échange neutre avec des ions H^+ intracellulaires au niveau de la membrane microvillositaire. L'exsorption se ferait par la voie « shunt ». Cette absorption active est stimulée *in vitro* et *in vivo* par la présence luminale de glucose ou de HCO_3^- . La différence essentielle entre le jéjunum et l'iléon est que ce dernier sécrète activement du HCO_3^- . Le modèle de Turnberg est basé sur un échange entre ions positifs $Na^+ \leftrightarrow H^+$ et ions négatifs $Cl^- \leftrightarrow HCO_3^-$. Mais ce modèle ne tient pas compte de l'existence de plusieurs types

cellulaires au niveau de la muqueuse intestinale et de deux membranes différentes, membrane microvillositaire et membrane basolatérale.

Le modèle de Schultz met en jeu au moins quatre mécanismes de transport. Les mécanismes (A) et (B) sont situés dans la membrane microvillositaire. (A) assurerait le transport actif de Na^+ couplé à Cl^- . Il pourrait aussi assurer le transport de $NaHCO_3$ (iléon). Ce mécanisme serait réversible. Il serait inhibé par l'AMP-cyclique, mais non par l'ouabaïne. (B) est peu connu. Il serait Cl^- indépendant et AMP-cyclique indépendant. Il pourrait être responsable de l'échange $Na^+ \leftrightarrow H^+$ du modèle de Turnberg. Il ne serait pas inhibé par l'ouabaïne. Dans la membrane baso-latérale, l'extrusion du Na^+ de la cellule vers l'espace interstitiel est couplé au transport actif du K^+ vers le compartiment intracellulaire (mécanisme C). Non réversible, ce mécanisme serait assuré par une (Na-K)-ATP ase inhibée par l'ouabaïne. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP fournirait l'énergie nécessaire à la sortie de 3 ions Na^+ et à l'entrée dans la cellule de 2 ions K^+ (Glynn et Karlish 1975). La (Na-K)-ATP-ase est inhibée par le N-Ethylmaleimide, la dicyclohexylcarbodiimide, les ions Beryllium et fluorure ainsi que par l'ouabaïne. La sortie des ions Cl^- (mécanisme D) au travers de la membrane basolatérale est très peu connue. Il pourrait s'agir d'une simple diffusion, ainsi que pour le mécanisme (E) de sortie de K^+ .

12. Action de l'entérotaxine thermostable sur le transport des ions

L'absorption ou la sécrétion intestinale sont le résultat de deux flux unidirectionnels, l'insorption ou flux de la lumière vers le sang et l'exsorption, flux du sang vers la lumière. Nous avons vu précédemment que les entérotaxines induisaient une sécrétion nette d'eau et d'électrolytes, plus particulièrement de HCO_3^- dans l'intestin grêle. Cette sécrétion peut être soit le résultat d'une augmentation de l'exsorption, soit d'une diminution de l'insorption soit des deux à la fois.

Dans les anses iléales de Thiry-Vella, l'entérotaxine TS d'*E. coli* augmente aussi bien l'insorption que l'exsorption de l'eau. La sécrétion nette d'eau observée est le résultat

d'un accroissement plus important de l'exsorption. Dans tous les cas, l'insorption des ions Na^+ est diminuée. Mais parfois il y a augmentation de l'exsorption également (Bywater 1973). Ces résultats sont satisfaisants et concordent avec une augmentation des flux d'eau par la voie « shunt » et une diminution de l'absorption active du Na^+ par la membrane microvillositaire. Mais cet auteur émet l'hypothèse de deux actions différentes de l'entérotoxine TS, l'une sur le transport du Na^+ , l'autre sur le transport de l'eau, ce qui est en contradiction totale avec les résultats obtenus par de nombreux auteurs chez d'autres espèces animales aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Schultz et al. 1974). Par contre, Dubourguier (1977), estime par perfusion d'anses jéjunales de Thiry-Vella et examen statistique des résultats selon Kedem et Katchalsky (1958) que la perte d'eau n'est qu'une conséquence passive de la fuite d'ions au travers de la muqueuse intestinale, l'action initiale de l'entérotoxine étant d'induire des modifications au niveau de l'échange neutre de $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{K}^+$.

13. Rôle de l'AMP-cyclique

Le niveau d'AMP-cyclique intracellulaire est régulé par l'intermédiaire de deux enzymes : l'adényl-cyclase qui catalyse la transformation de l'ATP en AMP-c et le phosphodiesterase qui dégrade l'AMP-cyclique en 5'-AMP. L'AMP-c agit comme activateur d'une protéine-kinase. Cette enzyme activée catalyse la phosphorylation de protéines et modifie de ce fait les fonctions cellulaires.

L'entérotoxine TS agit sans l'intervention de l'AMP-cyclique. Ainsi des extraits chauffés à 100 °C, 15 minutes, préparés à partir d'une souche d'origine porcine (TS + TL) sont incapables d'induire une augmentation de l'activité de l'adényl-cyclase (Kantor et al. 1974). Elle ne stimule pas la stéroïdogénèse en cellules Y1 (Kwan et al. 1974, Donta et al. 1974). Il faut donc admettre que son action ne passe pas par l'intermédiaire du mécanisme d'absorption du Na^+ situé dans la membrane microvillositaire. Mais à notre connaissance, aucun travail n'indique une altération (stimulation ou inhibition) de l'activité de la (Na-K)-ATP ase responsable de l'échange $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{K}^+$ et située dans la membrane baso-latérale.

De nombreuses observations suggèrent l'intervention de l'AMP-cyclique dans l'action de l'entérotoxine TL d'*E. coli* et de la toxine cholérique. La toxine cholérique augmente le taux d'AMP-cyclique intra-cellulaire par augmentation de l'activité de l'adényl-cyclase sans modification de la phosphodiesterase (Kimberg et al. 1971, Sharp et al. 1971). Ce phénomène est en étroite corrélation avec la sécrétion de fluide et de sodium (Guerant et al. 1972). Mais parallèlement, il y a inhibition de la (Na-K)-ATP ase, traduction d'une action de la toxine cholérique sur le mécanisme baso-latéral d'extrusion de Na^+ (Sharp et al. 1971). L'inhibition de ce mécanisme par les ions F^- est d'ailleurs moins forte après action de la toxine cholérique (Sharp et Hynie 1971).

