

République Algérienne
Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement
Supérieur et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية
الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**Recherche et caractérisation des
Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines
(STEC) isolés de carcasses ovines dans deux abattoirs
d'Alger**

Présentée par : Dr. FERHAT LILA

Soutenue le : 30-01-2020

Membres du jury :

Présidente: M ^{me} AIT OUDHIA Khatima	Professeur	ENSV
Directeur de thèse : M. HAMDI Taha Mossadak	Professeur	ENSV
Co-Directrice de thèse : M ^{me} CHAHED Amina	Maître de Conférences A	ENSV
Examineur 1 : M ^{me} DIB Amira	Maître de Conférences A	Univ.Constantine
Examineur 2 : M ^{me} BOUAYAD Lila	Maître de Conférences A	ENSV
Examineur 3 : M. BENSID Abdelkader.	Maître de Conférences A	Univ.Djelfa
Examineur 4 : M. HOUICHER Abderrahmane	Maître de Conférences A	Univ. Laghouat
Invitée d'honneur : M ^{me} OUAR-KORICHI Mounira	Professeur	CPMC

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement mon Directeur de thèse, Monsieur Hamdi T.M. Je lui suis particulièrement reconnaissante de la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce présent travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à ma Co-Directrice de thèse, Madame Chahed A., qui est à l'origine de mon travail et de toute ma démarche de recherche ; je la remercie de m'avoir encadré et d'avoir toujours apporté des réponses à mes questions et préoccupations, malgré son emploi du temps des plus chargé.

Je suis particulièrement honorée de pouvoir compter parmi les membres de mon jury :

Mme AIT OUDHIA K., qui a bien voulu investir de son temps dans la lecture de ma thèse ; je la remercie vivement d'avoir bien voulu présider le jury ;

Mme DIB A., Maître de Conférences A à l'université Frères Mentouri de Constantine ;

Mme BOUAYAD L., Maître de Conférence A à l'ENSV ;

M. BENSID A., Maître de Conférences A à l'université de Djelfa ;

M. HOUICHER A., Maître de Conférences A à l'université de Laghouat ;

Mme Ouar-Korichi M., Professeur au centre Pierre et Marie Curie d'Alger ;

Je les remercie infiniment pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu me porter en acceptant de participer à mon jury et à l'évaluation de ce travail.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à Madame Ouar-Korichi M., responsable du laboratoire des entérobactéries et autres bactéries apparentées de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA), pour avoir bien voulu m'accueillir au sein de son service.

Je remercie chaleureusement Madame Hamrouche S., pour m'avoir accompagné avec son professionnalisme, sa gentillesse et sa sympathie tout au long de la réalisation de la partie expérimentale au laboratoire des entérobactéries et autres bactéries apparentées de l'Institut Pasteur d'Alger.

Enfin, je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Monsieur Boudjalaba S., Madame Baazizi R. et à Madame Zenad W., pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie.

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail :

A mon père qui a semé en moi l'amour des études et qui m'a inculqué les véritables valeurs de la vie ;

A ma douce et tendre mère qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager, ce qui m'a permis d'être la femme que je suis ;

A mon époux qui a su être patient, compréhensif et disponible. Je n'oublierai jamais son soutien et ses encouragements ;

A mes enfants Ilyas et Amine, à qui je souhaite tout le bonheur du monde. Que Dieu vous protège ;

A mes très chers frères Samir et Yacine. Que Dieu vous bénisse ;

A ma belle-mère, mes belles-sœurs et à mes beaux-frères, qui sont très chers à mon cœur ;

A mes neveux et nièces ;

A mes chers oncles et tantes de mes deux grandes familles ;

A mes cousins et cousines de mes deux grandes familles ;

A la mémoire de mes défunt(e)s grand-mères ;

A la mémoire de mes défunt(e)s grands-pères et oncles ;

A la mémoire de mon défunt beau-père ;

A tous mes confrères et consœurs de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

Résumé

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont connus pour être les principaux agents infectieux responsables des diarrhées hémorragiques chez l'homme. Ils ont été incriminés dans plusieurs épidémies à travers le monde. Cinq à dix pourcents des personnes infectées développent une complication sévère, le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les bovins et autres ruminants (ovins, caprins) sont les principaux réservoirs de ces pathogènes. A ce titre, le présent travail a eu pour objectif de rechercher et de caractériser les STEC O157 et non- O157 à partir de carcasses ovines produites dans deux abattoirs de la wilaya d'Alger dans le but d'estimer leur contamination par ces agents infectieux extrêmement virulents. Pour atteindre cet objectif, nous avons effectué deux études. La première visait la recherche et la caractérisation des STEC O157 par la technique de séparation immuno-magnétique (IMS). Un double écouvillonnage (humide/sec) de cent cinquante et une (151) carcasses ovines a été effectué dans les abattoirs de Rouiba et d'El-Harrach. Après enrichissement, l'isolement des STEC à partir de la gélose CT-SMAC a été suivi d'un sérotypage et d'un antibiogramme. Les gènes codant pour les facteurs de virulence (*stx*₁, *stx*₂ et *eae*) ont été détectés par amplification génique (PCR). La deuxième étude a eu pour objet la recherche des STEC O157 et non-O157 à partir de trois cent soixante-six (363) carcasses ovines produites dans l'abattoir d'El-Harrach par screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence par PCR multiplex. Un isolement des STEC à partir des échantillons positifs à la PCR a été réalisé sur gélose CHROMagar STEC, suivi d'un sérogroupage et d'un antibiogramme. Les résultats de la première étude ont révélé la présence des STEC O157 : H7 dans 7,28 % des échantillons analysés. La caractérisation phénotypique a montré que 76,92% des *E. coli* O157 :H7 étaient sorbitol et β -glucuronidase négatifs et 23,08% sorbitol et β -glucuronidase positifs. Le profil génotypique des bactéries isolées était le suivant : *stx*₂⁺ *eae*⁺ (53,85%), *stx*₁⁺ *eae*⁺ (7,69%), *stx*₂⁺ (23,08%) *eae*⁻ (7,69%) et *stx*⁻ *eae*⁻ (7,69%). Le résultat de l'antibiogramme a indiqué que 23,08% des isolats étaient résistants à la tétracycline, 7,69% aux furanes et 7,69% à la fois aux furanes et à la tétracycline, alors que 61,54% étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. La deuxième étude a révélé la présence des marqueurs génétiques *stx*⁺/*stx*⁺ *eae*⁺ dans 31,95% des échantillons analysés. Les gènes détectés étaient les suivants : *stx*₁⁺ (20,66%), *stx*₂⁺ (1,65%), *stx*₁⁺ *stx*₂⁺ (1,38%), *stx*₁⁺ *eae*⁺ (7,16%), *stx*₂⁺ *eae*⁺ (0,55%) et *stx*₁⁺ *stx*₂⁺ *eae*⁺ (0,55%). La présence du marqueur génétique *eae*⁺ a été détectée dans 9,92% des échantillons. Le taux des isolats identifiés à partir des échantillons positifs à la PCR a été de 17,24%. Des bactéries isolées, 16,38% appartenaient à l'espèce *E. coli* (STEC), et 0,86% appartenaient à *Citrobacter braakii* (*eae*⁺ *stx*₁⁺). Ce dernier a été isolé puis rapporté pour la première fois lors de cette étude. Parmi les STEC isolés, 26,3% ont agglutiné avec l'antisérum O26 et 73,7% ont donné un résultat négatif vis-à-vis des différents sérums testés. Le résultat de l'antibiogramme a révélé que 31,58% des STEC présentaient une résistance à au moins un antibiotique, et 68,42% étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Des taux de résistance ont été enregistrés pour : l'amoxicilline (10,53%), l'amoxicilline, l'ampicilline et la cefazoline (10,53%), l'amoxicilline, l'ampicilline, la ticarcilline, la streptomycine, la kanamycine, la tétracycline, les sulfamides, la triméthoprine et la cotrimoxazole (10,53%). En conclusion, la présence de STEC O157 et non-O157 potentiellement pathogènes a été confirmée sur la surface des carcasses ovines produites dans les abattoirs étudiés. Les STEC isolés présentent un double danger pour le consommateur. Le premier est lié au pouvoir pathogène des bactéries présentes ; le second à la possibilité de dissémination de souches résistantes via cette denrée. Des mesures correctives doivent être envisagées au niveau des abattoirs pour éviter la survenue de flambées épidémiques en Algérie où la viande ovine est très appréciée.

Mots clé : STEC, carcasses ovines, PCR multiplex, facteurs de virulence, sensibilité aux antibiotiques, abattoirs.

Abstract

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are known to be the main infectious agents responsible for bloody diarrhea in humans. They have been incriminated in several epidemics around the world. Five to ten percent of infected people develop a severe complication, hemolytic uremic syndrome (HUS). Cattle and other ruminants (sheep, goats) are the main reservoirs of these pathogens. In this context, the present work aimed to research and characterize STEC O157 and non-O157 from sheep carcasses produced in two slaughterhouses in the wilaya of Algiers in order to estimate their contamination by these extremely virulent infectious agents. To achieve that objective, two studies have been conducted. The first focused on research and characterization of STEC O157 by the immuno-magnetic separation (IMS) technique. A double (wet / dry) swab of one hundred fifty-one (151) sheep carcasses was carried out in the slaughterhouses of Rouiba and El-Harrach. After enrichment, the isolation of STEC from CT-SMAC agar was followed by serotyping and antibiogram. The genes encoding the virulence factors (*stx*₁, *stx*₂ and *eae*) were detected by gene amplification (PCR). The second study involved the search for STEC O157 and non-O157 from three hundred and sixty three (363) sheep carcasses produced in the El-Harrach slaughterhouse by molecular screening of genes coding for virulence factors using Multiplex PCR. STEC isolation from PCR positive samples was performed on CHROMagar STEC agar, followed by serotyping and antibiogram. The results of the first study revealed the presence of STEC O157 : H7 in 7,28% of analyzed samples. The phenotypic characterization showed that 76,92% of the *E. coli* O157: H7 were sorbitol and β-glucuronidase negative and 23,08% sorbitol and β-glucuronidase positive. The genotypic profile of the isolated bacteria was as follows: *stx*₂⁺ *eae*⁺ (53,85%), *stx*₁⁺ *eae*⁺ (7,69%), *stx*₂⁺ (23,08%) *eae*⁺ (7,69%) and *stx*⁻ *eae*⁻ (7,69%). The antibiogram results indicated that 23,08% of the isolates were resistant to tetracycline, 7,69% to furans and 7,69% to furans and tetracycline, while 61,54% were sensitive to all tested antibiotics. The second study revealed the presence of *stx*⁺ / *stx*⁺ *eae*⁺ genetic markers in 31,95% of the analyzed samples. The genes detected were: *stx*₁⁺ (20,66%), *stx*₂⁺ (1,65%), *stx*₁⁺ *stx*₂⁺ (1,38%), *stx*₁⁺ *eae*⁺ (7,16%), *stx*₂⁺ *eae*⁺ (0,55%) and *stx*₁⁺ *stx*₂⁺ *eae*⁺ (0,55%). The presence of the *eae*⁺ genetic marker was detected in 9,92% of the samples. The rate of isolates identified from PCR-positive samples was 17,24%. Among all isolated bacteria, 16,38% belonged to the *E. coli* species (STEC), and 0,86% belonged to *Citrobacter braakii* (*eae*⁺ *stx*₁⁺). The latter was isolated and reported for the first time in this study. Among the isolated STECs, 26,3% agglutinated with the O26 antiserum and 73,7% gave a negative result against the different sera tested. The antibiogram result showed that 31,58% of the STECs were resistant to at least one antibiotic, and 68,42% were sensitive to all tested antibiotics. Resistance rates were recorded for: amoxicillin (10,53%), amoxicillin, ampicillin and cefazoline (10,53%), amoxicillin, ampicillin, ticarcillin, streptomycin, kanamycin, tetracycline, sulfonamides, trimethoprim and cotrimoxazole (10,53%). To conclude, the presence of potentially pathogenic STEC O157 and non-O157 was confirmed on the surface of sheep carcasses produced in the studied slaughterhouses. Isolated STECs pose a double hazard to the consumer. The first is related to the pathogenicity of the bacteria present; the second to the possibility of dissemination of resistant strains via this commodity. Corrective measures should be considered at slaughterhouse level to avoid the occurrence of epidemic outbreaks in Algeria where sheep meat is highly appreciated.

Key words: STEC, ovine carcasses, multiplex PCR, virulence factors, antibiotic sensitivity, slaughterhouses.

ملخص

من المعروف أن الإشريكية القولونية المنتجة للسموم من نوع الشبيغا (STEC) هي من مسببات الرئيسية المسؤولة عن الإسهال النزفي لدى الإنسان. لقد تم إتهامهم في العديد من الأوبئة في جميع أنحاء العالم. يصاب خمسة إلى عشرة في المئة من المرضى بمضاعفات شديدة، أعراض التحلل الدموي اليوريمي (HUS). الأبقار وغيرها من المجترات (الأغنام والماعز) هي الخزانات الرئيسية لمسببات الأمراض هاته. على هذا النحو، كان المغزى من هذا العمل البحث عن STEC O157 وغير O157 وتحديد مواصفاتها في ذبائح الأغنام المنتجة في مذبحين بولاية الجزائر العاصمة من أجل تقدير مدى تلوثها بهذه العوامل المعدية فائقة الخطورة. لتحقيق هذا الهدف، أجرينا دراستين. الأولى تمثلت في البحث عن STEC O157 وتمييزها بواسطة تقنية الفصل المناعي المغناطيسي (IMS). تم إجراء المسح المزدوج (رطب / جاف) لمائة وواحد وخمسين (151) ذبيحة غنم في مذبحي روية و الحراش. بعد إثراء العينات، تبع عزل STEC من الوسط CT-SMAC بالتشخيص المصلي ثم التتميط بالمضاد الحيوي. تم رصد الجينات التي تشفر عوامل الضراوة (stx_1 , stx_2 , eae) عن طريق تضخيم الجينات (PCR). كان الهدف من الدراسة الثانية البحث عن STEC O157 وغير O157 من ثلاثمائة وثلاثة وستين (363) ذبيحة غنم في مذبح الحراش بواسطة الفحص الجزيئي للجينات الرامزة لعوامل الضراوة عن طريق PCR المتعدد. تم عزل العينات STEC الإيجابية لـ PCR من الوسط CHROMagar STEC متبوعاً باختبار التشخيص المصلي واختبار التتميط بالمضاد الحيوي. كشفت نتائج الدراسة الأولى عن وجود STEC O157: H7 في 28,7% من العينات التي تم تحليلها. أظهر التوصيف المظهري أن 76,92% من O157: H7 *E.coli* كانت سالبة السوربيتول و β -جلوكورونيداز و 23,08% كانت إيجابية السوربيتول و β -جلوكورونيداز. كان المظهر الجيني للبكتيريا المعزولة على التالي: $stx_2^+ eae^+$ (53,85%) , $stx_1^+ eae^+$ (7,69%) , stx_2^+ (23,08%) , stx_1^+ (7,79%) و eae^+ (7,69%) و $eae^- stx^-$. أشارت نتائج اختبار التتميط بالمضاد الحيوي أن 23,08% من العزلات كانت مقاومة للنتراسايكلين ، 7,69% للفيوران و 7,69% لكل من الفوران والنتراسايكلين ، بينما 54,61% كانت حساسة لجميع المضادات الحيوية المختبرة. كشفت الدراسة الثانية عن وجود العلامات الوراثية $stx^+ / stx^+ eae^+$ في 31,95% من العينات التي تم تحليلها. كانت الجينات المكتشفة على النحو التالي: stx_1^+ (20,66%) , stx_2^+ (1,65%) , $stx_1^+ eae^+$ (7,16%) , $stx_1^+ stx_2^+$ (1,38%) , $stx_2^+ eae^+$ (0,55%) و $stx_1^+ stx_2^+ eae^+$ (0,55%). تم الكشف عن وجود العلامة الجينية eae^+ في 9,92% من العينات. كانت نسبة العزلات التي تم تحديدها من العينات الإيجابية لـ PCR 17,24%. من بين البكتيريا المعزولة، 16,38% تنتمي إلى *E.coli* (STEC) و 0,86% تنتمي إلى *Citrobacter braakii* ($stx_1^+ eae^+$) التي تم عزلها وذكرها للمرة الأولى في هذه الدراسة. من بين STEC المعزولة، 26,3% تكتلت مع مضاد المصل O26 و 73,7% أعطت نتيجة سلبية مع باقي مختلف الأمصال المختبرة. كشفت نتائج اختبار التتميط بالمضاد الحيوي أن 31,58% من STEC كانت مقاومة لمضاد حيوي على الأقل، بينما 68,42% كانت حساسة لجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها. تم تسجيل نسب المقاومة لـ: الأموكسيسيلين (10,53%) ، الأموكسيسيلين والسيفازولين (10,53%) ، الأموكسيسيلين ، التيكارسيلين ، الستربتومايسين ، كاناميسين ، التتراسيكلين ، السلفوناميدات ، تريميثوبريم وكوتريموكسازول (10,53%). في الختام، تم تأكيد وجود STEC O157 وغير O157 المسببة للأمراض على سطح ذبائح الأغنام المنتجة في المذبحين المدروسين. تشكل STEC المعزولة خطراً مزدوجاً على المستهلك. الأول يرتبط بالقدرة المرضية لهذه البكتيريا ، الثاني يتعلق بإمكانية إنتشار سلالات بكتيرية مقاومة عبر هذه السلعة. ينبغي إذن النظر في التدابير التصحيحية على مستوى المذابح لتجنب حدوث تفشي الوباء في الجزائر أين إستهلاك لحوم الأغنام محبوب بدرجة عالية.