Parkinson et al. (1972) ont montré que sous l'action de la toxine cholérique, l'activité de divers enzymes cellulaires tels qu'alkaline phosphatase, 5'nucléotidase, glucose-6-phosphatase, localisés dans la membrane microvillositaire, n'était pas modifiée. Par contre, la (Na-K)-ATP ase est inhibée alors que l'adényl-cyclase est activée. Ces deux enzymes sont situés dans la membrane baso-latérale. La toxine cholérique se lierait donc à la bordure en brosse des cellules épithéliales puis, soit induirait des changements suffisamment importants pour modifier les activités enzymatiques de la membrane baso-latérale, soit migrerait rapidement vers cette membrane. Par ailleurs, les modifications du transport intestinal, induites par l'augmentation du taux intra-cellulaire de l'AMP-cyclique, pourraient être le résultat de son action à un ou plusieurs sites de la bordure en brosse ou de la membrane baso-latérale (Parkinson et al. 1972). Comme ces deux enzymes adényl-cyclase et (Na-K)-ATP ase sont liés à des phospholipides membranaires, il est possible que la toxine cholérique agisse par l'intermédiaire de ces substances. Or la polymyxine, polypeptide se liant aux phospholipides, inhibe la sécrétion induite par la toxine cholérique (Mamon et al. 1972). L'activation de l'adényl-cyclase observée est plus importante dans les cryptes de Lieberkuhn que dans les cellules épithéliales villositaires (Schwartz et al. 1975), ce qui serait en faveur du modèle de Hendrix et Bayless (1970).

L'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* augmente également le taux d'AMP-cyclique intracellulaire aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*,

en activant l'adényl-cyclase (Evans *et al.* 1972, Kantor *et al.* 1974). Cette action est durable, même après « élimination » de la toxine par rinçage (Guerrant *et al.* 1972). La sécrétion induite est également inhibée par la polymixine (Maimon *et al.* 1972). Comme la toxine cholérique, elle induit une stéroïdogenèse dans les cellules Y₁ (Kwan et Wishnow 1974). L'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* agit donc probablement sur le transport des ions par le même mécanisme que la toxine cholérique, bien que les récepteurs cellulaires à ces deux toxines soient différents.

14. Inhibiteurs de la sécrétion induite

Divers agents pharmacologiques et immunologiques ont été étudiés en vue de leur utilisation à des fins thérapeutiques. Ces recherches n'ont pas encore abouti mais ont cependant permis de préciser le mécanisme d'action des entérotoxines thermolabiles d'*E. coli* et de *V. cholerae*. Nous avons déjà vu que l'anatoxine naturelle de *V. cholerae*, certains dérivés du ganglioside G_{M1} et des immunosérums inhibaient la toxine cholérique. L'action de l'entérotoxine TL est également inhibée au moins en partie, par ces agents, excepté l'anatoxine.

L'aspirine, inhibiteur de la synthèse des prostaglandines peut inhiber la sécrétion induite chez le chat par la toxine cholérique (Fink et Katz 1972). Mais l'intervention des prostaglandines dans le mécanisme d'action de la toxine cholérique n'est pas prouvée, car l'aspirine pourrait agir en activant la phosphodiesterase ou en inhibant l'adényl-cyclase. La polymixine, ligand puissant des phospholipides membranaires inhibe l'action de l'entérotoxine TL d'*E. coli in vivo* ainsi que celle de l'entérotoxine cholérique (Maimon *et al.* 1972). Le Diamox (acétoazolamide de sodium) inhibe partiellement la sécrétion induite par la toxine cholérique (Norris *et al.* 1969) et l'entérotoxine TL d'*E. coli* (Whipp et Moon 1972). Cet agent agit par inhibition de l'hydrase carbonique. Le glucose par voie intra-luminale réduit également la sécrétion. Il agit par activation de l'absorption du sodium. Son action est additive avec celle du Diamox (Norris *et al.* 1969, Whipp et Moon 1972). L'acide éthacrynique, inhibiteur de la (Na-K)-ATP ase, inhibe

la sécrétion induite par la toxine cholérique aussi bien *in vitro* dans l'iléon de lapin (Al-Awqati *et al.* 1969) qu'*in vivo* dans l'anse de Thiry-Vella chez le chien (Carpenter *et al.* 1969). La cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique, réduit également la sécrétion (Serebro *et al.* 1969). Il semblerait que cette substance augmente l'activité de la (Na-K)-ATP ase (Mahmood et Siddigi 1972).

Enfin, Mitchell et Kenworthy (1976) auraient trouvé un métabolite de *Lactobacillus bulgaricus*, d'un poids moléculaire d'environ 10⁴. Bien que le rôle bénéfique des ferments lactiques soit controversé, ce métabolite aurait une action anti-entérotoxique en anses ligaturées d'intestin grêle. Les résultats obtenus par addition de bouillons de cultures à la ration de porcelets sevrés précocement, montrent qu'il n'y a pas diminution sensible de la mortalité mais augmentation du gain de poids des animaux.

15. Conclusion

Chez le veau, deux syndromes de maladies où *Escherichia coli* est impliqué ont été décrits : une forme septicémique peu fréquente et peu étudiée (Smith 1974) et la diarrhée proprement dite. C'est à ce dernier syndrome qui atteint 1 000 000 de veaux en France (Larvor 1975) que nous nous sommes plus particulièrement intéressés. Au cours des dix dernières années le concept d'*Escherichia coli* entéropathogène a été largement précisé. Avant 1967, le seul critère établi était basé sur la détermination des antigènes O et K. La découverte des plasmides (Ent) et celle des plasmides (K88) chez le porc et (K99) chez le veau, a révélé leur importance primordiale. L'entéropathogénicité d'*E. coli* a été associée à l'adhérence de la bactérie à la muqueuse intestinale (K88 ou K99) et à la sécrétion d'une ou de deux entérotoxines à tropisme intestinal (Ent). Ces deux caractères sont particulièrement bien étudiés chez le porc. Mais bien que les pertes économiques dues à la diarrhée des veaux soient importantes, les recherches concernant *E. coli* d'origine bovine sont encore très limitées, même en France.

Les connaissances acquises jusqu'alors nous permettent cependant de proposer un modèle de pathogénie de la diarrhée néo-

natale du veau. Le premier symptôme serait une paralysie antrale et duodénale. Cette paralysie a été démontrée par Dardillat (1975). Elle apparaît dans les 24 heures précédant la diarrhée. Elle peut être due à l'absence du colostrum (Dardillat 1975) ou à un retard de l'établissement de la microflore intestinale dans le tube digestif (Dardillat et al. 1977). Une infection virale pourrait être aussi à l'origine d'une telle paralysie antrale puisque des lésions graves des cellules épithéliales de la caillette ont été observées chez des veaux gnotoxéniques inoculés par un rotavirus (Dubourguier et al. sous presse). Cette paralysie temporaire favoriserait la prolifération anormale de toute la microflore y compris d'*E. coli* dans le duodénum et le jéjunum (Contrefois et al. 1977) et également dans la caillette (Gouet, non publié). Cette prolifération anormale serait potentialisée par la présence de l'antigène K99, responsable de l'attachement des cellules bactériennes à la muqueuse intestinale (Smith et Linggood 1972). La multiplication d'*E. coli* est accompagnée *in vivo* de la production d'entérotoxines (Whipp et al. 1975) et la libération d'endotoxines. Les endotoxines interviendraient dans les phénomènes généraux cardio-vasculaires observés chez l'animal diarrhéique (Wray et Thomlinson 1972) et entretiendraient la paralysie de la caillette (Dubourguier 1977).

L'entérotoxine thermostable sécrétée au contact même de la muqueuse intestinale modifierait les échanges neutres $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{H}^+$ au travers de la membrane microvillositaire et induirait de ce fait une sécrétion de bicarbonate, celle-ci provoquant la perte

d'eau et d'électrolytes en quantités trop importantes pour pouvoir être réabsorbées par le côlon (Dubourguier 1977). Ces pertes de fluide n'étant pas compensées par des apports extérieurs se traduisent par la diarrhée et par la déshydratation de l'animal.

De nombreux travaux sont encore nécessaires pour préciser ce modèle. L'étude des plasmides d'attachement (K88, K99) est bien avancée mais il semble que d'autres antigènes (Moon et al. 1976, Guinee et al. 1977) peuvent intervenir. La nature chimique de l'entérotoxine thermostable, qui est la seule rencontrée chez les souches d'*E. coli* d'origine bovine, est encore inconnue. La purification est la condition *sine qua non* de l'étude précise de son mécanisme d'action au niveau cellulaire.

Nous nous sommes essentiellement attachés à *Escherichia coli* mais la microflore intestinale constitue un écosystème très complexe et très difficile à étudier. Chez les veaux diarrhéiques, des remaniements profonds des équilibres bactériens apparaissent (Contrefois et al. 1977) et il est nécessaire de préciser leur signification. Ils peuvent n'avoir aucune interférence avec la pathogénie de la diarrhée néo-natale des veaux, comme ils peuvent être déterminants en changeant la nature du milieu intestinal. Enfin, il ne faut pas négliger le rôle des virus, en particulier rotavirus et coronavirus dans ces diarrhées, car ils aggravent le syndrome déclenché, par inoculation d'*E. coli* chez le veau gnotoxénique (Gouet et al. 1978 sous presse, Dubourguier et al. 1978 sous presse).

Accepté pour publication le 12 décembre 1977.

Résumé

Les auteurs font le point des connaissances actuelles sur les propriétés entéropathogènes des *Escherichia coli* (adhérence et toxigenèse) chez le veau nouveau-né en les comparant à celles acquises chez le porcelet.

Un modèle de pathogénie des diarrhées colibacillaires du veau est proposé en tenant compte des données électromyographiques, bactériologiques et physiologiques.

Références.

- AL-AWQATI G., GRENOUGH W.B., CARPENTER C.C., 1969. Ethacrynic acid inhibits gut fluid loss in cholera. *Clin. Res.* **17**, 422a.
- ANDREMONT A., 1976. *Les entérotoxines colibacillaires. Techniques quantitatives de mesure in vivo.* Thèse de Doctorat en médecine. Faculté de Tours.