الكلمات المفتاحية: ذبائح الأغنام، PCR المتعدد، عوامل الضراوة، الحساسية للمضادات الحيوية، STEC ، المذابح.

Liste des figures

Figure 1. Classification des <i>E. coli</i> diarrhéiques.....	7
Figure 2. Modèles d'adhérence des <i>E. coli</i> entériques.....	9
Figure 3. Diagramme de Venn illustrant le système de classification des EPEC/EHEC/STEC/AEEC.....	11
Figure 4. Différents mécanismes de transfert d'ADN chez les bactéries	14
Figure 5. Modèle de l'émergence d' <i>E. coli</i> O157 : H7	15
Figure 6 : Mode d'action des Shiga-toxines sur les cellules eucaryotes	25
Figure 7. Evolutions cliniques de la colite hémorragique due à <i>E. coli</i> O157 : H7	32
Figure 8 : Membre postéro-externe de la cuisse (zone A).....	54
Figure 9 : Flanc (zone B).....	54
Figure 10 : Gros bout de la poitrine (zone C).....	54
Figure 11 : Face postérieure du membre antérieur (zone D)	54
Figure 12 . Dynal simple Mixer.....	58
Figure 13 . Dynal MPC- M	58
Figure 14. Test d'agglutination au latex anti-O157	60
Figure 15. Migration des bandes d'ADN sur l'électrophorèse sur gel.....	64
Figure 16. Protocole de recherche d' <i>E. coli</i> O157 : H7	65
Figure 17. Colonies d' <i>E. coli</i> O157 sorbitol négatives sur le milieu CT-SMAC	67
Figure 18. Colonies d' <i>E. coli</i> O157 sorbitol positives sur le milieu CT-SMAC	68
Figure 21. Colonie agglutinant l'antisérum H7	69
Figure 22. Visualisation des gènes <i>eae</i> et <i>stx</i> ₂ des <i>E. coli</i> O157: H7 après PCR par transillumination	72
Figure 23. Taux des gènes identifiés à partir des <i>E. coli</i> O157 :H7 isolés	73
Figure 24. Antibiotogramme	74
Figure 25. Caractérisation phénotypique et génotypique des <i>E. coli</i> O157 : H7 isolés, ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques	75
Figure 26. Etapes de recherche des STEC par screening moléculaire	81
Figure 27. Résultats du screening moléculaire	82
Figure 28. Visualisation des gènes de virulence <i>eae</i> , <i>stx</i> ₁ et <i>stx</i> ₂ après screening par PCR multiplex	83
Figure 29. Taux de détection des gènes codant pour les facteurs de virulence	84
Figure 30 : Aspect des STEC sur le milieu chromogène CHROMagar STEC.....	85
Figure 31 : Aspect de <i>Citrobacter braakii</i> sur CHROMagar STEC.....	85
Figure 32 : Colonie agglutinant le latex <i>E. coli</i> Seroscreen	85
Figure 33 : Colonie agglutinant le latex anti-O26	85
Figure 34. Taux des bactéries isolées après screening moléculaire	86
Figure 35. Visualisation des gènes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ et <i>eae</i> après isolement et caractérisation des bactéries	87
Figure 36. Représentation graphique des taux des gènes détectés par espèce bactérienne isolée	88
Figure 37. Représentation graphique des taux des pathogènes détectés, des espèces bactériennes isolées, des sérogroupes identifiés et de la sensibilité des STEC isolés aux antibiotiques.....	90

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux caractères biochimiques d' <i>E. coli</i>	4
Tableau 2. Principaux sérogroupes de STEC responsables d'épidémies à travers le monde	17
Tableau 3. Principaux critères biochimiques des STEC O157 et non-O157	18
Tableau 4. Température de croissance des STEC	19
Tableau 5. Plages de pH permettant la croissance des STEC.....	19
Tableau 6. a_w nécessaire à la croissance des STEC.....	19
Tableau 7. Description de quelques épidémies d'infection à STEC dans le monde, de 1982 à 2019....	40
Tableau 8. Paires d'amorces utilisées dans cette étude	61
Tableau 9. Nombre de carcasses ovines contaminées par <i>E. coli</i> O157 : H7 dans les deux abattoirs ...	67
Tableau 10. Identification phénotypique et sérologique des <i>E. coli</i> O157 : H7 isolés à partir des carcasses ovines au niveau des deux abattoirs.....	70
Tableau 11. Caractère génotypique des <i>E. coli</i> O157: H7 isolés à partir de chaque carcasse prélevée .	71
Tableau 12. Caractérisation génotypique des <i>E. coli</i> O157: H7 isolés	73
Tableau 13. Caractérisation et sensibilité aux antibiotiques des <i>E. coli</i> O157: H7 isolés	74
Tableau 14. Résultats du screening par PCR multiplex pour les gènes <i>eae</i> , <i>stx₁</i> et <i>stx₂</i>	83
Tableau 15. Caractérisation génotypique des bactéries isolées à partir du CHRMagar STEC	87
Tableau 16. Caractérisation et antibiorésistance des STEC isolés.....	89

Liste des abréviations

A/E	: Attachement /Effacement
AA	: Adhérence agrégée
AAF	: Fimbriae d'adhérence agrégée
ADEC	: <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse
ADH	: Arginine dihydrolase
ADN	: Acide désoxyribonucléique
aEPEC	: EPEC atypiques
AFNOR	: Association française de normalisation
AFSSA	: Agence Française de Sécurité sanitaire des Aliments
Anses	: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
ARNr	: Acide Ribo Nucléique ribosomal
a_w	: Activité de l'eau
BCIG-SMAC	: 5-bromo-4chloro 3-indoxyl-B-D-glucuronide- Sorbitol Mac Conkey
BET	: Bromure d'éthidium
Bfp	: bundle- forming pilus
BHIB	: bouillon cœur-cervelle
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CH	: Colite hémorragique
CS	: Citrate de Simmons
CT-SMAC	: Cefixime Tellurite Sorbitol Mac Conkey
DAEC	: <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse
dATP	: désoxy-adénine tri-phosphate
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Eae	: <i>Escherichia coli</i> attaching and effacing
EAEC	: <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatifs
EAHEC	: enteroAggregative-haemorrhagic <i>E. coli</i>
EAST I	: Enteroaggregative <i>E. coli</i> heat stable enterotoxin
EFSA	: European Food Safety Authority
EHEC	: <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques
ehxA	: Enterohemolysin A
EIEC	: <i>Escherichia coli</i> entéroinvasifs
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorban Assay
EPEC	: <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes
EPT	: Eau peptonée tamponée
ESC	: Esculine
ETEC	: <i>Escherichia coli</i> entérotoxinogènes
FC	: Facteurs de colonisation
G	: Guanine
G+C	: Guanine+ Cytosine
Gb3	: galactose- α (1-4), galactose- β (1-4), glucosyl-céramide
GEI	: Gastro-entérite infantile
GEL	: Gélatine
GLU	: Glucose
GUD -.	: β -glucuronidase négatif
H2S	: Thiosulfate de sodium
HIDAOA	: Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires D'origine Animale
IMS	: Séparation immuno-magnétique
IND	: Indole
InVS	: Institut de veille sanitaire
IPA	: Institut Pasteur d'Alger
ISO	: Organisation Internationale de Normalisation.

Kb	:	Kilobases
kDa	:	Kilodalton
LAC	:	Lactose
LB	:	Luria Broth
LEE	:	Locus d'effacement des entérocytes
LPS	:	Lipopolysaccharidique
LT	:	Entérotoxine thermolabile
MAL	:	Malonate
mEC	:	Modified <i>Escherichia coli</i> medium
mEC + n	:	modified <i>Escherichia coli</i> medium + novobiocine
NCCLS	:	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NIT	:	Nitrates
NMEC	:	<i>E. coli</i> responsables de la méningite chez le nouveau-né
ODC	:	Ornithine décarboxylase
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
ONPG	:	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside
pAA	:	aggregative adherence plasmide
pb	:	paire de base
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
pEAF	:	EPEC adhesion factor
pH	:	Potentiel Hydrogène
pO157	:	Plasmide de virulence de 60-MDa
PTT	:	Purpura thrombotique thrombocytopénique
RDEC	:	rabbit diarrhoeagenic <i>E. coli</i>
RM	:	Rouge de Méthyle
RT-PCR	:	PCR en temps réel
Saa	:	STEC autoagglutinating adhesion
SHU	:	Syndrome hémolytique et urémique
SIN	:	Système international de numérotation
SMAC	:	Sorbitol Mac Conkey
SMAC-MUG	:	4- méthylumbellifery-B-glucuronide Sorbitol Mac Conkey
SOR	:	Sorbitol
SOR-	:	Sorbitol negative
ST	:	Entérotoxine thermostable
STEC	:	Shiga-toxin-Producing <i>Escherichia coli</i>
stx₁	:	gène codant pour la Shiga toxine de type1
Stx1	:	Shiga-toxines de type 1
stx₂	:	gène codant pour la Shiga toxines de type2
Stx2	:	Shiga-toxines de type 2
T	:	Thymine
TBE	:	Tris, Borate, EDTA
TDA	:	Tryptophane désaminase
tEPEC	:	EPEC typiques
Tir	:	Translocated Intimin Receptor
TSB	:	Bouillon trypticase- soja
TSE	:	Eau tryptone sel
UPEC	:	<i>E. coli</i> uropathogènes
URE	:	Urée
UV	:	Ultra-Violet
VP	:	Voges Proskauer
VTEC	:	Verotoxin-Producing <i>Escherichia coli</i>
vWF	:	Facteur von Willebrand

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I Histoire d' <i>Escherichia coli</i>	3
I.1 CLASSIFICATION DES <i>ESCHERICHIA COLI</i>	3
I.1.1 Caractères biochimiques d' <i>E. coli</i>	4
I.1.2 Classification sérologique	4
I.2 CLASSIFICATION ET DESCRIPTION DES DIFFERENTS PATHOVARS DIARRHEOGENES D' <i>E. COLI</i> ..	5
I.2.1 <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	7
I.2.2 <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatifs (EAEC)	7
I.2.3 <i>Escherichia coli</i> entéroinvasifs (EIEC).....	8
I.2.4 <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (DAEC).....	8
I.2.5 <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC).....	9
I.2.6 <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	10
II Histoire des <i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC).....	12
II.1 TERMINOLOGIE.....	13
II.2 ORIGINE DES STEC O157 ET NON-O157	14
III Caractères phénotypiques et biochimiques des STEC.....	17
III.1 CARACTERES CULTURAUX DE BASE DES STEC	18
III.1.1 Température	19
III.1.2 pH.....	19
III.1.3 Activité de l'eau (a_w).....	19
IV Facteurs de virulence et pouvoir pathogène des STEC	20
IV.1 FACTEURS D'ADHESION.....	20
IV.1.1 Facteur d'attachement et d'effacement	21
IV.1.2 Adhésine Saa.....	22
IV.1.3 Adhésion fimbriaire	23
IV.1.4 Facteurs d'adhésion « entéroaggrégative »	23
IV.2 SHIGA-TOXINES	23
IV.2.1 Structure	23
IV.2.2 Mode d'action	24
IV.2.3 Gènes stx	25
IV.3 PRODUCTION DE L'ENTEROHEMOLYSINE	27
IV.4 CAPACITE A UTILISER LE FER.....	27
IV.5 ENTEROTOXINE EAST1	28
V Infections liées aux STEC.....	28
V.1 COLITE HEMORRAGIQUE (CH).....	28
V.2 SYNDROME HEMOLYTIQUE ET UREMIQUE (SHU).....	29
V.3 PURPURA THROMBOTIQUE THROMBOCYTOPENIQUE (PTT)	31
V.4 TRAITEMENT	33
V.4.1 Traitements neutralisant les toxines Stx	33
V.4.2 Anticorps monoclonaux humanisés anti-Stx.....	34
V.4.3 Anticorps monoclonaux inhibant l'activation du complément.....	34

VI	Epidémiologie des STEC	34
VI.1	EPIDEMIOLOGIE DES STEC CHEZ L'HOMME	34
VI.2	EPIDEMIOLOGIE DES STEC CHEZ LES ANIMAUX	35
VI.2.1	Chez les bovins	35
VI.2.2	Chez les petits ruminants.....	36
VI.2.3	Chez d'autres animaux	36
VI.3	MODE DE TRANSMISSION.....	36
VI.3.1	Transmission indirecte	37
VI.3.2	Transmission directe	39
VII	Effet des traitements physiques et chimiques sur les STEC	42
VII.1	CHALEUR	42
VII.2	REFRIGERATION	43
VII.3	CONGELATION	43
VII.4	ACIDITE	43
VII.5	NITRITES.....	43
VII.6	IONISATION.....	43
VIII	Méthodes de détection des STEC dans les aliments.....	44
VIII.1	METHODES MICROBIOLOGIQUES	44
VIII.1.1	Détection des STEC O157.....	45
VIII.1.2	Détection des STEC non-O157.....	47
VIII.2	METHODES IMMUNOLOGIQUES	47
VIII.2.1	Système ELISA.....	48
VIII.2.2	Système immuno-chromatographique	48
VIII.2.3	Système automatisé	48
VIII.3	METHODES GENETIQUES	49
VIII.3.1	Hybridation ADN et sondes oligonucléotidiques	49
VIII.3.2	Polymerase Chain Reaction (PCR)	50

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Etude I: Recherche et caractérisation des *Escherichia coli* O157 isolés à partir de carcasses ovines dans deux abattoirs d'Alger

I	Objectifs	52
II	Matériel et méthodes.....	53
II.1	RECHERCHE DES STEC O157 PAR SEPARATION IMMUNO-MAGNETIQUE (IMS).....	53
II.1.1	Méthode d'échantillonnage	53
II.1.2	Lieux du traitement des échantillons.....	56
II.1.3	Equipements	56
II.1.4	Milieux de culture et réactifs	56
II.2.	METHODES D'ANALYSES	56
II.2.1.	Recherche des STEC du séro groupe O157.....	56
II.2.2	Détection des gènes codant pour les facteurs de virulence des STEC O157 : H7 par amplification génique (PCR).....	61
II.2.3	Test de sensibilité aux antibiotiques.....	64
II.2.4	Analyse statistique.....	66

III Resultats	66
III.1 ISOLEMENT DES <i>E. COLI</i> O157 : H7.....	66
III.1.2 Aspect des colonies d' <i>E. coli</i> O157 : H7 sur gélose d'isolement	67
III.1.3 Aspect des tests d'agglutination	69
III.2 DETECTION DES GENES CODANT POUR LES FACTEURS DE VIRULENCE DES <i>E. COLI</i> O157 : H7 ISOLES PAR PCR.....	71
III.2.1 Caractérisation génotypique des <i>E. coli</i> O157 : H7 isolés	71
III.2.2 Profil génotypique de l'ensemble des <i>E. coli</i> O157 : H7 isolés	73
III.3 TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	74

Etude II : Recherche et caractérisation des *Escherichia coli* O157 et non-O157 à partir des carcasses ovines

I Objectifs	76
II Matériel et méthodes.....	77
II.1 RECHERCHE DES STEC O157 ET NON- O157 PAR SCREENING MOLECULAIRE.....	77
II.1.1 Méthode d'échantillonnage.....	77
II.1.2 Lieux du traitement des échantillons	77
II.1.3 Equipements.....	77
II.1.4 Milieux de culture et réactifs :	77
II.2 METHODES D'ANALYSES	77
II.2.1 Screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence	78
II.2.2 Isolement des STEC O157 et non-O157	79
II.3 TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	80
III Resultats.....	82
III.1 SCREENING MOLECULAIRE	82
III.2 ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES ISOLEES.....	84
III.2.1 Détermination du séro groupe des STEC isolés	85
III.2.2 Caractérisation moléculaire des bactéries isolées	86
III.3 TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	88

Discussion

Discussion générale	91
I.Méthode de prélèvement	91
II Méthodes d'analyses et milieux de détection.....	93
II.1 DETECTION D' <i>E. COLI</i> O157 SELON LA NORME (ISO EN 16654 :2001).....	93
II.2 DETECTION DES <i>E. COLI</i> O157 ET NON-O157 PAR SCREENING MOLECULAIRE.....	96
III Prévalence d' <i>E. coli</i> O157 : H7 PAR (IMS).....	97
IV Prévalence des STEC O157 et non-O157 par screening moléculaire	99
V Résistance des STEC O157 et non-O157 aux antibiotiques	102

Conclusion, Recommandations et perspectives

I Conclusion	104
II Recommandations.....	105
III Perspectives.....	107
Références bibliographiques	108
Annexe 1	134
Annexe 2	138

Introduction

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont des bactéries émergentes, causant des toxi-infections alimentaires caractérisées par des manifestations cliniques variées, allant de la simple diarrhée bénigne à la colite hémorragique (CH) dans 80 % des cas (Krüger et Lucchesi, 2015). La colite hémorragique peut évoluer par la suite dans 15 % des cas vers un syndrome hémolytique et urémique (SHU) (Karpman *et al.*, 2017), et/ou un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), à l'origine de troubles neurologiques (Tarr, 2009). Ces complications peuvent aboutir dans 5 à 30 % des cas à une insuffisance rénale chronique, une hypertension ou à des déficits neurologiques (Rosales *et al.*, 2012). Les enfants et les personnes âgées sont les premières victimes du SHU, du fait de la déficience de leurs systèmes immunitaires (Havelaar et Swart, 2014), avec un taux de létalité compris entre 3 et 5 % (AFSSA, 2003).

De la famille des *Enterobacteriaceae*, *E. coli* a longtemps été considéré comme un simple commensal du tractus digestif des mammifères. Cependant, grâce à leur multiplication rapide et la plasticité de leurs génomes, certaines souches sont capables de co-évoluer avec leurs hôtes, et d'échapper à leurs mécanismes de défense. Ces propriétés expliquent en grande partie l'émergence régulière de nouvelles souches pathogènes (pathovars), ayant acquis par échange génétique des facteurs de virulence (Kaper *et al.*, 2004). La première souche isolée à l'origine du syndrome hémolytique et urémique appartient au sérotype O157 : H7 (Riley *et al.*, 1983) ; toutefois on note l'existence d'autres *E. coli* non-O157 responsables de l'apparition de cas d'épidémies dans le monde tels que : O1, O2, O11, O15, O25, O26, O45, O49, O92, O103, O111, O121, O128, O104 et O145 (Grad *et al.*, 2012 ; Gould *et al.*, 2013 ; Honish *et al.*, 2017). Les STEC possèdent un arsenal de facteurs de virulence dont la liste et le rôle exact restent à déterminer. Les deux protéines majeures impliquées dans leur pouvoir pathogène sont d'une part l'intimine, codée par le gène *eae*, et responsable de lésions intestinales et de diarrhées, et d'autre part les Shiga-toxines, codées par les gènes *stx*₁ et ou *stx*₂, capables de provoquer la mort des cellules intestinales, vasculaires et rénales (Bielaszewska *et al.*, 2011).

Au-delà des coûts humains importants en termes de souffrance et d'affaiblissement liés aux flambées épidémiques de STEC, l'industrie agro-alimentaire supporte souvent des frais considérables. Une étude menée aux États-Unis en 2003 a estimé le coût annuel des infections par *E. coli* O157: H7 à quatre cent cinq millions de dollars. Les coûts estimés comprennent trois cent soixante-dix millions de dollars pour les décès précoces, trente millions pour les soins médicaux, et cinq millions pour la perte de productivité (Frezen *et al.*, 2005).

Les épidémies recensées sont liées en majorité à la consommation d'aliments d'origine bovine, mais l'ingestion d'autres denrées alimentaires et/ou d'eau, les contacts directs avec les animaux, la transmission interhumaine par voie oro-fécale, sont également incriminés (Caprioli *et al.*, 2005). Les ruminants, notamment les bovins, les ovins et les caprins, sont des porteurs sains de ce pathogène ; ils représentent les principaux réservoirs de souches de STEC responsables de toxi-infections alimentaires (Beutin *et al.*, 1993 ; Chahed *et al.*, 2006).

Les STEC engendrent des répercussions économiques sur le commerce national et international. Du fait des échanges commerciaux internationaux, les STEC sont appelés à devenir une priorité de gestion des risques dans les pays où ils ne sont pas encore une priorité de santé publique (FAO/OMS, 2018). En Algérie, très peu d'études se sont intéressées aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. L'étude réalisée par Chahed *et al.*, 2006 sur la contamination des carcasses bovines par *E. coli* O157 : H7 a révélé une prévalence de 7,8 %. Ce résultat nous a incité à entamer une autre étude afin de rechercher ces pathogènes à partir de la viande ovine, très prisée dans le pays. En effet, les ovins représentent près de 80 % de l'effectif total du cheptel national, avec vingt-sept millions de têtes, représentant ainsi la plus grande ressource animale du pays. Cette production classe l'Algérie au sixième rang en termes d'élevage ovin au niveau mondial (Djaout *et al.*, 2017). L'éventuelle contamination de cette denrée par les STEC peut représenter un réel danger pour le consommateur algérien, d'où l'intérêt de la présente recherche.

Notre travail est scindé en deux parties. La première est une étude bibliographique dédiée à la revue de la littérature des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. Dans cette partie, nous abordons l'historique des STEC O157 et non-O157 : H7, leur physiologie, leur épidémiologie, leur rôle en pathologie en tant qu'agents diarrhéiques pathogènes, ainsi que les méthodes de leur détection dans les aliments.

La deuxième partie, expérimentale, comprend deux études :

- La première étude consiste en la recherche des STEC O157 à la surface des carcasses ovines par la technique de la séparation immuno-magnétique [IMS] (ISO EN 16654) dans les abattoirs d'El-Harrach (situé dans la banlieue d'Alger) et de Rouiba (à 25 km d'Alger).
- La deuxième étude vise la recherche des STEC O157 et non-O157 par screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence à partir des carcasses ovines produites dans l'abattoir d'El-Harrach.

PREMIERE PARTIE
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I Histoire d'*Escherichia coli* (*E. coli*)

En 1885, le médecin allemand Théodore Escherich (1857-1911) isola un court bâtonnet à Gram négatif et aux extrémités arrondies dans les matières fécales et les intestins d'enfants (Escherich, 1885).

Cette espèce bactérienne fut baptisée *Bacillus coli*, puis renommée - en 1919 sur proposition, et en 1958 officiellement - « *Escherichia coli* », sur recommandation du Sous-comité *Enterobacteriaceae* du Comité de Nomenclature de l'Association Internationale des Sociétés de Microbiologie, en hommage aux travaux d'Escherich (Grimont, 1987).

De la famille des *Enterobacteriaceae*, *E. coli* est considéré comme un hôte normal, c'est-à-dire commensal, de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud (De Rycke, 1991). *Escherichia coli* a la particularité de coloniser le tractus gastro-intestinal dans les premières heures de la vie (Nataro et Kaper, 1998). Cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies facultatifs (Joly et Reynaud, 2003).

Pendant longtemps, le genre *Escherichia* n'a renfermé que l'espèce *E. coli*, à laquelle sont venues s'ajouter les espèces *E. Blattae*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. fergusonii* (Euzéby, 2007).

1.1 Classification des *Escherichia coli*

E. coli est constituée d'une multitude de souches qui peuvent être différenciées et classées par la détermination de leur :

- biotype, qui est le profil biochimique des souches ;
- sérotype, qui est défini par la combinaison de certains antigènes de surface : les antigènes somatiques O (de l'allemand « Ohne Kapsel ») de nature lipopolysaccharidique (LPS), les antigènes capsulaires K (ou antigène de Kauffman), de nature polysaccharidique, et les antigènes flagellaires H de nature protéique (Lior, 1994).
- lysotype, qui est le spectre de sensibilité d'une souche à une collection de bactériophages. Cependant, contrairement au sérotypage, il n'existe pas de collection internationale de référence à utiliser. Aussi, la lysotypie est-elle relativement peu appliquée, sauf pour certaines souches particulièrement importantes en pathologie (Lior, 1994).

I.1.1 Caractères biochimiques d'*E. coli*

Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques", par le biais de l'utilisation de tests qui mettent en évidence le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc...), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz (Le minor et Veron, 1989). Le tableau 1 présente les principaux caractères biochimiques d'*E. coli*.

Tableau 1. Principaux caractères biochimiques d'*E. coli*

Tests	GUL	LAC	SOR	H ₂ S	GAZ	CS	ONPG	GEL	MAL	NIT	LDC	ODC	ADH	URE	TDA	IND	RM	VP	ESC
Résultats	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-

+ : caractère positif, - : caractère négatif, +/- : caractère inconstant.

I.1.2 Classification sérologique

La détermination des antigènes de surface, principalement les antigènes O somatiques et les antigènes H flagellaires, est un moyen de différencier les souches d'*Escherichia coli* (Nataro et Kaper, 1998). L'identification des antigènes et sérogroupes a permis de différencier les souches pathogènes des souches commensales. En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment (Beutin, 1999). Les antigènes somatiques O définissent le séro groupe des *E. coli*. Il existe près de 180 antigènes O et 56 antigènes H différents. La combinaison des antigènes de surface, flagellaires et capsulaires, détermine en théorie environ 700 000 *E. coli* différents (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012). La recherche des antigènes se fait à l'aide d'antisérum lors de tests d'agglutination, et également par le sérotypage moléculaire, faisant appel aux outils de type Polymerase Chain Reaction (PCR), qui consiste à caractériser les gènes impliqués dans la formation des antigènes (Ramos *et al.*, 2006). Certains sérotypes d'*E. coli* tels que : O26 :H11, O103 :H2, O111 :NM, O121 :H19, O145 :NM, sont régulièrement associés à des pathologies, mais la virulence de ces souches n'est pas dépendante de ces antigènes (Gyles, 2007).

1.1.2.1 Antigènes somatiques O

L'antigène somatique O, définissant le sérotype, est contenu dans les lipopolysaccharides (LPS) présents sur la paroi bactérienne des souches à Gram négatif. Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le cluster de gènes *rfb* (Coimbra *et al.*, 2000 ; Hunt, 2010). Cet antigène O consiste en dix à vingt-cinq répétitions d'une unité protéique comportant elle-même cinq à sept résidus de sucres. La combinaison des différents sucres retrouvés à la surface de l'antigène somatique O est spécifique des différents sérotypes (Iguchi *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Antigènes flagellaires H

L'antigène flagellaire H est de nature protéique, il entre dans la structure du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. Il est codé par le gène *fli C*. La diversité des antigènes H est due aux différents types de flagelline composant la structure du flagelle. C'est le flagelle qui permet la mobilité bactérienne, cependant certaines souches perdent leur mobilité et sont classées comme non mobiles (NM ou H-) (Beutin *et al.*, 2016).

1.1.2.3 Antigènes d'enveloppe K

Les antigènes d'enveloppe K sont de nature polysaccharidique et sont inégalement répartis dans l'espèce. Certains constituent une véritable capsule semblable à celle des *Klebsiella* ; il s'agit des antigènes K de type A. Les souches qui le possèdent forment des colonies mucoïdes, leur antigène O n'est détectable qu'après un chauffage à 120°C qui détruit l'antigène K. pour la majorité des souches, l'antigène K est de type B, il est associé à une simple enveloppe (Joly et Reynaud, 2003).

1.2 Classification et description des différents pathovars diarrhéogènes d'E. coli

Si l'espèce *E. coli* est hétérogène dans ses biotypes, sérotypes et lysotypes, elle l'est aussi dans son écologie et son association à des pathologies. Pendant longtemps, la question du rôle pathogène réel d'*E. coli* a perturbé les bactériologistes, car si cette association apparaissait de manière de plus en plus évidente, il était tout aussi évident que la même bactérie était isolée d'individus parfaitement sains. Cette observation était très troublante à une époque où l'on pensait qu'une espèce bactérienne était soit pathogène, soit commensale (Mainil, 2003a). La réponse vint d'une intuition d'un vétérinaire Danois, Carl Oluf Jensen (1864-1934), qui émit l'hypothèse que l'espèce *E. coli* était hétérogène et composée de souches provoquant des pathologies et de souches tout à fait inoffensives (Mainil, 2003a). La détermination des

sérotypes (Kauffmann, 1947) est le premier système qui a permis, dans une certaine mesure, de différencier des souches pathogènes de souches commensales (Beutin, 1999). Par la suite, divers chercheurs ont fait œuvre pionnière en reconnaissant l'existence pour les souches pathogènes de propriétés particulières, dites de virulence, directement ou indirectement reliées à leur pouvoir pathogène. Ces propriétés permettent aux bactéries de coloniser les muqueuses de l'hôte, de les franchir, de résister aux défenses internes et de produire un effet toxique sur cet hôte, avec apparition de lésions et de signes cliniques (Pohl, 1993).

La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche constitue un nouveau moyen de typage d'*E. coli*, que l'on désigne sous le néologisme de PATHOTYPIE (Mainil, 2003a).

Les souches d'*E. coli*, agents de diarrhées, forment un groupe très hétérogène au regard des mécanismes en cause dans leur pathogénicité. Un pathovar (pathotype) est un taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce, caractérisé par un pouvoir pathogène. Certains sérotypes sont pathogènes et peuvent être associés à un ou plusieurs pathovars qui sont classés en fonction des signes cliniques engendrés. Ces pathovars sont à l'origine de nombreux cas de morbidité et de mortalité dans le monde entier (Matthew *et al.*, 2013). On peut distinguer trois grands groupes d'*E. coli*. Le premier est représenté par les bactéries « commensales » colonisant le tube digestif (intestins) et qui ne représentent aucun danger pour leur hôte (Croxen et Finlay, 2010). Le second groupe comprend les bactéries pathogènes « extra-intestinales » ; ce sont les *E. coli* uropathogènes (UPEC) et les *E. coli* responsables de la méningite chez le nouveau-né (NMEC) (Russo et Johnson, 2000). Le troisième et dernier groupe comprend des bactéries pathogènes « intestinales » dites diarrhéogènes subdivisées en six pathovars (Hu et Torres, 2015) : les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Ces pathovars sont à l'origine de troubles intestinaux (diarrhée, colite hémorragique) ou même extra intestinaux (syndrome hémolytique et urémique, purpura thrombotique thrombocytopénique) dans le cas des EHEC (Croxen et Finlay, 2010). La figure 1 montre les principaux pathovars diarrhéogènes d'*E. coli*.

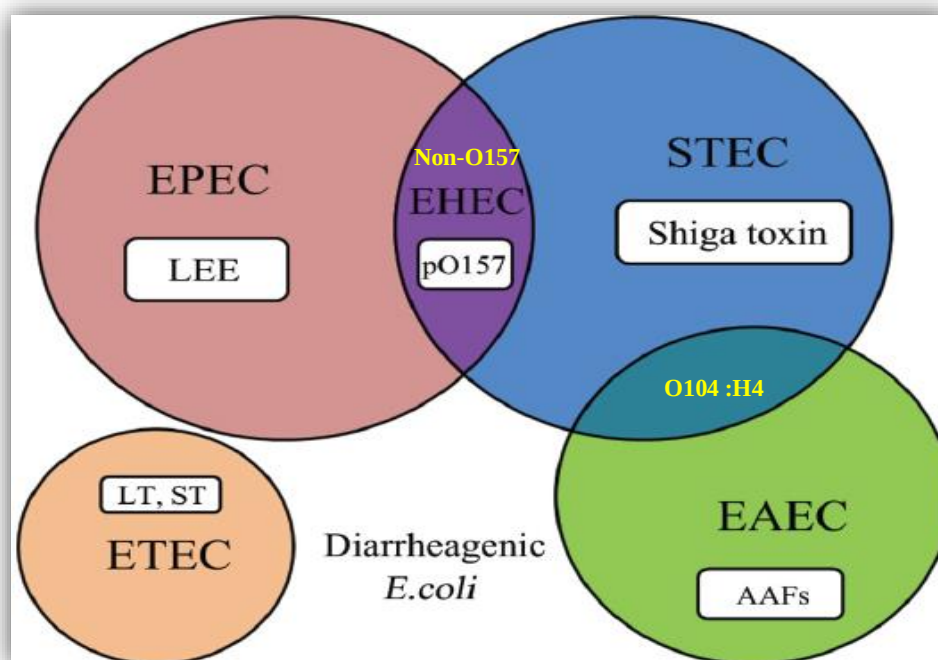


Figure 1. Classification des *E. coli* diarrhéiques (Lee et Yoon, 2016)

1.2.1 *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC sont caractérisés par la production d'entérotoxines thermostables ST et thermolabiles LT (Milon, 1993). Le mode d'infection des ETEC s'effectue tout d'abord par la colonisation de l'intestin grêle nécessitant des facteurs de colonisation (FC) appelés fimbriae pour la fixation aux cellules intestinales de l'hôte, puis par la production d'entérotoxines (Croxen *et al.*, 2013) (figure 2). Les fimbriae sont des appendices filamenteux, rigides, formés de sous unités protéiques, de diamètre inférieur à celui des flagelles. Ces facteurs d'adhésion confèrent aux ETEC un pouvoir d'adhésion spécifique à l'espèce et caractéristique : la bactérie se fixe aux sommets des microvillosités qui demeurent intactes (Joly et Reynaud., 2003). Les entérotoxines sont la cause d'une diarrhée aqueuse accompagnée d'une profonde déshydratation. Les entérotoxines thermolabiles font partie de la famille des entérotoxines cytotoniques dont fait partie la toxine cholérique. Les ETEC peuvent produire une ou plusieurs toxines en combinaison (Croxen *et al.*, 2013).

1.2.2 *Escherichia coli* entéroaggrégatifs (EAEC)

Les EAEC sont très répandus dans les pays en développement. Ces *E. coli* sont à l'origine de diarrhées persistantes et sont considérés comme des entéropathogènes émergents. Les EAEC forment des biofilms sur la muqueuse intestinale. Les bactéries adhèrent les unes aux autres,

ainsi qu'à la surface cellulaire, pour former un modèle d'adhérence agrégée (AA) connu sous le nom de «brique empilée» (Croxen *et al.*, 2013) (figure 2), provoquant une nécrose des pôles apicaux des microvillosités. Elles possèdent également la faculté de synthétiser une toxine thermostable EAST I (entéroaggrégative *E. coli* heat stable enterotoxin). EAST I a une homologie fonctionnelle partielle de 50 % avec la toxine thermostable ST des ETEC, d'où sa similaire pathogénicité (Nataro et Kaper, 1998).