- ARBUCKLE J.B.R., 1970. The location of *E. coli* in the pig intestine. *J. Med. Microbiol.* **3**, 333-340.
- ARBUCKLE J.B.R., 1971. Enteropathogenic *E. coli* on the intestinal mucopolysaccharide layer of pigs. *J. Path.* **104**, 93-98.
- BELLAMY J.E.C., LATSHAW W.K., NIELSEN N.O., 1973. The vascular architecture of the porcine small intestine. *Cam. J. Comp. Med.* **37**, 56-62.
- BERTSCHINGER H.U., MOON H.W., WHIPP S.C., 1972. Association of *E. coli* with the small intestine. *Inf. Immun.* **5**, 595-605.
- BIBINOVA L.S., KRUGLIKHINA Z.M., NIKULNIKOVA N.S., 1971. Morphological changes induced in the guinea pig intestinal tract by enterally administered dysentery endotoxin. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol.* **15**, 212-219.
- BRIGGS C., LOVELL R., ASCHAFFENBURG R., BARTLETT S., KON S.K., ROY J.H., THOMPSON S.Y., WALKER D.W., 1951. The nutritive value of colostrum for the calf. 7. Observations on the nature of the protective properties of colostrum. *Brit. J. Nutr.* **5**, 356-362.
- BURROWS M.R., SELLWOOD R., GIBBONS R.A., 1976. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.* **96**, 269-275.
- BYWATER R.J., 1970. Some effects of *E. coli* enterotoxin on net fluid, glucose and electrolyte transfer in calf small intestine. *J. Comp. Path.* **80**, 565-573.
- BYWATER R.J., 1972. Dialysis and ultrafiltration of a heat-stable enterotoxin from *E. coli*. *J. Med. Microbiol.* **5**, 337-344.
- BYWATER R.J., 1973. Some effects of *E. coli* enterotoxin on unidirectional fluxes of water and sodium in calf Thiry-Vella loops. *Res. Vet. Sci.* **14**, 35-41.
- BYWATER R.J., 1973. Pathophysiological aspects of unidirectional water and sodium transport in calf intestine. *Ann. Rech. Vet.* **4**, 125-133.
- CARPENTER C.C., CURLIN G.T., GREENOUGH W.B., 1969. Response of canine Thiry Vella jejunal loops to cholera exotoxin and its modification by ethacrynic acid. *J. Inf. Dis.* **120**, 332-338.
- CASTROVA A., PEKAREK J., JOHANOUSKY J., 1972. A study of the vasoconstriction in the rabbit ear vessels during endotoxin fever and the systemic reaction of delayed (cellular) hypersensitivity. *Folia Biologica* **18**, 336-344.
- CONTREPOIS M., GOUET Ph., 1972. Importance d'*E. coli* dans l'étiologie de la diarrhée néo-natale du veau et efficacité de quelques mesures prophylactiques et thérapeutiques. *Bull. Techn. C.R.Z.V. de Theix I.N.R.A.* **9**, 41-54.
- CONTREPOIS M., GOUET Ph., 1973. La microflore du tube digestif du jeune veau préruminant : dénombrement de quelques groupes bactériens à différents niveaux du tube digestif. *Ann. Rech. Vet.* **4**, 161-170.
- CONTREPOIS M., GOUET Ph., GOBY J., 1977. Production expérimentale de diarrhées colibacillaires chez le veau et l'agneau. Equilibres bactériens dans le tube digestif de veaux et d'agneaux gnotoxéniques. *Sci. Techn. Anim. Lab.* (sous presse).
- CONTREPOIS M., GOUET Ph., HILLAIRE M.C., 1977. La flore digestive du veau sain et du veau diarrhéique. *Sci. Techn. Anim. Lab.* **2**, 115-118.
- COOPER J.F., LEVIN J., WAGNER H.N., 1971. Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* **78**, 138-148.
- CRAIG J.P., 1965. A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent sera. *Nature* (London), **207**, 614-616.
- DARDILLAT C., 1975. Gastro-intestinal motility in calf neonatal disease. In "Perinatal Ill-Health in calves". Comm. European Communities p. 111-122.
- DARDILLAT C., CONTREPOIS M., GOUET Ph., RIOU Y., 1977. Enregistrement chronique de la motricité gastro-intestinale chez le veau axénique ou oligoxénique. *Sci. Techn. Anim. Lab.* **2**, 120-121.
- DAVIS J.W., COLMANO G., 1971. Age and resistance to an *E. coli* endotoxin stressing agent in weanling piglets. *Am. J. Vet. Res.* **32**, 173-176.
- DE S.N., CHATTERJEE D.N., 1953. An experimental study of the mechanism of action of *V. cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Path. Bacteriol.* **66**, 559.
- DEAN A.G., CHING Y.C., WILLIAMS R.G., HARDEN L.B., 1972. Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Inf. Dis.* **125**, 407-411.
- DOE W.F., 1972. The secretory immune system of the intestine. *Gut* **13**, 572-578.
- DONOWITZ M., BINDER H.J., 1976. Effect of enterotoxins of *V. cholerae* and *S. dysenteriae* type 1 on fluid and electrolyte transport in the colon. *J. Inf. Dis.* **134**, 135-143.
- DONTA S.T., KING M., SLOPER K., 1973. Induction of steroidogenesis in tissue culture by cholera enterotoxin. *Nature (N. Biol.)* **243**, 246-247.
- DONTA S.T., MOON H.W., WHIPP S.C., 1974. Detection of heat-labile *E. coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science* **183**, 334-336.
- DONTA S.T., MOON H.W., WHIPP S.C., SKARTVEDT S.M., 1974. The in vivo production and inactivation of *E. coli* enterotoxin. *Gastroenterology* **7**, 983-990.
- DONTA T.S., SACK D.A., WALLACE R.B., DUPONT H.L., SACK R.B., 1974. Tissue-culture assay of antibodies to heat labile *E. coli* enterotoxins. *New Engl. J. Med.* **291**, 117-121.

- DONTA S.T., SMITH D.M., 1974. Stimulation of steroidogenesis in tissue culture by enterotoxigenic *E. coli* and its neutralization by specific antiserum. *Inf. Immun.* **9**, 500-505.
- DORNER F., JAKSCHE H., STOCKL W., 1976. *E. coli* enterotoxin: purification, partial characterization and immunological observations. *J. Inf. Dis.* **133**, S142-S156.
- DUBOURGUIER H.C., 1977. *Etude des entérotoxines d'E. coli : Importance dans la pathogénie des diarrhées du veau nouveau-né*. Thèse de Docteur-Ingénieur. Université de Clermont II.
- DUBOURGUIER H.C., GOUET Ph., MANDARD O., CONTREPOIS M., BACHELERIE C., 1978. Scanning Electron Microscopy of abomasum and intestine of gnotoxenic calves infected either with rotavirus, coronavirus or enteropathogenic *E. coli*, or with rotavirus and *E. coli*. *Ann. Rech. Vét. (sous presse)*.
- DUNCAN C.L., STRONG D.H., 1969. Ileal loop accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. *J. Bact.* **100**, 86-94.
- DYAR H.G., KEITH S.C., 1894. Notes on normal intestinal bacilli of the horse and of certain other domesticated animals. *Zbl. Bakt.* **16**, 838.
- ELLIOTT H.L., CARPENTER C.C., SACK R.B., 1970. Small bowel morphology in experimental canine cholera. A light and electron microscopy study. *Lab. Invest.* **22**, 112-120.
- ETKIN S., GORBACH S.L., 1971. Studies on enterotoxin from *E. coli* associated with acute diarrhea in man. *J. Lab. Clin. Med.* **78**, 81-87.
- EVANS D.J., CHEN L.C., CURLIN G.T., EVANS D.G., 1972. Stimulation of Adenylcyclase by enterotoxin. *Nature (N. Biol.)* **236**, 137-138.
- EVANS D.J., EVANS D.G., GORBACH S.L., 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *E. coli* isolated from man. *Inf. Immun.* **8**, 725-730.
- EVANS D.G., EVANS D.J., GORBACH S.L., 1973. Identification of enterotoxigenic *E. coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. *Inf. Immun.* **8**, 731-735.
- EVANS D.G., EVANS D.J., PIERCE N.F., 1973. Differences in the response of rabbit small intestine to heat labile and heat stable enterotoxins of *E. coli*. *Inf. Immun.* **7**, 873-877.
- EVANS D.J., EVANS D.G., RICHARSON S.H., GORBACH S.L., 1976. Purification of the Polymixin-released, heat-labile enterotoxin of *E. coli*. *J. Inf. Dis.* **133**, S97-S102.
- FALKOW S., WILLIAMS L.P., SEAMAN S.L., ROLLINS L.D., 1976. Increased survival in calves of *E. coli* K-12 carrying an Ent plasmid. *Inf. Immun.* **13**, 1005-1007.
- FINK A.D., KATZ R.L., 1972. Prevention of cholera-induced intestinal secretion in the cat by aspirin. *Nature* **238**, 270-271.
- FINKELSTEIN R.A., LARUE M.K., JOHNSTON D.W., VASIL M.L., CHO G.J., JONES J.R., 1976. Isolation and properties of heat-labile enterotoxin(s) from enterotoxigenic *E. coli*. *J. Inf. Dis.* **133**, S120-S138.
- FISHER E.W., 1971. Hydrogen ion and electrolytes disturbances in neonatal calf diarrhea. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **176**, 223-230.
- FULLER R., 1975. Nature of the determinant responsible for the adhesion of Lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 245-250.
- GIANELLA R.A., 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable *E. coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Inf. Immun.* **14**, 95-99.
- GIANELLA R.A., FORMAL S.B., DAMMING I., 1973. Pathogenesis of Salmonellosis. Studies on fluid secretion, mucosal invasion and morphologic reaction in the rabbit ileum. *J. Clin. Invest.* **52**, 441-462.
- GIBBONS R.J., VAN HOUTE J., 1971. Selective bacterial adherence to oral epithelial surface and its role as an ecological determinant. *Inf. Immun.* **3**, 567.
- GLYNN I.M., KARLISH S.J.D., 1975. The sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* **37**, 13-55.
- GORBACH S.L., KHURANA C.M., 1972. Toxigenic *E. coli*. A cause of infantile diarrhea in Chicago. *New Eng. J. Med.* **287**, 791-795.
- GOUET Ph., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., RIOU Y., SCHERRER R., LAPORTE J., VAUTHÉROT J.F., COHEN J., L'HARIDON R., 1978. The experimental production of diarrhoea in axenic and gnotoxenic calves with enteropathogenic *E. coli*, rotavirus, coronavirus and a combination of rotavirus and *E. coli*. *Ann. Rech. Vét. (sous presse)*.
- GUERRANT R.L., BRUNTOM L.L., SCHNAITAM T.C., REBHUN L.I., GILMAN A.G., 1974. C-AMP and alteration of hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *V. cholerae* and *E. coli*. *Inf. Immun.* **10**, 320-324.
- GUERRANT R.L., CHEN L.C., SHARP G.W., 1972. Intestinal adenyl cyclase activity in canine cholera: correlation with fluid accumulation. *J. Inf. Dis.* **125**, 377-381.
- GUERRANT R.L., GANGULY O., CASPER A.G.T., MOORE E.J., PIERCE N.F., CARPENTER C.C., 1973. Effect of *E. coli* on fluid transport across canine small bowel. *J. Clin. Invest.* **52**, 1707-1714.
- GUERRANT R.L., PIERCE N.F., 1972. Mechanism of action of an *E. coli* enterotoxin. *J. Clin. Invest.* **51**, 39a-40a.
- GUINEE P.A.M., AGTERBERG C.M., JANSEN W.H., FRIK J.F., 1977. Serological identification of pig enterotoxigenic *E. coli* strains not belonging to the classical serotypes. *Inf. Immun.* **15**, 549-555.