I.2.3 *Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC)

Le pathovar EIEC, rare ou moins connu, concerne des sérotypes particuliers comme O28 : H-, O112 : H-, O124 : H30. Les EIEC ont la capacité d'envahir les cellules épithéliales au niveau du colon avec une multiplication intracellulaire provoquant la mort de la cellule (Croxen *et al.*, 2013) (figure 2). La dysenterie engendrée est caractérisée par des crampes abdominales avec la présence d'un mucus sanglant dû à la destruction des cellules du colon (Milon, 1993).

I.2.4 *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les DAEC sont dispersés sur les surfaces des cellules intestinales, résultant en un modèle d'adhérence diffuse (Croxen *et al.*, 2013) (figure 2). Les DAEC sont associés à des diarrhées aqueuses qui peuvent devenir persistantes chez les jeunes enfants ; l'infection est plus grave chez les sujets âgés entre dix-huit mois et cinq ans (Kaper *et al.*, 2004). On pense que les adultes deviennent des porteurs asymptomatiques, et il a été supposé que le portage des DAEC peut conduire à des maladies intestinales inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn (Le Bouguénec et Servin, 2006). La figure 2 montre le mode d'action des principaux pathovars diarrhéogènes d'*E. coli*.

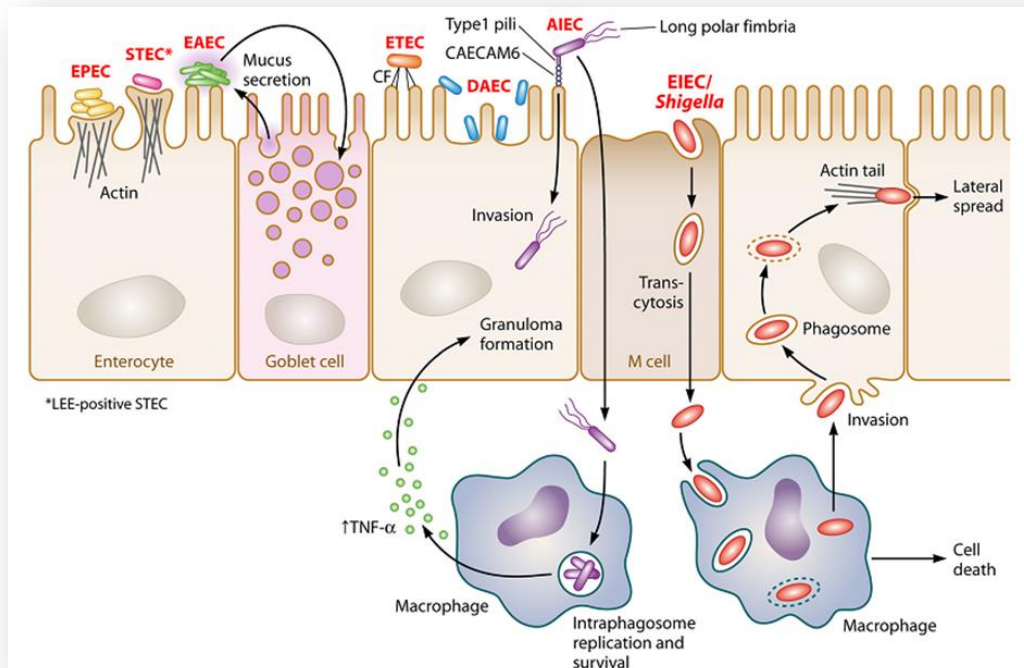


Figure 2. Modèles d'adhérence des *E. coli* entériques (Croxen *et al.*, 2013)

1.2.5 *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)

Les EPEC sont responsables en moyenne de 5 à 10 % des épisodes de gastro-entérite infantile (GEI) dans les pays en développement (Ochoa *et al.*, 2008). Ils sont considérés comme l'un des agents pathogènes les plus importants qui infectent les enfants de moins de 2 ans dans le monde (Varela *et al.*, 2015). Les souches EPEC sont associées à des diarrhées aqueuses chez l'homme et sont définies comme des souches possédant le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) portés par un îlot de pathogénicité particulier appelé « locus d'effacement des entérocytes (LEE) » situé sur le chromosome. On distingue deux types d'EPEC : les EPEC dites typiques (tEPEC) et les EPEC atypiques (aEPEC). Les EPEC typiques se caractérisent par la présence à la fois du gène chromosomique *eae* codant l'intimine qui est un facteur d'adhésion, ainsi que le plasmide pEAF (EPEC adhesion factor) portant le gène *bfp* (bundle-forming pilus) qui code les pilis. Ces pilis permettent à la bactérie de se fixer et former des microcolonies sur leur site d'adhésion à partir des récepteurs N-acétyl-lactosamine de la surface de la cellule hôte (Hyland *et al.*, 2008). Les EPEC atypiques quant à eux possèdent uniquement le gène *eae* (Mora *et al.*, 2016).

Les EPEC font partie du groupe des pathogènes entraînant des lésions de type attachement/effacement (A/E) des cellules de l'épithélium intestinal. Dans ce groupe on

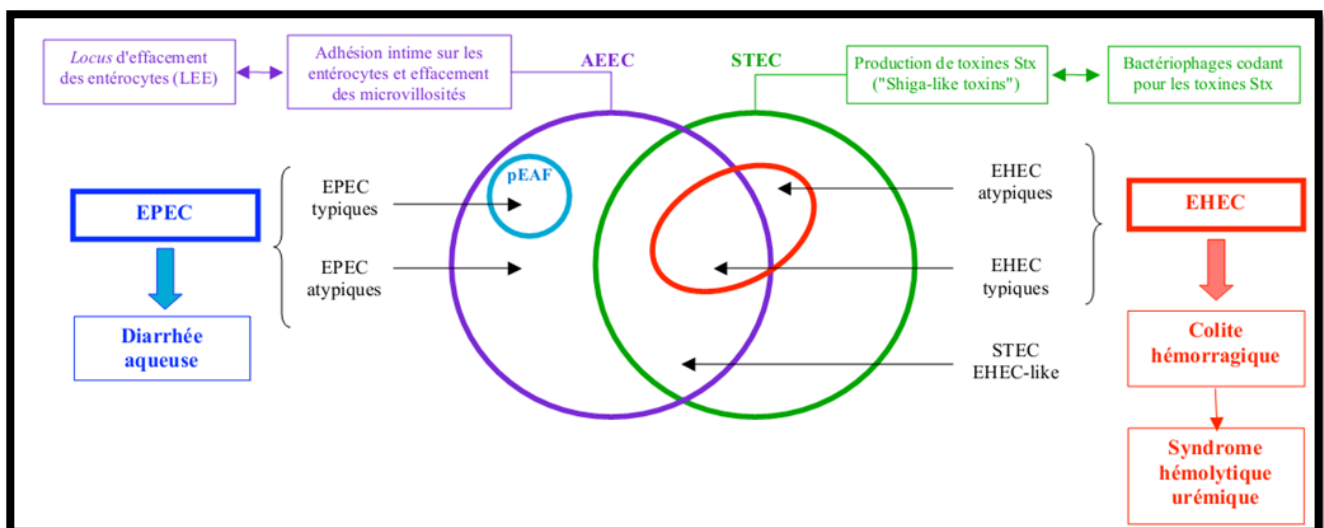
retrouve aussi les EHEC, les RDEC (rabbit diarrhoeagenic *E. coli*), *Citrobacter redentium* pathogène chez la souris et *Escherichia albertii* (Croxen et Finlay, 2010). L'infection à EPEC s'effectue initialement par l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales. Les bactéries se fixent à la surface des entérocytes au niveau de la bordure en brosse et s'agrègent entre elles. Il se forme ainsi des microcolonies ou « clusters » (figure 2). Les bactéries sont reliées entre elles et à la cellule par des pilis appelés BFP (bundle forming pili) (Joly et Reynaud., 2003). A posteriori, une destruction des microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes se produit par la capacité de la protéine membranaire, l'intimine, codée par le gène *eae*, à causer des lésions d'attachement et d'effacement caractéristiques A/E (Croxen *et al.*, 2013).

1.2.6 *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des bactéries émergentes causant des toxi-infections alimentaires sous forme d'épidémies caractérisées par des manifestations cliniques variées allant de la simple diarrhée bénigne à la colite hémorragique (CH) dans 80 % des cas (Krüger et Lucchesi, 2015). La colite hémorragique peut évoluer par la suite vers un syndrome hémolytique et urémique (SHU) et/ou un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) à l'origine de troubles neurologiques (Tarr, 2009). Ces complications peuvent aboutir à la fin à des complications graves comme une insuffisance rénale chronique, une hypertension ou à des déficits neurologiques (Rosales *et al.*, 2012). Les enfants et les personnes âgées sont les premières victimes du SHU du fait de la déficience de leurs systèmes immunitaires (Havelaar et Swart, 2014).

Le pouvoir pathogène des EHEC est dû à la production de facteurs de virulence, principalement l'intimine, les Shiga-toxines et l'entérohémolysine (Schmidt *et al.*, 1994). L'intimine codée par le gène de virulence *eae* (Schmidt *et al.*, 1994) est responsable de l'adhésion intime de la bactérie aux cellules intestinales, causant ainsi l'apparition de lésions d'attachement et d'effacement des microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes et la diarrhée (Joly et Reynaud, 2003). Les Shiga-toxines de type 1 et 2 (Stx1 et Stx2) sont responsables de la mort des cellules intestinales, vasculaires, rénales et cérébrales (O'Loughlin et Robins-Browne., 2001) et à l'origine du SHU et du PTT. Elles sont codées respectivement par les gènes de virulence *stx1* et *stx2* portés par des prophages situés sur le chromosome (Allison, 2007). Toute souche d'*E. coli* possédant un gène *stx* est dénommée STEC pour «Shigatoxin-producing *E. coli* ». La première souche isolée à l'origine du SHU appartient au sérotype O157 : H7 (Riley *et al.*, 1983). Les souches EHEC constituent un sous-groupe des STEC et correspondent aux souches isolées chez les patients souffrant de diarrhées

(hémorragiques ou non) et/ou de SHU. Généralement, la caractérisation des souches EHEC isolées chez les patients débute par l'identification du sérotype. Les souches du sérotype O157 : H7 sont étroitement associées aux infections humaines. En raison de ce lien étroit, les souches EHEC sont communément divisées en deux grands groupes : les souches O157 et non-O157. Plus précisément, les souches EHEC peuvent être divisées en deux groupes en fonction de la présence ou non des gènes *stx* et *eae*. Les souches EHEC « typiques » se caractérisent par la présence du gène *stx* et du gène *eae*. Les sérotypes appartenant à ce groupe sont les suivants : O157 :H7, O26 :H11, O111:H8, O103:H2 et O145:H28. Ces cinq sérotypes correspondent aux EHEC les plus fréquemment isolés chez l'Homme. Ils sont de ce fait qualifiés d'EHEC « **typiques majeurs** » définies comme étant hautement pathogènes (Afssa, 2010 ; Brugère *et al.*, 2012). Les souches EHEC « atypiques » hébergent des gènes *stx* mais ne possèdent pas de gène *eae*. Les EHEC atypiques peuvent être des souches de sérotypes O91 :H21, O113 :H21 et O104 :H21. Ces souches possèdent d'autres mécanismes d'adhésion à la muqueuse colique. De nombreuses adhésines ont été décrites mais leur implication véritable dans la pathogénie de ces souches reste néanmoins à préciser (Afssa, 2010). La figure 3 montre la classification des EPEC/EHEC/STEC/AEEC à partir des signes cliniques et des facteurs de virulence associés aux souches d'*E. coli*.



EPEC : Enteropathogenic *E. coli* ; EHEC : Enterohaemorrhagic *E. coli* ; STEC : Shiga-toxin producing *E. coli* ; AEEC : Attaching and effacing *E. coli* ; LEE : Locus of enterocyte effacement ; EAF : EPEC adhesion factor ; *stx* : Gènes codant pour les Shiga-toxines.

Figure 3. Diagramme de Venn illustrant le système de classification des EPEC/EHEC/STEC/AEEC (d'après Naylor *et al.*, 2005)

Le schéma illustré par la figure 3 explique la relation existante entre les STEC et les AEEC, et propose un système de classification des pathovars où :

- les souches possédant le LEE, incluant le gène *eae*, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des AEEC ;
- les souches possédant les gènes *stx* codant pour les toxines Stx, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC ;
- les EHEC sont des STEC mais le contraire n'est pas valable, car toutes les souches STEC ne sont pas responsables de pathologies humaines ;
- les EHEC possédant le LEE ou *eae*⁺ sont dénommées « EHEC typiques » et les EHEC-LEE négatifs ou *eae*⁻ sont dénommées « EHEC atypiques », tel que O104 :H4 ;
- les souches « EHEC typiques majeures », les plus souvent associées à des signes cliniques graves et aux épidémies, appartiennent aux sérogroupes O157, O26, O103, O111 et O145.

II Histoire des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

C'est en 1982, qu'un nouveau tableau clinique caractérisé par une colite hémorragique, un syndrome hémolytique et urémique et / ou un purpura thrombotique thrombocytopénique, est apparu chez des patients ayant mangé des hamburgers, provenant d'établissements d'une même chaîne de restauration rapide. Cette épidémie a sévi aux Etats-Unis d'abord dans l'Oregon, puis dans le Michigan trois mois plus tard. La consommation de l'aliment incriminé contenant de la viande de bœuf insuffisamment cuite a entraîné l'hospitalisation de 70 % des malades victimes de la toxi-infection. L'analyse effectuée sur les selles des patients et sur la viande hachée, source de l'infection, a révélé la présence d'un sérotype particulier d'une souche d'*E. coli* entérohémorragiques (EHEC) qui est le O157 : H7 (Riley *et al.*, 1983). Les EHEC font partie des STEC qui sont un pathogroupe comprenant tous les *E. coli* hébergeant les gènes codant pour les Shiga -toxines (Stx). Le terme EHEC désigne les souches de STEC qui sont pathogènes pour l'homme (Kaper *et al.*, 2004).

II.1 Terminologie

En 1903, Neisser et Shiga ont découvert que *Shigella dysenteriae* type 1 produisait une toxine protéique. Les recherches ultérieures ont abouti dans les années 1940 à l'isolement et à la caractérisation de cette toxine en tant que Shiga-toxine (Melton-Celsa et O'Brien, 2000).

En 1977, il a été signalé que des *E. coli* isolés de personnes souffrant de diarrhées produisaient une toxine qui a un effet cytotoxique caractéristique sur des cellules Vero en culture (cellules rénales de singes verts africains) (Konowalchuck *et al.*, 1977).

Les analyses effectuées sur les selles d'enfants atteints par un syndrome hémolytique et urémique suite à une épidémie survenue en 1982 aux États-Unis ont mis en évidence la présence d'une toxine cytotoxique pour les cultures cellulaires Vero, à laquelle a été donné le nom « Vérotoxine ». Des recherches ultérieures ont démontré que cette toxine avait une grande similitude avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1, d'où son nom de « Shiga-toxine ». Ces toxines sont divisées en deux groupes : les Shiga-toxines de type 1, qui peuvent être neutralisées par des anticorps anti-Shiga de *Shigella dysenteriae*, et les Shiga-toxines de type 2 qui ne le peuvent pas (O'Brien *et al.*, 1983; Strockbine *et al.*, 1986 ; Strockbine *et al.*, 1988). Par la suite, différentes terminologies ont été adoptées :

- *E. coli* producteurs de Vérotoxines (VTEC), par rapport à la production des Vérotoxines 1 et 2 (VT1, VT2) ;
- *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), en relation avec la production des Shiga-like toxines 1 et 2 (Slt 1, Slt2). Le terme Shiga-like toxines a ensuite été remplacé par Shiga-toxine (Stx1, Stx2) ;
- *E. coli* entérohémorragique (EHEC), pour désigner les STEC pouvant provoquer une maladie similaire à celle provoquée par *E. coli* O157 : H7 et présentant des caractéristiques épidémiologiques et pathogéniques similaires (Levine, 1987) ;
- STEC non-O157, en référence au groupe STEC autre que le sérotype O157 : H7.

La dénomination VTEC, initialement utilisée, a été abandonnée au profit du terme STEC, recommandé par la Convention Internationale de Dénomination de ces pathogènes. La dénomination STEC regroupe toutes les souches d'*E. coli* possédant un ou plusieurs gènes *stx* codant les Shiga-toxines (Mainil et Daube, 2005).

II.2 Origine des STEC O157 et non-O157

Si l'univers des souches pathogènes d'*E. coli* apparaît aussi complexe aujourd'hui, c'est la conséquence de l'évolution très rapide, à notre échelle de temps, du monde bactérien, de la plasticité du génome des bactéries, en particulier *E. coli*, permettant des échanges permanents de matériel génétique, et aussi de la présence de nombreux gènes qui codent pour ces propriétés de virulence sur des structures génétiques mobiles (Rasko *et al.*, 2008). Selon certaines études, les STEC seraient un groupe de clones dérivant des *E. coli* entéropathogènes EPEC. Ceci s'expliquerait par le fait que des gènes comme les gènes d'attachement et d'effacement *eae*, auraient été transférés d'une souche pathogène à une souche commensale devenant par la suite pathogène (Whittam *et al.*, 1993).

Les souches pathogènes d'*E. coli* possèdent jusqu'à 20 % d'information génétique supplémentaire, acquise vraisemblablement au cours de transferts horizontaux d'ADN (figure 4). De nombreux gènes nouvellement acquis sont localisés sur le chromosome, mais beaucoup d'autres le sont sur des réplicons extra chromosomiques, les plasmides. Au cours de l'évolution, ces gènes peuvent s'intégrer dans des structures relativement indépendantes, comme les transposons ou les phages, ou se regrouper pour former des îlots de pathogénicité. Les gènes codant ces facteurs de virulence sont présents sur des éléments mobiles, à savoir les gènes *stx*₁ et *stx*₂ situés sur des prophages, le gène *eae* sur un îlot de pathogénicité LEE (Mainil, 2003a). La figure 4 montre les différents mécanismes de transfert d'ADN chez les bactéries.

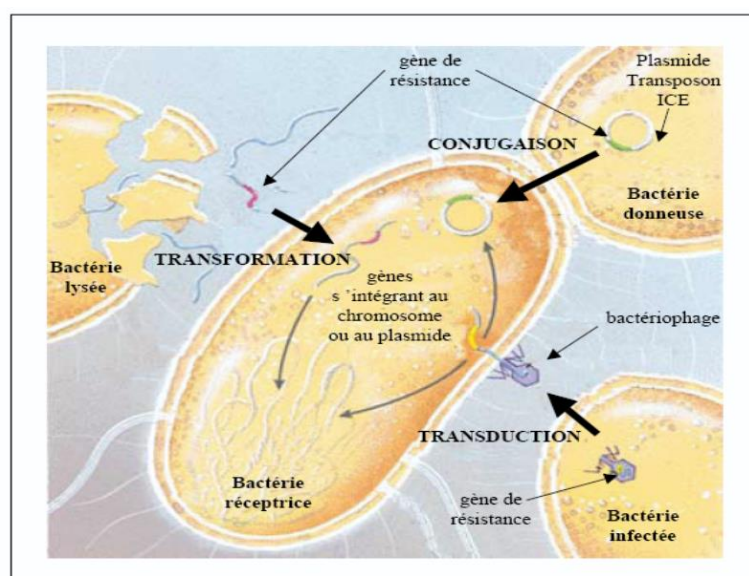


Figure 4. Différents mécanismes de transfert d'ADN chez les bactéries (Doublet, 2004)

Un modèle d'émergence du clone O157 : H7 a été proposé par Feng *et al.* (1998) sur la base d'évènements qui seraient intervenus à partir d'un ancêtre génétiquement le plus proche des EHEC O157 : H7, qui est le sérotype EPEC O55 : H7, caractérisé par une β -glucuronidase positive et la fermentation du sorbitol. Les différentes étapes de l'évolution du sérotype O157 : H7 sont schématisées dans la figure 5.

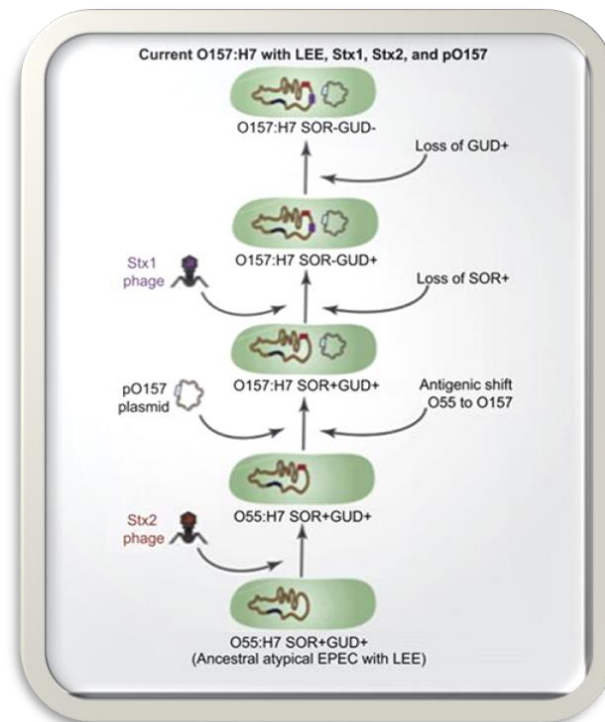


Figure 5. Modèle de l'émergence d'*E. coli* O157 : H7 (modifié par Kaper *et al.*, 2004)

Etape1 : acquisition d'une souche de type EPEC O55: H7 sorbitol positive, β -glucuronidase positive portant l'îlot de pathogénicité LEE du gène *stx*₂ par transduction avec des phages ⇒ **O55 :H7 *stx*₂ positif ;**

Etape 2 : acquisition d'un plasmide codant des hémolysines ⇒ **O157 : H7 ;**

Etape 3 : acquisition du gène *stx*₁ ⇒ **O157 : H7 *stx*₂ *stx*₁ ;**

Etape 4 : acquisition du plasmide pO157 entraînant la perte de fermentation du sorbitol ⇒ **O157 : H7 SOR-**

Etape 5 : mutation de la base nucléotidique T (Thymine) en G (Guanine) en position +93 du gène *uidA* aboutissant à la non-production de la β -glucuronidase ⇒ **O157 : H7 *stx*₂ *stx*₁ SOR- GUD-.**

Depuis l'apparition du O157 : H7, plus de 400 sérotypes ont été identifiés comme STEC (Croxen *et al.*, 2013). Historiquement, le sérotype O157 : H7 est le plus fréquemment associé à l'apparition de cas de flambées épidémiques liées aux STEC, il est par conséquent le sérotype le plus étudié dans le monde. Cependant, ces dernières années l'émergence de nouveaux sérogroupes de STEC non-O157 tels que ; O26, O103, O111 et O145, à l'origine de l'éclosion de sévères flambées épidémiques, a été rapportée (Scheutz, 2014).

L'apparition de nouveaux sérotypes de STEC est due à la présence des gènes de virulence sur des éléments mobiles, tels que les bactériophages, qui peuvent être transférés d'un sérotype à un autre (James *et al.*, 2001). Ce processus joue un rôle important dans la dynamique et l'évolution des *E. coli* et peut donner naissance à des souches hybrides avec des profils de virulence inconnus (Leopold *et al.*, 2014), comme ce fût le cas lors de l'épidémie à O104 : H4 survenue en Allemagne en 2011, qui s'est ensuite étendue à la plupart des pays d'Europe et où le pathogène possédait les gènes caractéristiques des EAEC (*aggA*, *aggR*, *pic* et *aap*) et celui codant pour la Shiga-toxine de type 2 typique des STEC (*stx₂*). Cette combinaison génétique est à l'origine de l'apparition d'un nouveau pathovar hybride (STEC/EAEC) dénommé EnteroAggregative-Haemorrhagic *E. coli* (EAHEC) (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011 ; Navarro-Garcia, 2015). Ce sérotype inhabituel de STEC a provoqué l'une des épidémies les plus meurtrières jamais enregistrée, où 4200 cas ont été identifiés dans le monde, avec 22 % de SHU, 78 % de colites hémorragiques et un taux de mortalité d'environ 3,3 % (Buchholz *et al.*, 2011 ; Rasko *et al.*, 2011). D'autres souches d'*E. coli* hybrides ont été recensées : trois souches d'*E. coli* hybrides (STEC/ETEC) de sérotypes O101 :H33, O2 :H25 et O2 :H27, possédant les gènes codant la Shig-atoxine des STEC et une toxine ST (heat-stable toxin) caractéristique des ETEC (Nyholm *et al.*, 2015).

Les principaux sérogroupes impliqués dans l'apparition de flambées épidémiques à STEC dans le monde sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2. Principaux sérogroupes de STEC responsables d'épidémies à travers le monde

Pays / Continent	Sérogroupes incriminés	Sérogroupes prédominants	Références
États-Unis	O157, O26, O111, O103, O121, O45, O145.	O157	(Brooks <i>et al.</i> , 2005 ; Gould <i>et al.</i> , 2013)
Canada	O157, O111, O26, O121.	O157	(Chui <i>et al.</i> , 2015, Honish <i>et al.</i> , 2017)
Amérique du sud	O1, O2, O15, O25, O26, O49, O92, O11.	Non-O157	(Aidar-Ugrinovich <i>et al.</i> , 2007 ; Amézquita-López <i>et al.</i> , 2014)
Europe continentale	O157, O26, O111, O104, O103, O128, O91, O113, O2, O9, O145	O157 et non-O157	(Pennington, 2010)
Australie	O157, O111, O26.	O157 et non-O157	(Vally <i>et al.</i> , 2012)
Japon	O157, O26, O111, O103, O145	O157 et non-O157	(Tabuchi <i>et al.</i> , 2015)

III Caractères phénotypiques et biochimiques des STEC

Les STEC appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Au sein de cette famille, on trouve de nombreux genres, parmi lesquels *Salmonella*, *Shigella*, et *Escherichia* (Euzéby, 2007). Tous les STEC ont la même morphologie. Celle-ci est caractéristique d'*Escherichia coli* : des bacilles fins (0,5 micron de diamètre sur 2 à 3 micron de long) dont la coloration de Gram est négative. Ils ne sporulent pas (Sutra *et al.*, 1998). Les données sur la physiologie des STEC concernent essentiellement le sérotype O157 : H7, qui possède toutes les caractéristiques des *E. coli*, à l'exception de la non fermentation du sorbitol au cours des 24 heures (fermentation lente du sorbitol) ainsi que la non production de la β -glucuronidase (Johnson *et al.*, 1995). Cependant, certaines souches O157 : H- sorbitol et β -glucuronidase positives ont été isolées chez des patients atteints du SHU en Allemagne (Karch *et al.*, 1995). Il a été noté aussi que les STEC du sérotype O157 sont presque toujours résistants au tellurite à une concentration de 2,5 mg/l (Zadik *et al.*, 1993). La décarboxylation de la lysine et de l'ornithine, la fermentation du raffinose et du dulcitol, ainsi que l'incapacité de fermenter le rhamnose sont des caractéristiques régulières des STEC O157 (Chapman, 1995). Concernant les STEC non-O157, les données sont quasiment inexistantes. A l'heure actuelle, aucune caractéristique biochimique commune n'a été identifiée pour les autres STEC, rendant par ce fait leur identification plus difficile. Les principaux critères biochimiques des STEC sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Principaux critères biochimiques des STEC O157 et non-O157 (Grimont, 1987)

Caractéristiques	STEC non-O157	STEC O157
LDC	(+)	(+)
ODC	+/-	+/-
β -xylosidase	-	-
β -glucoronidase	(+)	-
Sorbitol	+	-
Malonate	-	-
Indole	+	+
Adonitole	-	-

+ : positif ; (+) : positif pour la majorité des souches ; +/-: positif ou négatif selon les souches.

III.1 Caractères cultureux de base des STEC

Les données de la littérature relatives à la croissance des STEC ont concerné essentiellement le sérotype O157 : H7, qui a souvent fait l'objet d'études (Vernozy-Rozand et Montet, 2005). *E. coli* O157 : H7 est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui s'adapte bien aux conditions de culture aérobie et anaérobie. Les STEC peuvent être cultivés en milieux liquides et sur des milieux solides. L'aspect des cultures des STEC est le même que celui d'*E. coli*. En milieu liquide, le trouble occasionné par leur croissance est homogène et abondant. Sur les milieux solides, les colonies sont rondes, de 2 à 3 mm de diamètre, laiteuses ou légèrement jaunâtres et lisses (Sutra *et al.*, 1998).

III.1.1 Température

La température de croissance des STEC est analogue à celle des *E. coli* en général. Les températures de croissance des STEC O157 et non-O157 sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4. Température de croissance des STEC (Nauta et Dufrenne, 1999)

Températures	STEC O157	STEC non-O157
Température minimale	6 °C	6 à 7°C
Température optimale	41,5°C	40°C
Température maximale	45,5°C	45,5°C

III.1.2 pH

Les plages de pH de croissance des STEC sont rapportées dans le tableau 5.

Tableau 5. Plages de pH permettant la croissance des STEC (Nauta et Dufrenne, 1999)

pH minimal	pH optimal	pH maximal
[4,2- 5,5]	6,9	9,4

III.1.3 Activité de l'eau (a_w)

Les valeurs de l' a_w nécessaires à la croissance des STEC sont rapportées dans le tableau 6.

Tableau 6. a_w nécessaire à la croissance des STEC (Lindblad et Lindqvist, 2010)

a_w minimale	a_w optimale
0,945 à 0,95	0,995

IV Facteurs de virulence et pouvoir pathogène des STEC

La virulence des STEC est associée à deux processus :

- la colonisation du tube digestif par l'intermédiaire d'une protéine appelée intimine, responsable de l'adhésion des bactéries aux cellules intestinales de l'homme ;
- La production de toxines appelées Shiga-toxines (Stx) (Bielaszewska *et al.*, 2011).

Cependant, il existe d'autres facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité des STEC, tels que l'entérohémolysine et l'entérotoxine EAST1.

Les gènes qui codent les principaux facteurs de virulence des STEC sont portés par des éléments mobiles du génome, éléments acquis lors d'échanges génétiques par transfert horizontal : îlots de pathogénicité, bactériophages et plasmides (Brugère *et al.*, 2013). Parmi ces facteurs de virulence, nous décrirons : les facteurs d'adhésion, les Shiga-toxines, la production de l'entérohémolysine, la capacité à utiliser le fer et l'entérotoxine EAST1.

IV.1 Facteurs d'adhésion

La plupart des souches STEC provoquent des lésions dites « d'attachement et d'effacement » (A/E) des cellules de la muqueuse de l'iléon distal et du côlon, par l'intermédiaire d'une protéine de membrane, l'intimine produit du gène *eae*, situé au sein du locus chromosomique « LEE » (*locus of enterocyte effacement*). Ces souches provoquant la maladie chez l'homme sont appelées EHEC « typiques ». Des souches LEE négatives ont cependant également été associées à des SHU. Ces souches EHEC « atypiques » doivent donc posséder d'autres facteurs d'adhésion permettant la colonisation de la muqueuse colique, et plusieurs adhésines potentielles ont effectivement été décrites, telles que l'adhésine Saa ou les facteurs d'adhésion « entéroaggrégative » décrits chez *E. coli* O111:H2 en France en 1996, et chez la souche de *E. coli* O104 :H4 responsable de l'épidémie allemande et de l'épidémie française de 2011 (Bielaszewski *et al.*, 2011 ; Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2011). Après ingestion, et une fois dans l'estomac, les STEC peuvent résister au pH acide de ce compartiment, qui est en dessous de 2.5, grâce aux systèmes de résistance à l'acidité gastrique faisant appel à différents mécanismes d'acido-résistance (Zhao et Houry, 2010 ; Peng *et al.*, 2011). Ces différents mécanismes sont à même de maximiser les chances de survie de la bactérie et par ce fait, de coloniser l'hôte, jouant ainsi un rôle clef dans la pathogénicité des STEC (Hong *et al.*, 2012).

Une fois l'estomac franchi, les bactéries atteignent l'intestin où elles colonisent la muqueuse en adhérant aux cellules épithéliales, le côlon étant le principal site de colonisation des STEC

chez l'Homme (Karmali *et al.*, 2010). Les facteurs d'adhésion sont des éléments majeurs de la pathogénie. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des *fimbriae*, des protéines de la membrane externe, et des lipopolysaccharides. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de connaître les différents facteurs responsables de ce processus (Wagner et Hensel, 2011). Les STEC possèdent de nombreux facteurs d'adhésion permettant leur attachement aux entérocytes, parmi eux nous décrivons :

IV.1.1 Facteur d'attachement et d'effacement

L'adhésion de certaines souches de STEC au tube digestif s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites « lésions d'attachement - effacement (A/E) » limitées au côlon et au caecum (Donnenberg *et al.*, 1993). Les lésions A/E, d'abord décrites chez les EPEC, sont caractérisées par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal, dans la zone de contact entre la bactérie et la cellule cible (China, 2000). Un piédestal, constitué d'actine cellulaire sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon très étroite, est alors constitué. L'attachement aux entérocytes, puis l'effacement des microvillosités, reposent sur des modifications du cytosquelette qui consistent essentiellement en une accumulation de microfilaments d'actine constitutifs des microvillosités plus ou moins dépolymérisés dans la zone apicale du cytoplasme cellulaire, en contact étroit avec la bactérie (China, 2000). La forte diminution du nombre de microvillosités assurant un rôle de réabsorption de l'eau au niveau de l'intestin va alors entraîner l'apparition de symptômes diarrhéiques. Contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, l'adhésion des STEC se limite à l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer (Phillips et Frankel, 2000).

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE codant un système de sécrétion de type III et trois classes de protéines sécrétées par l'intermédiaire de celui-ci (Jarvis et Kaper, 1996). Les gènes responsables de la formation des lésions A/E sont :

- Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) codant une protéine de surface de 94 KDa appelée « intimine » qui a pour rôle d'adhérer intimement à l'entérocyte (Jerse et Kaper, 1991).
- Le gène *tir* qui code le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor), injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce au système de sécrétion de type III où il est modifié par des kinases (Kenny *et al.*, 1997).

Le LEE fait partie des îlots de pathogénicité qui se caractérisent ainsi :

- Ils sont généralement absents des bactéries non pathogènes appartenant à la même espèce.
- Ils sont constitués d'un groupe de gènes de virulence dont les gènes codant des toxines, des adhésines, des invasines, des systèmes chélateurs de fer, ainsi que des systèmes d'export de facteurs de virulence.
- Le pourcentage G+C est différent de celui du reste du chromosome.
- Ils occupent généralement une région chromosomique de plus de 30 Kb.
- Leur taille peut varier de 5 à 200 Kb.
- Ils portent des gènes codant des intégrases d'origine phagique, des transposases, avec des origines de répllication plasmidiques, souvent cryptiques. La présence de ces gènes suggère un système d'intégration de l'ADN étranger par l'intermédiaire de transposons, d'intégrons, de phages ou de plasmides, laissant également supposer une grande mobilité de certains îlots de pathogénicité (Mainil, 2003a).