- GUINEE P.A.M., JANSEN W.H., AGTERBERG C.M., 1976. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *E. coli* isolated from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Inf. Immun.* **13**, 1369-1377.
- GUINEE P.A.M., VELDKAMP J., JANSEN W.H., 1977. Improved minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *E. coli*. *Inf. Immun.* **15**, 676-678.
- GYLES C.L., 1971. Heat labile and heat stable forms of the enterotoxin from *E. coli* strains enteropathogenic for pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **176**, 314.
- GYLES C.L., 1974. Immunological study of the heat-labile enterotoxins of *E. coli* and *V. cholerae*. *Inf. Immun.* **9**, 564-570.
- GYLES C.L., 1974. Relationships among heat-labile enterotoxins of *E. coli* and *V. cholerae*. *J. Inf. Dis.* **129**, 277-283.
- GYLES C.L., BARNUM D.A., 1969. A heat labile enterotoxin from strains of *E. coli* enteropathogenic for pigs. *J. Inf. Dis.* **120**, 419-426.
- GYLES C.L., SO M., FALKOW S., 1974. The enterotoxin plasmids of *E. coli*. *J. Inf. Dis.* **130**, 40-49.
- HENDRIX T.R., BAYLESS T.M., 1970. Digestion: intestinal secretions. *Ann. Rev. Physiol.* **32**, 139-164.
- HILLAIRE M.C., 1976. *Comparaison entre microflores digestives de veaux nouveau-nés sains et atteints de diarrhée. Etude particulière du genre Lactobacillus*. Thèse 3^e cycle - U.E.R. Sciences exactes et Naturelles Clermont-Ferrand.
- HOFSTAD T., KRISTOFFERSEN T., SELVIG K.A., 1972. Electron microscopy of endotoxic lipopolysaccharide from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Sphaerophorus*. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **80**, 413-419.
- HOLMGREN J., 1973. Comparison of the tissue receptors for *V. cholerae* and *E. coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxin. *Inf. Immun.* **8**, 851-859.
- HOLMGREN J., LONNROTH I., SVENNER HOLM L., 1973. Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM₁ ganglioside and related glycolipids. *Inf. Immun.* **8**, 208-214.
- HOLMGREN J., MANSSON J.E., QVENNER HOLM L., 1974. Tissue receptor for cholera exotoxin: structural requirements of GM₁ ganglioside in toxin binding and inactivation. *Med. Biol.* **52**, 229-233.
- ISSACSON R.E., 1977. K99 surface antigen of *E. coli*: purification and partial characterization. *Inf. Immun.* **15**, 272-279.
- JACKS T.M., WU B.J., 1974. Biochemical properties of *E. coli* low molecular weight heat stable enterotoxin. *Inf. Immun.* **9**, 342.
- JACKS T.M., WU B.J., BRAEME A.C., BIDLACK D.E., 1973. Properties of the enterotoxin component in the *E. coli* enteropathogenic for swine. *Inf. Immun.* **7**, 178.
- JENSEN, 1893. Ueber die Kälberruhr und deren aetiologie. *Monatshefte für Tierheilk.* **IV**, 97.
- JONES G.W., RUTTER J.M., 1972. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *E. coli* in piglets. *Inf. Immun.* **6**, 916.
- KADLECOVA O., ANOCHINA I.P., BAUER V., MASEK K., RASKOVA H., 1972. Effect of *E. coli* endotoxin on temperature and sleep cycles of rats. *J. Inf. Dis.* **126**, 179-181.
- KAECKENBEECK A., SCHOENAERS F., PASTORET P.P., JOSSE M., 1977. Absence d'entérotoxine thermolabile chez les *E. coli* entéropathogènes isolés du veau. *Ann. Méd. Vét.* **121**, 55-57.
- KANTOR H.S., TAO P., WISDOM C., 1974. Action of *E. coli* enterotoxin: Adenylate-cyclase behavior of intestinal epithelial cells in culture. *Inf. Immun.* **9**, 1003-1009.
- KAO V.C.Y., SPRINZ H., BURROWS H., 1972. Localization of cholera toxin in rabbit intestine. *Lab. Invest.* **26**, 148-153.
- KEDEM O., KATCHALSKY A., 1958. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non electrolytes. *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 229-246.
- KEUSCH G.I., JACEWICZ M., HIRSHMAN S.Z., 1972. Quantitative microassay in cell culture for enterotoxin of *Shigella dysenteriae*. *J. Clin. Invest.* **125**, 539-543.
- KEUSCH G.T., GRADY G.F., MATA L.J., 1972. The pathogenesis of *Shigella* diarrhea. Enterotoxin production by *Shigella dysenteriae*. *J. Clin. Invest.* **51**, 1212-1218.
- KILKENNY J.B., RUTTER J.M., 1975. General assesment of the situation in the United Kingdom. In "Perinatal Iiel-health in calves", 30-38. Commission of the European Communities.
- KIMBERG D.V., FIELD M., GERSHIDY E., 1973. Effects of cycloheximide on the response of intestinal mucosa to cholera enterotoxin. *J. Clin. Invest.* **52**, 1376-1383.
- KIMBERG D.V., FIELD M., HOHNSON J., HENDERSON A., GERSHON E., 1971. Stimulation of intestinal mucosal adenylyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J. Clin. Invest.* **50**, 1218-1230.
- KOHLER E.M., 1968. Enterotoxic activity of filtrats of *E. coli* in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* **29**, 2263-2274.
- KOHLER E.M., CROSS R.F., 1971. Feeding bacteria-free whole cell lysates of *E. coli* to gnotobiotic pigs and the effect of giving antisera. *Am. J. Vet. Res.* **32**, 739-748.
- KUBOTA Y., LIU P.V., 1971. An enterotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Inf. Dis.* **123**, 97-98.
- KWAN C.N., WISHNOW R.M., 1974. *E. coli* enterotoxin-induced steroidogenesis in cultured adrenal tumor cells. *Inf. Immun.* **10**, 146-151.