Le LEE, n'est pas indispensable à la pathogénicité d'une souche ; cependant cette dernière sera plus facilement et d'autant plus pathogène si elle le possède (Schmidt *et al.*, 1994). D'autres effecteurs sont codés par les gènes présents au niveau du LEE comme l'effecteur Map (Mitochondrion-associated protein), essentiel dans les phénomènes d'altération de la barrière intestinale, et des jonctions serrées entre les entérocytes. Ou encore les gènes *Eesp* (EPEC-secreted protein) qui codent pour une « seringue » moléculaire tel que l'EspF, qui intervient dans le phénomène d'effacement des microvillosités, d'altération de la barrière intestinale et l'apoptose. Le gène *EspB* quant à lui joue un rôle dans la translocation des effecteurs, l'effacement des microvillosités et la modification du cytosquelette. Le gène *EspH* est impliqué dans la formation du piédestal et de son élongation (Wong *et al.*, 2012). Le gène *EspZ* est impliqué dans la régulation du phénomène de translocation des systèmes de sécrétion de type 3 (Berger *et al.*, 2012).

IV.1.2 Adhésine Saa

Certains STEC ne possédant pas le LEE: *stx*⁺, *eae*⁻ ont été impliqués à plusieurs reprises dans des épidémies de SHU. A la lumière de ces observations, il est intéressant de noter que les souches de sérotypes O113:H21, O91:H21, O48:H21, isolées fréquemment chez les petits ruminants, sont également isolées en situation pathogène chez l'homme. Ces souches possèdent une adhésine appelée Saa (STEC autoagglutinating adhesin) qui est une protéine de

surface de 516 acides aminés, qui possède une certaine homologie avec la protéine YadA de *Yersinia Enterocolitica* (Paton *et al.*, 2001).

IV.1.3 Adhésion fimbriaire

L'adhésion fimbriaire est un mécanisme fréquent chez les *E. coli* pathogènes, et notamment chez les ETEC et les EPEC. Elle a été mise en évidence chez la majorité des souches de sérotype O157 : H7, et chez 41 % des souches non-O157 (Willshaw *et al.*, 1992).

IV.1.4 Facteurs d'adhésion « entéroaggrégative »

Certaines souches d'EHEC ne possèdent pas le gène *eae*. C'est le cas du sérotype O104 :H4 ($stx_2^+ eae^-$), où la fixation et la colonisation de la muqueuse colique par la bactérie sont assurées par un autre facteur d'adhésion autre que l'intimine, codé par le gène *aggR* présent sur le plasmide pAA caractéristique des *E. coli* entéro-agrégatives (Grad *et al.*, 2012).

IV.2 Shiga-toxines

Les Shiga-toxines, Stx1 et Stx2, sont considérées comme les principaux facteurs de virulence des STEC (Melton-Celsa, 2014).

IV.2.1 Structure

Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70 kDa constitués d'une sous-unité A (Activité) de 33 kDa et de 5 sous-unités B (Binding ou liaison) de 7,7 kDa (Melton-Celsa, 2014). Deux grandes classes de Shiga-toxines ont été décrites :

- les Shiga-toxines de type 1 « Stx1 » ;
- les Shiga-toxines de type 2 « Stx2 ».

Les deux groupes de toxines présentent des différences : au niveau immunologique, la toxine Stx1 est neutralisable par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1, alors que Stx2 ne l'est pas (Calderwood *et al.*, 1996). En ce qui concerne les séquences en acides aminés, Stx1 et Stx2 présentent respectivement 99 % et 50 % d'homologie avec la toxine de référence précédemment citée (Strockbine *et al.*, 1988). Cependant, leurs propriétés biochimiques et leurs mécanismes d'action sont identiques. Il a été aussi prouvé que la toxine Stx2 est mille fois plus cytotoxique que la Stx1. Les souches produisant Stx2 sont généralement responsables des pathologies les plus graves (Joly et Reynaud, 2003), cela peut être expliqué par le fait que la sous-unité A1 de Stx2 a une plus grande affinité pour les

ribosomes et une activité catalytique plus élevée par rapport à la sous-unité A1 de Stx1 ((Basu *et al.*, 2016). Stx1 ainsi que Stx2 sont codées par des bactériophages (Waldor *et al.*, 2005). Elles ont chacune leur propre régulation et peuvent être produites indépendamment par une même bactérie (Joly et Reynaud, 2003).

IV.2.2 Mode d'action

Les Shiga-toxines produites localement traversent l'épithélium intestinal avant de rejoindre la circulation sanguine et atteindre des récepteurs glycolipidiques spécifiques, les Gb3 (glactose- α (1-4), galactose- β (1-4), glucosyl-céramide). Le Gb3 a été mis en évidence principalement sur les cellules HeLa et les cellules Véro. Peu de lignées cellulaires reconnaissent cette toxine. Il est important de souligner que seules les cellules des primates et les cellules humaines y sont sensibles (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2013). Les entérocytes, les cellules endothéliales vasculaires humaines du colon, du parenchyme rénal et du système nerveux central, sont particulièrement riches en ces récepteurs. Les Shiga- toxines sont composées d'une seule sous-unité A et d'une sous-unité B pentamérique (Melton-Celsa, 2014). L'attachement du pentamère de la sous-unité B au Gb3, induit l'entrée de la sous-unité A dans la cellule (Lauvrak *et al.*, 2004). Il a été montré que la Shiga-toxine ne s'attache *in vivo* qu'aux cellules villositaires qui contiennent le récepteur Gb3, et non aux cellules cryptiques qui sont démunies de ce glycolipide. La toxine est internalisée par voie endocytosique et les vésicules formées, contenant la toxine, fusionnent avec des lysosomes. La sous-unité A1, provenant du clivage du composant A par réduction d'un pont disulfure, passe dans le cytosol, où elle s'associe à la sous-unité 60S du ribosome. Cet attachement sélectif permet à la Shiga-toxine d'affecter essentiellement l'absorption du sodium, propre aux cellules du sommet des villosités, et d'altérer légèrement et indirectement la sécrétion du chlore par les cellules cryptiques à la base des villosités (Rousset et Dubreuil, 2000). L'activité N-glycosidase de la sous-unité A1 clive l'adénine en position 4 324 de l'extrémité 3' de l'ARNr 28S du complexe ribosomal, inhibant l'action du facteur d'élongation peptidique, et donc la synthèse protéique (Shi *et al.*, 2016). Ce qui entraîne la mort des cellules cibles par arrêt des synthèses protéiques et induisent des lésions de l'endothélium vasculaire, principalement intestinal, rénal et cérébral, ce qui explique les manifestations cliniques avec complications rénales et/ou neurologiques (Rosales *et al.*, 2012). Ce mécanisme rend compte de l'activité entéronécrosante de la Shiga-toxine (Rousset et Dubreuil, 2000). L'effet sécrétoire serait corrélé à la destruction des cellules épithéliales impliquées dans l'absorption intestinale du sodium. Une importante quantité de toxine pourra donc agir au niveau des tissus associés, entraînant ainsi une réaction inflammatoire pouvant aboutir à des complications de type SHU,

correspondant à une insuffisance rénale sévère, ou à un PTT correspondant à des atteintes neurologiques graves touchant le système nerveux central et pouvant conduire à la mort du malade (Tarr, 2009). Le mode d'action des Shiga-toxines est illustré par la figure 6.

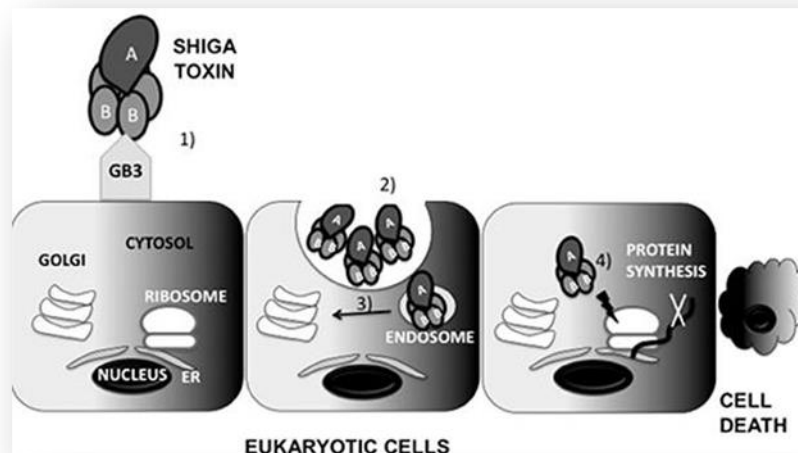


Figure 6 : Mode d'action des Shiga-toxines sur les cellules eucaryotes (Pacheco et Sperandio, 2012)

IV.2.3 Gènes *stx*

Les gènes codant les Shiga-toxines Stx1 et Stx2 sont notés respectivement *stx₁* et *stx₂* d'après la convention d'écriture internationale (Calderwood *et al.*, 1996). Les gènes *stx* sont situés sur un opéron généralement porté par un bactériophage de type λ -like. Ce sont des phages lysogènes intégrés dans le chromosome bactérien, qui peuvent être transférés entre des bactéries apparentées, créant un éventail varié de souches bactériennes sécrétant un ou plusieurs sous-types de toxines (variants) (Krüger et Lucchesi, 2015). La comparaison des séquences des Shiga-toxines montre que le gène *stx₁*, très conservé, est pratiquement identique à celui de *Shigella dysenteriae* de type 1 (Strockbine *et al.*, 1988), alors que le gène *stx₂* est beaucoup moins conservé, ce qui permet de distinguer plusieurs sous-types de *stx₂*.

IV.2.3.1 Variants des gènes *stx*

Les variants ont tout d'abord été mis en évidence sur la base des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs des toxines Stx (Calderwood *et al.*, 1996). Ces différences sont majoritairement dues à des mutations au niveau de la séquence nucléotidique des gènes *stx* modifiant donc légèrement la structure de la toxine (Bertin *et al.*, 2001). Tous les variants ont les mêmes particularités génétiques que

les gènes de référence, *stx₁* et *stx₂*. Il n'est donc pas rare, suite à l'insertion de plusieurs phages dans le chromosome bactérien, d'observer des souches possédant plusieurs variants.

La détermination des variants de *stx* est considérée comme un facteur prédictif de sévérité des infections à STEC avec évolution vers le SHU, en particulier « *stx_{2d}* activable » (Bielaszewska *et al.*, 2006) et « *stx_{2c}* » (Orth *et al.*, 2007). Scheutz *et al.* (2012) ont normalisé la nomenclature *stx* en désignant les sous-types *stx₁* comme *stx_{1a}*, *stx_{1c}* et *stx_{1d}*, et les sous-types *stx₂* comme *stx_{2a}*, *stx_{2b}*, *stx_{2c}*, *stx_{2d}*, *stx_{2e}*, *stx_{2f}* et *stx_{2g}* en fonction de la similarité des séquences d'acides aminés.

a) Variants du gène *stx₁*

Quelques variants de *stx₁* ont été décrits : *stx₁*, *stx_{1c}* et *stx_{1d}*. Le variant *stx₁* correspond à la séquence nucléotidique du gène *stx₁* porté par le phage 933j (Strockbine *et al.*, 1986) et représente le variant de référence ou variant « sauvage ». Le variant *stx_{1c}*, tout d'abord mis en évidence chez des souches d'origine ovine et nommé *stx_{10x3}*, a été retrouvé aussi chez des souches humaines. Les pourcentages d'homologie avec le gène *stx₁* sont respectivement de 97 et 95% pour les séquences des sous-unités A et B. Les protéines quant à elles ne diffèrent que de 9 et 3 acides aminés correspondant à 97,1 et 96,6% d'homologie entre les sous-unités A et B respectivement (Koch *et al.*, 2001). Le variant *stx_{1d}* a été mis en évidence chez une souche d'origine bovine. Un séquençage du gène a montré que les régions codant les sous-unités A et B possédaient 93 et 92% d'homologie respectivement avec la séquence de référence *stx₁*. Ce résultat correspond à une différence de 20 acides aminés pour la sous-unité A et de 7 acides aminés pour la sous-unité B (Burk *et al.*, 2003).

b) Variants du gène *stx₂*

Les variants *stx₂* sont beaucoup plus nombreux. On distingue sept variants qui sont *stx₂*, *stx_{2c}*, *stx_{2d}*, *stx_{2e}*, *stx_{2f}*, *stx_{2g}* et *stx_{2NV206}*. Le variant *stx₂* est le gène « sauvage » correspondant au gène de la souche de référence EDL 933 qui porte le phage 933W (Strockbine *et al.*, 1986). Le variant *stx_{2c}* appartenant au sérotype O148 : H8, a été isolé à partir de viande ovine et de selles de patients atteints du SHU en France (Espié et Vaillant, 2002).

IV.3 Production de l'entérohémolysine

La production de l'hémolysine est un caractère fréquemment retrouvé chez les souches d'*E. coli* impliquées dans des infections intestinales et extra intestinales. Un fragment de 3,5 Kb (gène *ehxA*) mis en évidence sur le plasmide pO157 code une entérohémolysine E- hlyA qui provoque la lyse des érythrocytes. Cette hémolysine est plus ou moins apparentée à l' α -hémolysine d'*E. coli*. Elle est produite en phase stationnaire de croissance et n'est pas excrétée dans le surnageant de culture (Schmidt *et al.*, 1994). La production de l'entérohémolysine semble être corrélée à la présence du plasmide pO157 dans la quasi-totalité des souches O157 : H7 et dans environ 60 % des STEC non O157 isolés des cas de SHU (Chart *et al.*, 1998). De ce fait, elle peut être considérée comme un marqueur épidémiologique lors des infections à STEC (Beutin *et al.*, 1989)

IV.4 Capacité à utiliser le fer

Le fer est présent en grande quantité dans le sang et les tissus, mais le fer libre, sous forme d'ions ferreux, seul utilisable par les bactéries, est présent en très faible quantité (10^{-18} molaire) (Mainil, 2003b). Le fer se trouve en effet dans les cellules, lié à l'hème, à l'hémosidérine, à la ferritine, et dans le milieu extracellulaire lié à des glycoprotéines comme la transferrine dans le plasma. Le rôle physiologique de la transferrine est de chélater et de livrer les ions de fer aux cellules eucaryotes. Selon Mainil (2003b), les bactéries peuvent s'approvisionner en fer selon cinq stratégies différentes :

- A partir des produits de dégradation de l'hémoglobine après hémolyse ;
- Directement à partir de la transferrine ou la lactoferrine de l'hôte ;
- Indirectement à partir de ces deux molécules par la production de sidérophores ;
- Indirectement à partir de sidérophores produits par d'autres bactéries ;
- A partir des pools intracellulaires de fer pour les bactéries pathogènes intracellulaires.

La première stratégie est celle utilisée par les bactéries produisant des hémolysines, car elles sont en plus capables de digérer l'hémoglobine et d'assimiler les porphyrines. Les hémolysines d'*E. coli* peuvent jouer ce rôle, mais, à lui seul, ce mécanisme est insuffisant. Pour la troisième stratégie, qui est la plus efficace et la plus répandue dans le monde des bactéries pathogènes, des sidérophores de très haute affinité sont produits pour détacher le fer des chélateurs de l'hôte. *E. coli* peut aussi utiliser des sidérophores produits par d'autres bactéries. Elle peut en effet synthétiser des récepteurs à ces différents sidérophores (Mainil, 2003b).

IV.5 Entérotoxine EAST1

Mise en évidence chez les *E. coli* entéroaggrégatifs, elle agit sur les cellules intestinales au niveau des mécanismes de sécrétions. Le gène codant cette toxine a été mis en évidence chez des souches de sérotype O157 : H7. Il semblerait que l'entérotoxine EAST1 a un rôle dans l'induction de la phase initiale de la diarrhée aqueuse observée lors des infections à EHEC (Nataro et Kaper, 1998) .

V Infections liées aux STEC

Chez l'homme, après ingestion d'une dose infectieuse faible (inférieure à 100 unités formant colonies ou ufc) (Caprioli *et al.*, 2005), et après une période d'incubation de trois à quatre jours pouvant aller jusqu'à dix jours (Karmali, 1989), les infections à STEC peuvent revêtir des tableaux cliniques variés allant de la diarrhée bénigne à des colites hémorragiques (Caprioli *et al.*, 2005). Ces dernières se compliquent parfois au bout de quelques jours d'un syndrome hémolytique urémique (SHU) chez l'enfant et le sujet âgé, et plus rarement de Purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Tarr, 2009).

V.1 Colite hémorragique (CH)

La colite hémorragique est la forme la plus fréquente des affections humaines dues aux STEC, d'où l'appellation EHEC (entérohémorragiques) pour tous les sérotypes associés à cette pathologie. La colite hémorragique causée par les EHEC est caractérisée par des crampes abdominales soudaines suivies très rapidement par une diarrhée aqueuse. Après un à deux jours, les selles deviennent hémorragiques et la douleur s'intensifie. Des vomissements et des nausées peuvent être observés chez environ la moitié des patients de manière précoce tandis que la fièvre apparaît chez moins d'un tiers. Généralement, elle n'est pas élevée et rencontrée chez les sujets les plus sévèrement atteints (Griffin et Tauxe, 1991). Ces colites nécessitent souvent une hospitalisation du fait de la sévérité des douleurs abdominales et de la grande émission de sang dans les selles, qui peut aller jusqu'à 11 émissions par jour (Sutra *et al.*, 1998). Cependant, des formes cliniques avec une diarrhée non hémorragique existent. Du fait de leur moindre gravité, elles sont moins rapportées par les médecins ; néanmoins elles sont peu fréquentes. L'infection asymptomatique a également été rapportée (Nagano *et al.*, 2004).

V.2 Syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Les Shiga-toxines sont la principale cause du syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez les patients infectés par les STEC. Le SHU est l'une des principales causes d'insuffisance rénale pédiatrique chez des enfants, entraînant un taux de mortalité de 10 % et un taux de morbidité chronique proche de 25 % (Hall *et al.*, 2017). Le syndrome hémolytique et urémique est caractérisé par la triade (Goodship, 2004) :

- Anémie hémolytique microangiopathique ;
- Insuffisance rénale aiguë ;
- Thrombopénie.

Le SHU correspond à des lésions de type microangiopathie thrombotique (MAT), touchant les reins et éventuellement d'autres viscères, caractérisées par un épaississement des parois des capillaires glomérulaires et/ou des artérioles et par la présence de micro-agrégats plaquettaires dans les capillaires et les artérioles. Les anomalies histologiques caractéristiques combinent élargissement de l'espace sous-endothélial et thrombi plaquettaires dans la lumière des petits vaisseaux du rein et d'autres organes, notamment le tube digestif et le cerveau. La consommation plaquettaire et la fragmentation des hématies dans la microcirculation lésée, rendent compte de la thrombopénie et de l'anémie hémolytique (Remuzzi et Ruggerenti, 1995). La classification habituelle du SHU distingue les SHU post-diarrhée (D+) et les SHU non associés à une diarrhée (D-), appelés aussi SHU atypique (Goodship., 2004).

Les SHU dits atypiques (SHUa) représentent 5 à 10 % des SHU de l'enfant : ils ne sont pas liés à une infection à STEC, surviennent à tout âge, peuvent être familiaux, et ont un pronostic réservé, plus de 50 % des patients évoluant rapidement vers l'insuffisance rénale terminale. Soixante-dix pourcent des patients atteints de SHUa ont des mutations d'un des gènes qui codent pour des protéines du complément : le facteur H, le facteur I, la membrane cofactor protein (MCP), le facteur B ou le C3 (Sellier-Leclerc *et al.*, 2007).

Au cours de ces dernières années, des progrès importants ont été accomplis dans la génétique et la compréhension des mécanismes qui sont à l'origine des SHU. Dans les SHU associés aux diarrhées (D+), il a été démontré que la virulence des souches d'*E. coli* O157 : H7 est liée à l'adhésion et au transport des Shiga-toxines par les polynucléaires, ces derniers jouant un rôle important de médiateurs. Des modifications précoces de la coagulation sont des signes précurseurs de ce type de SHU. Les Shiga- toxines peuvent se fixer spécifiquement à des récepteurs des leucocytes qui sont alors activés et adhèrent à la paroi vasculaire. C'est ainsi

que plusieurs médiateurs issus des leucocytes activés lèsent directement la cellule endothéliale qui libère dans la microcirculation des multimères vWF (Facteur von Willebrand) de très grande taille. A son tour, l'agression de la cellule endothéliale provoque une expansion sous endothéliale ainsi qu'un gonflement et une prolifération myo-intimale aboutissant au rétrécissement ou à l'oblitération de la lumière vasculaire. Le rétrécissement vasculaire augmente les résistances, et donc les forces de cisaillements qui altèrent la fonction et le métabolisme du multimère vWF et l'interaction des plaquettes avec l'endothélium. Dans les conditions normales, l'écoulement du flux sanguin est laminaire et les multimères vWF circulent sous forme repliée. Sous l'effet du gonflement et de l'endothélium, l'écoulement du flux sanguin devient turbulent dans la lumière vasculaire rétrécie. L'augmentation consécutive de la force de cisaillement peut induire une activation plaquettaire et l'absence de reploiement des multimères vWF. Ces multimères non repliés deviennent accessibles à l'activité de protéases circulantes aboutissant à une fragmentation anormale. Les fragments vWF se lient aux plaquettes activées et contribuent à l'agrégation plaquettaire et à la formation de thrombi (Remuzzi et Ruggerenti, 2000). Le SHU typique (D+) dû à une infection par les STEC est associé à une diarrhée prodromique à laquelle succède une insuffisance rénale aigüe (Goodship, 2004). Les facteurs prédictifs de la sévérité du SHU incluent (Goodship, 2004):

- un âge inférieur à deux ans ;
- des prodromes digestifs sévères ;
- une leucocytose élevée ;
- une anurie précoce.

Le bilan biologique du SHU est caractérisé par (Brisabois *et al.*, 2004) :

- une anémie hémolytique microangiopathique (hémoglobine < 10 g/100ml et schizocytose > 2 %) ;
- une insuffisance rénale (créatinine > 60 µmol si âge < 2 ans, ou > 70 µmol si âge > 2 ans).

La persistance de l'anurie au-delà du dixième jour, la nécessité de dialyse à la phase aigüe et la persistance d'une protéinurie au douzième mois sont associées à un risque accru d'insuffisance rénale chronique à long terme. Une nécrose corticale focale ou l'atteinte de plus de 50 % des glomérules sont également prédictifs d'un mauvais pronostic (Remuzzi et Ruggerenti, 2000). Le diagnostic repose sur la détection d'*E. coli* O157:H7 dans la

coproculture (Vernozy-Rozand et Montet, 2005). Au cours du SHU, d'autres organes que le rein peuvent être atteints (Loirat et Taylor, 2004 ; Siegler et Oakes, 2005) :

- Une atteinte du système nerveux central est observée dans environ 20 % des cas et peut conditionner le pronostic vital. Les symptômes les plus fréquents sont des convulsions focales ou généralisées, une torpeur, voire un coma ;
- Une colite hémorragique sévère est observée dans 10 à 20 % des cas, avec un méléna prolongé, des douleurs abdominales, des vomissements, un état sub occlusif ou un prolapsus rectal. Plus rarement une invagination, une nécrose avec perforation de la paroi colique et sténose secondaire peuvent survenir. L'intestin grêle peut également être touché ;
- Une pancréatite aiguë est observée dans environ 20 % des cas ;
- Une atteinte hépatique, le plus souvent bénigne, est observée dans environ 40 % des cas ;
- Une atteinte cardiaque (< 1 % des cas) avec myocardite, choc cardiogénique.

V.3 Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

Outre la triade anémie hémolytique microangiopathique, thrombopénie et insuffisance rénale aiguë, le PTT est caractérisé par la présence de la fièvre et des symptômes neurologiques regroupant :

- tremblements généralisés ;
- troubles du comportement ;
- myoclonie.

Le PTT est très proche du SHU décrit chez l'enfant. Il est cependant beaucoup plus rare chez l'adulte que chez l'enfant, avec un pronostic plus défavorable chez l'adulte. Lorsque la guérison est acquise, elle est le plus souvent définitive (Leclerc et al., 2002).

Les évolutions cliniques après ingestion de STEC sont indiquées dans la figure 7.

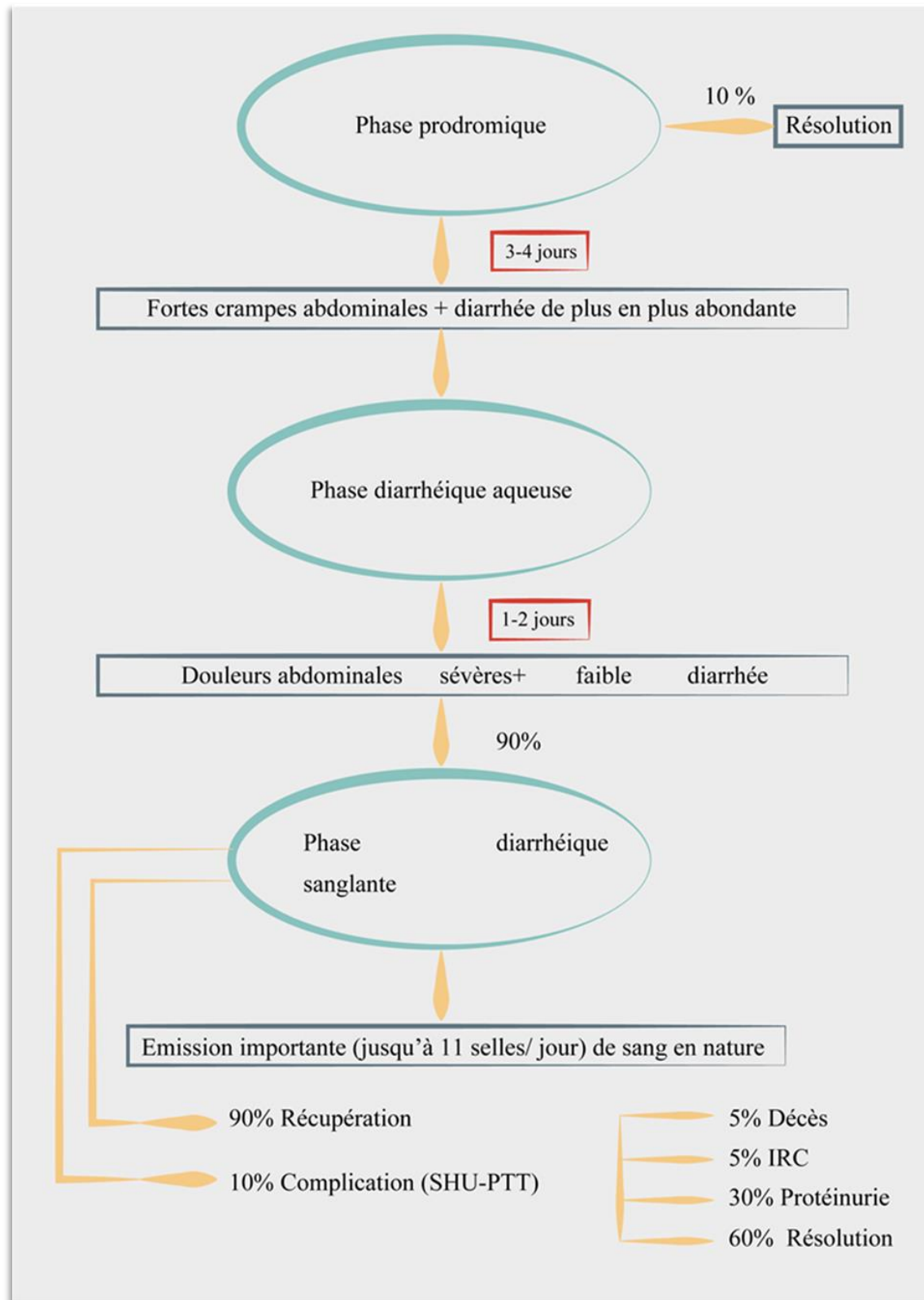


Figure 7. Evolutions cliniques de la colite hémorragique due à *E. coli* O157 : H7 (Sutra *et al.*, 1998, AFSSA, 2003)

V.4 Traitement

La mise au repos du tube digestif est indiquée au cours de la colite entérohémorragique associée au SHU, en association à un contrôle attentif du bilan hydroélectrolytique afin d'éviter l'hyperhydratation, notamment chez les patients oligoanuriques. Une transfusion sanguine peut être nécessaire si l'anémie secondaire à l'hémolyse mécanique est symptomatique. La dialyse, combinée à la correction des anomalies hydroélectrolytiques et de l'anémie, a joué un rôle considérable dans la réduction de la mortalité globale (Remuzzi et Ruggenti, 2000).

Aucun traitement antibiotique n'est utile. L'utilisation de certains anti-infectieux, comme le triméthoprim-sulfaméthoxazole, en milieu hospitalier pour le traitement des STEC peut induire une libération et une dispersion des Shiga-toxines (Zhang *et al.*, 2000) ou même compliquer l'évolution de la situation clinique des patients (Wong *et al.*, 2000). Les antispasmodiques sont également contre-indiqués.

L'utilisation des antibiotiques n'est pas recommandée (Loirat *et al.*, 2013). Les souches STEC sont sensibles aux antibiotiques, mais l'antibiothérapie est généralement contre-indiquée en raison de l'association d'un traitement antibiotique à une libération et une dispersion de toxines probablement lors de la lyse bactérienne avec un risque de développement d'un SHU (Freedman *et al.*, 2016).

L'usage de l'héparine, ainsi que les agents antithrombotiques exposent les patients à un risque accru de saignement, ils doivent par ce fait être évités. De nouveaux traitements destinés à inhiber l'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cibles ont été étudiés (O'Brien et Melton-Celsa, 2014). Afin de remédier aux infections causées par les STEC plusieurs traitements sont à l'étude, parmi eux nous citons :

V.4.1 Traitements neutralisant les toxines Stx

Il existe plusieurs approches de ce type, basées sur l'utilisation de polymères du récepteur Gb3 administrés par voie orale, d'analogues solubles du récepteur Gb3 administrés par voie intraveineuse, ou encore de probiotiques donnés par voie orale qui produisent un analogue du récepteur Gb3. Ces substances protègent la souris de doses létales de STEC (Scheiring *et al.*, 2008). Des études chez l'homme sont en cours.

V.4.2 Anticorps monoclonaux humanisés anti-Stx

Les anticorps monoclonaux anti-Stx préviennent la toxicité des toxines Stx sur cellules HeLa, prolongent la survie des souris infectées par des EHEC, et sont efficaces dans le modèle de SHU chez le cochonnet (survie de 90 % chez les animaux traités versus 10 % chez les contrôles non traités) (Loirat *et al.*, 2013).

V.4.3 Anticorps monoclonaux inhibant l'activation du complément

L'utilisation d'un anticorps monoclonal inhibant l'activation du complément (Eculizimab) a montré son efficacité dans le traitement du SHU post-diarrhée sévère de l'enfant (Lapeyraque *et al.*, 2011). Des études complémentaires sont en cours chez l'homme.

VI Epidémiologie des STEC

Les affections dues aux STEC sont qualifiées de maladies d'origine alimentaire. Elles se manifestent du point de vue épidémiologique soit sous forme sporadique soit sous forme d'épidémies dont certaines ont été très marquantes par le nombre élevé de malades (Pennington, 2014).

VI.1 Epidémiologie des STEC chez l'homme

Depuis que l'on a reconnu pour la première fois ces agents pathogènes chez l'homme en 1982, les STEC et en particulier, *E. coli* O157 : H7 a acquis une notoriété croissante dans les secteurs sanitaires et agricoles des pays développés ainsi que chez le grand public (Browne *et al.*, 2018). La propension de ce groupe d'agents pathogènes a entraîné des épidémies importantes, parfois très étendues dans l'espace, induisant l'apparition de séquelles rénales et cérébrales à long terme, menaçant ainsi la vie des sujets atteints (Rosales *et al.*, 2012). La gravité des lésions ainsi que les pertes économiques engendrées par les STEC ont poussé certains pays, tel que la Nouvelle-Zélande, à classer ces pathogènes dans la liste des agents zoonotiques à déclaration obligatoire (Browne *et al.*, 2018). Le recours à des épreuves de diagnostics décelant les Shiga-toxines a permis d'impliquer d'autres sérogroupes de STEC non-O157, comme O26, O103, O111, O145, O45, O91, O113, O121 et O128, dans la survenue de flambées épidémiques et de cas sporadiques de diarrhées sanglantes ainsi que du SHU (Momtaz *et al.*, 2012). Les STEC ont été détectés dans tous les pays où ils ont été recherchés. Ces infections sont plus fréquentes dans les pays industrialisés : Europe, ouest du Canada et Amérique du Nord (Vally *et al.*, 2012).

En France, au cours de la période 2011-2015, six cent quatre-vingt-sept cas de SHU ont été notifiés (cent trente-sept cas en moyenne par an). Depuis 1996, l'incidence annuelle du SHU varie entre 0,6 et 1,3 cas / 100 000 enfants de moins de 15 ans. Ces cas surviennent essentiellement sous forme sporadique. L'incidence annuelle la plus élevée est observée chez les enfants de moins de 3 ans ; elle était de 3,1 cas /100 000 enfants en 2015 (Bruyand *et al.*, 2016). En Nouvelle-Zélande, l'incidence des infections dues aux STEC était de 8,9 cas/100 000 personnes déclarées en 2016 contre 2,85 aux États-Unis et 12,92 en Irlande, 5,08 aux Pays-Bas et 2,05/100 000 au Royaume-Uni (Browne *et al.*, 2018). Des analyses de coûts concernant les maladies liées aux STEC, en tenant compte de l'incidence et de la gravité de la maladie ainsi que de la perte de productivité, ont été effectuées pour quantifier le fardeau de morbidité imputable à ces agents pathogènes. D'après les estimations de l'OMS, les STEC ont causé plus d'un million de cas d'infections avec cent vingt-huit décès entre 1990 et 2012 (Majowicz *et al.*, 2014).

VI.2 Epidémiologie des STEC chez les animaux

Les STEC font partie du groupe des agents zoonotiques dits latents, pour lesquels les animaux sains font office de réservoirs. Des études menées dans de nombreux pays ont démontré que les ruminants constituent un des principaux réservoirs des STEC (Zweifel et Stephan, 2005). Outre les bovins qui constituent le principal réservoir des STEC O157 et non-O157 (Gyles, 2007), il a été prouvé que les ovins, les caprins et les camelins sont aussi des porteurs de ces pathogènes (Rahimi *et al.*, 2012).