- LAPRAS M., 1970. Quelques éléments étiologiques et pathogéniques des diarrhées du porcelet servant de base à une méthode d'immunisation active. In « *La diarrhée des veaux nouveau-nés* » n° 49. Ed. S.E.I.
- LARIVIERE S., GYLES C.L., BARNUM D.A., 1972. A comparative study of the rabbit and pig gut loop systems for the assay of *E. coli* enterotoxin. **36**, 319-321.
- LARVOR P., 1975. General assesment of calf mortality in France. In "*Perinatal Ill-health in calves*" p. 17-23. Commission of the European Communities.
- LEE E.W., TREMPER R., PICKETT M.J., 1973. Purification and partial characterization of a heat stable *E. coli* enterotoxin. *Abs. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.* p. 101, M 168.
- LE MINOR L., 1974. Rôle de certains plasmides dans le déterminisme du pouvoir entéropathogène des *E. coli*. *Arch. Franç. Ped.* **31**, 705-716.
- LEVNER M., WIENER F.P., RUBIN B.A., 1977. Induction of *E. coli* and *V. cholerae* enterotoxins by an inhibitor of protein synthesis. *Inf. Immun.* **15**, 132-137.
- MAHMOOD A., SIDDIGI A.M., 1972. Studies on intestinal Na-K activated ATP ase. Effect of cycloheximide and puromycni. *Ind. J. Bioch. Biophys.* **9**, 206-207.
- MAIMON H., BANWELL J.G., HENDRIX T.R., 1972. Inhibition of cholera toxin induced secretion. *Clin. Res.* **20**, 459-462.
- MINIATS O.P., GYLES C.L., 1972. The significance of proliferation and enterotoxin production by *E. coli* in the intestine of gnotobiotic pigs. *Can. J. Comp. Med.* **36**, 150-159.
- MITCHELL I. de G., KENWORTHY R., 1976. Investigations on a metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *E. coli* pathogenic for pigs. *J. Appl. Bact.* **41**, 163-174.
- MOON H.W., NAGY B., ISAACSON R.E., ORSKOV IY., 1977. Occurrence of K99 antigen on *E. coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+ enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Inf. Immun.* **15**, 614-620.
- MOON H.W., WHIPP S.C., 1971. Systems for testing the enterophagogenicity of *E. coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **176**, 197-211.
- MOON H.W., WHIPP S.C., SKARTVEDT S.M., 1976. Etiologic diagnosis of diarrheal diseases of calves: frequency and methods for detecting enterotoxin and K99 antigen prouction by *E. coli*. *Am. J. Vet. Res.* **37**, 1025-1029.
- MORRIS J.A., STEVENS A.E., SOJKA W.J., 1977. Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from *E. coli* B41. *J. Gen. Microbiol.* **99**, 353-357.
- MUNDELL D.H., ANSELMO C.R., WISHNOW R.M., 1976. Factors influencing heat-labile *E. coli* enterotoxin activity. *Inf. Immun.* **14**, 383-388.
- NALIN D.R., BHATTACHARJEE A.K., RICHARDSON S.H., 1974. Cholera-like effect of culture filtrates of *E. coli*. *J. Inf. Dis.* **130**, 595-601.
- NIELSEN N.O., CULGSTON R.E., 1971. Comparison of *E. coli* endotoxin shock and acute experimental edema isease in young pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **176**, 176-189.
- NOCARD E., LECLAINCHE E., 1898. Infections colibacillaires, in « *Les maladies microbiennes des animaux* ». 104-117, Masson Ed.
- NORRIS H.T., CURRAN P.F., SCHULTZ S.G., 1969. Modification of intestinal secretion in experimental cholera. *J. Inf. Dis.* **119**, 117-125.
- ORSKOV I., ORSKOV F., SMITH H.W., SOJKA W.J., 1975. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *E. coli* K antigen, previously called "Kco" possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **88**, 31-36.
- OSBORNE J.C., MEREDITH J.H., 1970. The influence of environmental and surgical stressors on susceptibility to bacterial endotoxin. *Exp. Med. Surg.* **28**, 39-44.
- PARATT J.R., WINSLOW E., 1974. The haemodynamic effects of quoadine, a cardiac stimulant in experimental *E. coli* endotoxin shock in the cat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1**, 31-41.
- PARKINSON D.K., EBAL H., DIBONA D.R., SHARP G.W., 1972. Localization of the action of cholera toxin on adenylyl cyclase in mucosal epithelial cells of rabbit intestine. *J. Clin. Invest.* **51**, 2292-2298.
- PETERSON J.W., LOSPALLUTO J.J., FINKELSTEIN R.A., 1972. Localization of cholera toxin in vivo. *J. Inf. Dis.* **126**, 617-628.
- PIERCE N.F., 1973. Differential inhibitory effects of cholera toxoids and ganglioside on the enterotoxins of *V. cholerae* and *E. coli*. *J. Exp. Med.* **137**, 1009-1023.
- PIERCE N.F., WALLACE C., 1972. Stimulation of jejunal secretion by a crude *E. coli* enterotoxin. *Gastroenterology* **63**, 439-448.
- RAPPAPORT R.S., SAGIN J.F., PIERZCHALA W.A., BONDE G., RUBIN B.A., TINT H., 1976. Activation of heat labile *E. coli* enterotoxin by trypsin. *J. Inf. Dis.* **133**, S41-354.
- REECE W.O., WAHLSTROM J.D., 1973. *E. coli* endotoxemia in conscious calves. *Am. J. Vet. Res.* **34**, 765-769.
- REEVES J.T., DAOUD F.S., ESTRIDGE M., 1972. Pulmonary hypertension causes by minute amounts of endotoxin in calves. *J. Appl. Physiol.* **33**, 739-743.

- RENAULT L., LE BOURHIS E., MAIRE C., VAISSAIRE J., 1975. Enquête sur la colibacillose du porcelet nouveau-né. *Bull. Acad. Vet.*, **49**, 231-236.
- RENAULT L., 1970. Les diarrhées infectieuses du veau nouveau-né. In « *La diarrhée des veaux nouveaux-nés* ». Ed. S.E.I. n° 49.
- RENNIE R.P., ARBUTHNOTT J.P., 1974. Partial characterization of *E. coli* haemolysin. *J. Med. Microbiol.* **7**, 189-193.
- ROGGIN G.M., BANWELL J.G., YARDLEY J.H., 1972. The unimpaired response of rabbit jejunum to cholera toxin after selective damage to villus epithelium. *Gastroenterology* **63**, 981-989.
- RUTTER J.M., LUTHER P.D., 1973. Cytopathic factors in bacteria-free lysates of *E. coli*. *J. Med. Microbiol.* **6**, 565-571.
- SACK R.B., GORBACH S.L., BANWELL J.G., JACOBS G., CHATTERJEE B.D., MITRA R.C., 1971. Enterotoxigenic *E. coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Inf. Dis.* **23**, 378.
- SACK R.B., JOHNSON J., PIERCE N.F., KEREN D.F., YARDLEY J.H., 1976. Challenge of dogs with live enterotoxigenic *E. coli* and effects of repeated challenges on fluid secretion in jejunal Thiry-Vella loops. *J. Inf. Dis.* **134**, 15-24.
- SACK D.A., SACK R.B., 1975. Test for enterotoxigenic *E. coli* using Y₁ adrenal cells in miniculture. *Inf. Immun.* **11**, 334-337.
- SANTOS D.S., PALCHAUDHURI, MAAS W.K., 1975. Genetic and physical characteristics of an enterotoxin plasmid. *J. Bact.* **124**, 1240-1247.
- SAVAGE D.C., BLUMERSHINE R.V., 1974. Surface-surface association in microbial communities populating epithelial habitats in the murine gastro-intestinal ecosystem: Scanning electron microscopy. *Inf. Immun.* **10**, 240.
- SCHENKEIN I., GREEN R.F., SANTOS D.S., MAAS W.K., 1976. Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *E. coli*. *Inf. Immun.* **13**, 1710-1720.
- SCHERRER R., COHEN J., L'HARIDON R., FEYNEROL C., 1975. A Reovirus-like agent associated with neonatal calf gastroenteritis in France. In "*Perinatal Ill-Health in calves*", 72-76, Commission of the European Communities.
- SCHULTZ S.G., FRIZZELL R.A., NELLANS H.N., 1974. Ion transport by mammalian small intestine. *Ann. Rev. Physiol.* **36**, 51-91.
- SCHWARTZ C.J., KIMBERG D.V., WARE P., 1975. Adenylate-cyclase in intestinal crypt and villus cells: Stimulation by cholera enterotoxin and prostaglandin E₁. *Gastroenterology* **68**, 94-104.
- SEREBRO H.A., IBER F.L., YARDLEY J.H., HENDRIX T.R., 1969. Inhibition of cholera toxin action in the rabbit by cycloheximide. *Gastroenterology* **56**, 506-511.
- SHARP G.W., HYNIE S., 1971. Stimulation of intestinal adenylyl-cyclase by cholera toxin. *Nature* **229**, 266-269.
- SHARP G.W., HYNIE S., LIPSON L.C., PARKINSON D.K., 1971. Action of cholera toxin to stimulate adenylyl-cyclase. *Trans. Assoc. Am. Phys.* **84**, 200-211.
- SIVASWAMY G., GYLES C.L., 1976. The prevalence of enterotoxigenic *E. coli* in the feces of calves with diarrhea. *Can. J. Comp. Med.* **40**, 241-246.
- SMITH H.W., 1962. Observations on the aetiology of neonatal diarrhea (Scours) in calves. *J. Path. Bact.* **84**, 147-168.
- SMITH H.W., 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Path. Bact.* **89**, 95-122.
- SMITH H.W., 1971. The bacteriology of the alimentary tract of domestic animals suffering from *E. coli* infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **176**, 110-125.
- SMITH H.W., 1972. The nature protective effect of antisera against *E. coli*. *J. Med. Microbiol.* **5**, 345-354.
- SMITH H.W., 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *E. coli*: The discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated or identical with Colicin V. *J. Gen. Microbiol.* **83**, 85-105.
- SMITH H.W., GYLES C.L., 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *E. coli* of porcine origin. *J. Med. Microbiol.* **3**, 387-401.
- SMITH H.W., GYLES C.L., 1970. The effect of cell-free fluids prepared from cultures of human and animal enteropathogenic strains of *E. coli* on ligated intestinal segments of rabbit and pig. *J. Med. Microbiol.* **3**, 403-409.
- SMITH H.W., HALLS S., 1967. Observations by the ligated intestinal segments and oral inoculation methods on *E. coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Path. Bact.* **93**, 499-529.
- SMITH H.W., HALLS S., 1967. Studies on *E. coli* enterotoxin. *J. Path. Bact.* **93**, 531-543.
- SMITH H.W., HALLS S., 1968. Experimental infection of calves with bacteriaemia-producing strains of *E. coli*: The influence of caecostrom. *J. Med. Microbiol.* **1**, 61-78.
- SMITH H.W., HALLS S., 1968. The transmissible nature of the genetic factor that controls enterotoxin production in *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.* **52**, 319-334.
- SMITH H.W., LINGGOOD M.A., 1971. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *E. coli* with particular reference to porcine diarrhea. *J. Med. Microbiol.* **4**, 467-485.

- SMITH H.W., LINGGOOD M.A., 1972. Further observations on *E. coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: The transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.* **5**, 243-250.
- SMITH T., ORCUTT M.L., 1925. The bacteriology of the intestinal tract of young calves with special reference to the early diarrhea (Scours). *J. Exp. Med.* **41**, 89-106.
- SO M., BOYER H.W., BETLACH M., FALKOW S., 1976. Molecular cloning of an *E. coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin. *J. Bact.* **128**, 463-472.
- SO M., CROSA J.H., FALKOW S., 1975. Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmid. *J. Bact.* **121**, 234-238.
- SOERGEL K.H., 1973. New concepts of intestinal function. *Acta Hepato-Gastroenterol.* **20**, 351-358.
- SOJKA W.J., 1965. *Escherichia coli* in animals. Commonwealth Agricultural Bureau. Farnham Royal England.
- STIRM S., ORSKOV F., ORSKOV I., MANSA B., 1967. Episome-carried surface antigen K88 of *E. coli*: II. Isolation and chemical analysis. *J. Bact.* **93**, 731-739.
- STIRM S., ORSKOV F., ORSKOV I., BIRCH-ANDERSEN A., 1967. Episome-carried surface antigen K88 of *E. coli*: III. Morphology. *J. Bact.* **93**, 740-748.
- SULLIVAN R., 1969. Effects of enterotoxin B on intestinal transport *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **131**, 1159-1162.
- TENNANT B., HARROLD D., REINA-GUERRA M., 1972. Physiologic and metabolic factors in the pathogenesis of neonatal enteric infection in calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **161**, 993-1007.
- THOMAS J., 1975. General assessment of the situation in Belgium. In "*Perinatal Ill-Health in calves*", 7-9, Commission of the European Communities.
- TIXIER G., GOUET Ph., 1975. Mise en évidence d'une structure agglutinant les hématies de cheval en présence de mannose et spécifique des souches d'*E. coli* entérotoxiques d'origine bovine. *C. R. Acad. Sci. série D* **281**, 1641.
- TRUSZCZYNSKI M., CIOSEK D., 1972. Antigenic properties of enterotoxins and water extracts obtained from *E. coli* pathogenic for pigs. *Res. Vet. Sci.* **13**, 205-211.
- VALLEE A., RENAULT L., LE PRIOL A., 1970. Infection colibacillaire des veaux: Etude des souches d'*E. coli* isolées en France. *Bull. Acad. Vet.* **53**, 383.
- VAN HEYNINGEN S., 1976. The subunits of cholera toxin: Structure, stoichiometry and function. *J. Inf. Dis.* **133**, S5-S13.
- VAN YEHNINGEN N.E., CARPENTER C.C., PIERCE N.F., GREENOUGH W.B., 1971. Deactivation of cholera toxin by ganglioside. *J. Inf. Dis.* **124**, 415-418.
- VAN MIERT A.S., FRENS J., 1968. The reactions of different animal species to bacterial pyrogens. *Zbl. Vet. Med.* **15**, 532-543.
- VERDURA T., 1972. *Morphologie, histochimie du système entérochromaffine et motricité de l'intestin au cours de la diarrhée spontanée ou expérimentale du veau nouveau-né*. Thèse de 3^e Cycle. Université de Clermont-Ferrand.
- WACHSMUTH I.K., FALKOW S., RYDER R.W., 1976. Plasmid-mediated properties of a heat-stable enterotoxin-producing *E. coli* associated with infantile diarrhea. *Inf. Immun.* **14**, 403-407.
- WAXLER G.L., CHRISTIE B.R., DREES D.T., 1971. Use of gnotobiotic pigs in the study of *E. coli* infections. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **176**, 141-149.
- WHIPP S.C., DONTA S.T., 1976. Serum antibody to *E. coli* heat-stable enterotoxin in cattle and swine. *Am. J. Vet. Res.* **37**, 905-906.
- WHIPP S.C., MOON H.W., 1972. Modification of enterosorption induced by a heat-labile *E. coli* enterotoxin in rabbit intestinal loops. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**, 395-398.
- WHIPP S.C., MOON H.W., LYON N.C., 1975. Heat-stable *E. coli* enterotoxin production *in vivo*. *Inf. Immun.* **12**, 240-244.
- WHITE R.G., MEBUS C.A., TWIEHAUS M.J., 1970. Incidence of herds infected with a neonatal calf diarrhea virus. *Vet. Med.* **65**, 487-489.
- WOBER W., ALAUPOVIC P., 1971. Studies on protein moiety of endotoxin from Gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* **19**, 340-367.
- WOODE G.N., BRIDGER J.C., HALL G., DENNIS M.J., 1974. The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhea in colostrum-deprived calves in Great-Britain. *Res. Vet. Sci.* **16**, 102-104.
- WOODS M.W., LANDY M., WHITBY J.L., BURK D., 1961. Metabolic effects of endotoxins on mammalian cells. *Bact. Rev.* **25**, 447-458.
- WRAY C., THOMLINSON J.R., 1972. The effects of *E. coli* endotoxins in calves. *Res. Vet. Sci.* **13**, 546-553.
- WRAY C., THOMLINSON J.R., 1972. Dermal reactions to endotoxins in calves. Their significance in the pathogenesis of colibacillosis. *Res. Vet. Sci.* **13**, 554-562.
- WRAY C., THOMLINSON J.R., 1972. Anaphylactic shock to *E. coli* endotoxin in calves. *Res. Vet. Sci.* **13**, 563-569.
- ZWEIFACH B.W., JANOFF A., 1964. Bacterial endotoxemia. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 201-220.