VI.2.1 Chez les bovins

Au niveau mondial, les taux de prévalence concernant le portage fécal chez les bovins sont très variables et vont de 0,2 % à 27,8 % pour les STEC O157 et de 2,1 % à 70,1 % pour les STEC non-O157 (Hussein et Bollinger, 2005). Le portage des STEC par les bovins a été mis en évidence aussi bien chez les animaux de la filière « viande » que chez les cheptels laitiers. Les sérotypes les plus fréquemment isolés chez les bovins sont : O157 : H7, O20 :H19, O22 :H8, O26 :H11, O77 :H14, O105 :H18, O113 :H21 et O17 :H2 (Blanco *et al.*, 2003). L'étude réalisée en Algérie par Chahed *et al.*, (2006) a révélé une prévalence de 7,8 % d' *E. coli* O157 : H7 sur des carcasses bovines. Ces résultats témoignent du portage des STEC par les bovins en Algérie.

VI.2.2 Chez les petits ruminants

Comme les bovins, les ovins et les caprins peuvent être porteurs de STEC. Ils sont considérés comme des réservoirs naturels de ces pathogènes (Rey *et al.*, 2006). L'excrétion de plusieurs souches de STEC a été démontrée chez la chèvre (Jacob *et al.*, 2013) ainsi que chez les moutons (Kudva *et al.*, 1997). Certaines études ont révélé une prévalence des STEC non-O157 supérieure à celle des O157 chez les ovins (Pinaka *et al.*, 2013). La persistance des souches de STEC dans les cheptels est due d'une part au portage intestinal qui assure un apport régulier de STEC par l'excrétion des animaux porteurs, et d'autre part à la contamination des animaux par les sols et les eaux d'abreuvement contaminés par les déjections animales. En effet, les STEC peuvent survivre pendant plusieurs semaines dans les sols, les cultures, les eaux et les sédiments. Aussi, de mauvaises conditions de conservation (cas de l'ensilage de mauvaise qualité) peuvent également favoriser la persistance d'*E. coli* O157 dans les aliments destinés aux animaux (Brisabois *et al.*, 2004).

VI.2.3 Chez d'autres animaux

D'autres animaux d'élevage ou sauvages peuvent également être porteurs de STEC et participer ainsi à la contamination de l'environnement. Des études de portage chez les animaux domestiques ont également montré la présence de STEC chez le chat, le chien et le poulet (Zahraei Salehi *et al.*, 2010).

VI.3 Mode de transmission

Du fait des possibilités de leur transmission, directe ou indirecte, des réservoirs animaux à l'homme, les STEC sont considérés comme des agents zoonotiques. La principale voie de transmission est indirecte par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eau de boisson, contaminés par un environnement souillé, le plus souvent par les matières fécales d'animaux infectés. La transmission directe est possible par contact avec des animaux infectés ou avec leurs déjections, mais aussi de personne à personne (transmission interhumaine féco-orale). Aux États-Unis, les études épidémiologiques montrent que la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec les animaux (notamment les bovins) représentent respectivement 66 %, 20 %, 12 % et 2 % des modes de contamination (Anses, 2011).

VI.3.1 Transmission indirecte

La transmission indirecte se fait par la consommation d'aliments contaminés. L'analyse des différentes épidémies à STEC rapportées depuis 1982, montre une extrême variété d'aliments incriminés. Néanmoins, il est possible d'identifier trois groupes principaux (Sutra *et al.*, 1998) :

- Les produits d'origine animale ;
- Les produits d'origine végétale ;
- Les autres produits (eau de boisson, eau de baignade, jus de fruit).

Ce sont les produits d'origine animale qui sont le plus fréquemment incriminés, particulièrement les produits d'origine bovine (Chapman, 1995).

VI.3.1.1 Présence des STEC dans les filières de transformation des viandes

L'introduction à l'abattoir d'animaux porteurs de STEC entraîne un risque élevé de contamination des carcasses, y compris de celles provenant d'animaux détectés non excréteurs par contamination croisée. De ce fait, la viande et les sous-produits de viande provenant d'abattoirs et / ou de marchés de détail sont considérés comme des voies de transmission importantes des STEC à l'homme (Hong *et al.*, 2011). De plus, des travaux ont montré le potentiel de persistance de la bactérie au sein de l'abattoir, sur les surfaces et le matériel (Leclerc *et al.*, 2002). Ces constatations renforcent l'intérêt de la mise en œuvre de mesures d'hygiène préventives rigoureuses lors de l'abattage. Les principales épidémies en relation avec la consommation de produits carnés sont rapportées dans le tableau 7.

VI.3.1.2 Présence des STEC dans les filières du lait et des produits laitiers

Une souche d'*E. coli* O157 : H7 a été isolée pour la première fois en 1993 dans du lait non pasteurisé en Angleterre (Chapman *et al.*, 1993). La contamination du lait a lieu majoritairement lors de la traite par contact avec les matières fécales. Des travaux montrant l'envahissement des cultures épithéliales mammaires par *E. coli* O157 : H7, suggèrent également la possibilité de contamination du lait avant la traite (Brisabois *et al.*, 2004). En Espagne, lors d'une étude menée dans le but de déterminer la prévalence des STEC isolés de différents produits laitiers, il est apparu que 10,8 % du lait de chèvre non pasteurisé étaient contaminés par des STEC, ainsi que 3,9 % des fromages frais. Parmi ces derniers, 0,3 % étaient contaminés par des *E. coli* O157 : H7 (Rey *et al.*, 2006). Les produits laitiers à base de

lait cru mais aussi à base de lait pasteurisé ont été impliqués dans plusieurs épidémies suite à une contamination par des souches de STEC. Néanmoins, ces épidémies ont toutes été de moindre importance que celles provoquées suite à l'ingestion de produits carnés, d'eau ou de végétaux (Beutin et Martin, 2012).

VI.3.1.3 Présence des STEC dans les végétaux

La consommation de végétaux crus a été décrite comme l'un des modes de contamination chez l'homme par les STEC, en particulier par la souche O157 : H7. La contamination des graines serait possible avant la germination entraînant la multiplication des bactéries pendant cette phase. La contamination des fruits et légumes crus (laitue, radis, épinards, oignons, etc.) peut faire suite à l'utilisation d'engrais contaminés (fumiers et lisiers) épandus pour fertiliser les terres agricoles (Grif *et al.*, 2005, Brown *et al.*, 2012 ; Quilliam *et al.*, 2012).

En 2011, deux grandes épidémies ont été observées en Allemagne (Frank *et al.*, 2011) et en France (King *et al.*, 2012) suite à la consommation graines germées de Fenugrec. Celle enregistrée en Allemagne a touché 4 321 personnes dont 900 patients ont développé un SHU et a causé plus de 50 décès (Frank *et al.*, 2011). Cette souche a été identifiée comme étant un *E. coli* de sérotype O104 :H4 (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011). Des produits d'origine végétale contaminés par *E. coli* O157 : H7, comme par exemple du jus de pomme non pasteurisé, ont été à l'origine d'épidémies (Anonyme, 1999).

VI.3.1.4 Présence des STEC dans l'eau

La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitée a été à l'origine de cas isolés et d'épidémies à STEC (Liang *et al.*, 2006). Les eaux usées issues des abattoirs ou des stations d'épuration véhiculent et favorisent la dissémination des bactéries d'origine fécale dans l'environnement (Martinez-Castillo *et al.*, 2012). L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignade a été aussi incriminée (Barwick *et al.*, 2000). Au début des années 90, une épidémie d'origine hydrique (deux cent quarante-trois personnes affectées, dont trente-deux hospitalisations et quatre décès) mettant en cause la souche O157: H7, s'est produite dans une petite municipalité du Missouri (trois mille habitants). L'origine a été attribuée à l'infiltration d'eau contaminée dans le système d'aqueduc (Swerdlow *et al.*, 1992). Une autre épidémie à Walkerton (Ontario) a mis en cause la souche O157: H7 et *Compylobacter jejuni* à la suite de la contamination de l'un des puits municipaux par des déjections de bovins. Plus de deux mille trois cent personnes auraient été affectées parmi

lesquelles mille trois cent quarante-six ont manifesté des signes cliniques et six sont décédées (Bgoshu, 2000).

VI.3.2 Transmission directe

La transmission directe comprend la transmission de personne à personne et celle par contact avec les animaux.

VI.3.2.1 Transmission interhumaine

La transmission des STEC par contact direct avec un malade est rare. Cependant des cas d'infections à la suite de transmission de personne à personne ayant eu de la diarrhée ont été notés en milieu familial ou dans les collectivités, telles que les crèches, maisons de retraite ou institutions médico-sociales (Kohli *et al.*, 1994). Une étude réalisée par Karch en 1995 sur cinquante trois enfants infectés par *E. coli* O157 : H7, ayant développé une CH ou un SHU, a montré qu'il y avait une excrétion intermittente d'*E. coli* O157 : H7.

VI.3.2.2 Transmission par contact avec des animaux

Des infections par des STEC ont été observées en Angleterre, au Canada, aux Etats-Unis et aux Pays-Bas chez des enfants ayant visité des zoos pour enfants et des fermes qui offrent la possibilité aux visiteurs d'entrer en contact avec les animaux (open farms) (Schilling *et al.*, 2012). En 2009, le Royaume-Uni a noté l'éclosion d'une grande épidémie à *E. coli* O157 suite à une visite au niveau d'une ferme située près de Londres. Les enfants atteints étaient en contact avec des moutons, des chèvres, des cochons, un veau et un poulain (Pennington, 2014). Une synthèse des épidémies d'infections à STEC rencontrées dans le monde entre 1982 et 2019 est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7. Description de quelques épidémies d'infection à STEC dans le monde, de 1982 à 2019

Année	Pays	Nombre d'infections	Nombre SHU	Nombre de décès	Sérogroupe de STEC	Mode de transmission	Références
1982	USA	46	n.d	n.d	O157	Viande hachée de bœuf	(Riley <i>et al.</i> , 1983)
1984	USA	34	0	4	O157	Hamburger	(Ryan <i>et al.</i> , 1986)
1991	Canada	152	22	2	O157	Viande de caribou et bœuf haché	(Orr <i>et al.</i> , 1994)
1992	Angleterre	37	5	0	O157	De personne à personne	(Ammon, 1997)
1992	France	n.d	10	0	O111	De personne à personne	(Ammon, 1997)
1992	Allemagne	41	3	1	O157	De personne à personne	(Ammon, 1997)
1992	Italie	7	9	1	O111	Inconnu	(Ammon, 1997)
1992	Écosse	5	1	0	O157	Eau	(Ammon, 1997)
1992-1993	France	n.d	4	1	O119	Fromage au lait cru	(Ammon, 1997)
1992-1993	USA	501	45	1	O157	Hamburger	(Bell <i>et al.</i> , 1994)
1993	Italie	14	15	1	O157/O111/O86	Inconnu	(Ammon, 1997)
1994	Angleterre	7	4	0	O157	contact animal (bovins, chèvres)	(Ammon, 1997)
1994	France	n.d	4	0	O103	Fromage de chèvre au lait cru	(Ammon, 1997)
1994	USA	23	2	0	O157	Salami sec	(Tilden <i>et al.</i> , 1996)
1994	Angleterre	70	9	0	O157	Lait pasteurisé	(Upton and Coia, 1994)
1995	USA	70	1	0	O157	Laitue	(Ackers <i>et al.</i> , 1998)
1995	Australie	24	23	1	O111	Saucisse sèche fermentée	(Paton <i>et al.</i> , 1996)
1996	Japon	9451	0	12	O157	Radis blanc	(Michino <i>et al.</i> , 1999)
1996	Canada	70	14	1	O157	Jus de pomme non pasteurisé	(Cody <i>et al.</i> , 1999)
1997	Ecosse	37	0	0	O157	Gâteau à la crème	(O'Brien <i>et al.</i> , 2001)

n.d : non disponible

Année	Pays	Nombre d'infections	Nombre SHU	Nombre de décès	Sérogroupe de STEC	Mode de transmission	Références
2000	Canada	2300	n.d	7	O157	Eau de boisson	(Hilborn <i>et al.</i> , 2000)
2000	Angleterre	6	1	0	O157	Lait non pasteurisé	(Baylis, 2009)
2001	Canada	5	2	0	O157	Lait de chèvre non pasteurisé	(McIntyre <i>et al.</i> , 2002)
2002	France	11	2	0	O148	Viande de mouton	(Espié <i>et al.</i> , 2006)
2005	France	6	6	0	O26	Camembert	(Espié <i>et al.</i> , 2008)
2005	Suède	120	7	0	O157	Laitue	(Söderström <i>et al.</i> , 2005)
2006	Norvège	17	10	1	O103	Saucisse fermentée	(Sekse <i>et al.</i> , 2009)
2006	USA	199	31	3	O157	Epinard	(CDC, 2006)
2009	France	2	1	0	O123	Hamburger	(King <i>et al.</i> , 2010)
2010	USA	19	0	0	O145	Laitue	(CDC, 2010)
2011	Allemagne	3816	845	54	O104	Graines germées de Fenugrec	(Beutin and Martin, 2012)
2011	France	15	9	0	O104	Graines germées de Fenugrec	(Grad <i>et al.</i> , 2012)
2011	Japon	181	34	5	O111	Viande de bœuf	(Watahiki <i>et al.</i> , 2014)
2012	France	n.d	4	0	O157	Viande hachée de bœuf	(InVS, 2012)
2013	Suède	28	1	0	O157	Salade	(Edelstein <i>et al.</i> , 2014)
2015	France	n.d	111	0	O157/O26/O111/O55/O103/O145 /O121	n.d	(Bruyand <i>et al.</i> , 2015)
2016	Angleterre/Italie	25	19	3	O26	Fromage frais	(EFSA, 2016)
2017	France	n.d	164	0	O157/O26/O80 /O145 /O103/O91/O111/O121/O104	n.d	(Bruyand <i>et al.</i> , 2017)
2018	France	7	6	0	O26	Reblochons entiers au lait cru	(Anonyme, 2018)
2019	France	16	14	0	O26	Fromages au lait cru	(Jones <i>et al.</i> , 2019)

n.d : non disponible

VII Effet des traitements physiques et chimiques sur les STEC

Quelques informations sont disponibles sur le comportement des STEC dans les aliments. Néanmoins une meilleure connaissance des facteurs influençant leur croissance, leur survie voire leur élimination dans les denrées est nécessaire (Sutra *et al.*, 1998).

VII.1 Chaleur

Les STEC O157 et non-O157 ne sont pas classés dans la catégorie des bactéries thermostables (Doyle et Schoeni, 1984). Afin de déterminer la thermorésistance d'une bactérie, l'utilisation de deux paramètres de mesure est nécessaire, soit (Leyral et Vierling, 1997) :

- $D_{T^{\circ}\text{C}}$ = Durée d'application nécessaire d'une température donnée pour détruire 90 % de germes initialement présents ; c'est ce que l'on appelle la durée (ou temps) de réduction décimale.
- Z = Différence en degrés Celsius séparant deux températures pour lesquelles les valeurs de D sont dans un rapport de un à dix.

Les principaux résultats, obtenus à partir des différentes denrées testées, concernant la thermorésistance des STEC, ont dévoilé une variabilité de thermorésistance des bactéries selon la matrice en question. A titre d'exemple, la thermorésistance d'*E. coli* O157 : H7 apparaît plus élevée dans de la viande hachée de bœuf que dans celle du poulet (Vernozy-Rozand et Montet, 2005). Des recommandations pratiques ont été émises concernant l'application de traitements thermiques aux Etats-Unis et au Royaume uni, dans le but d'éliminer les *E. coli* O157 : H7 dans les aliments :

- La Food Safety Insection Services recommande pour l'inactivation d'*E. coli* O157 : H7 dans les hamburgers, boulettes de viande, viande en sauce, d'atteindre une température de 71,1°C, à cœur des produits (AFSSA, 2003).
- Au Royaume Uni et en Irlande, la recommandation consiste à maintenir les steaks et steaks hachés de bœuf à une température de 70°C pendant deux minutes (AFSSA, 2003).

VII.2 Réfrigération

Il faut être vigilant sur la température de réfrigération des denrées (habituellement de 0 à 10°C) (Sutra *et al.*, 1998). La croissance des STEC dans les aliments a été observée à des températures de l'ordre de 8°C dans des cidres de pommes non fermentés, ou à 12°C dans des salades (Vernozy-Rozand et Montet, 2005).

VII.3 Congélation

On ne connaît que peu d'éléments concernant l'effet de la congélation sur *E. coli* O157 : H7 (Vernozy-Rozand et Montet, 2005). Cependant, il apparaît que cette bactérie peut survivre à des températures inférieures à -80°C dans des viandes hachées de bœuf. La destruction cellulaire est très limitée lors d'un stockage pendant 9 mois à une température de -20°C (Doyle et Schoeni, 1984).

VII.4 Acidité

Le sérotype O157 : H7 a pu être isolé dans divers produits alimentaires, qu'ils soient d'origine animale ou végétale, à pH acide tels que les produits carnés fermentés, les produits laitiers fermentés, le jus de pomme ou la mayonnaise (Sutra *et al.*, 1998). Le pH de la plupart des denrées, y compris celles obtenues après fermentations bactériennes, est donc compatible avec la survie du germe.

VII.5 Nitrites

Le nitrite de sodium (SIN 250) est traditionnellement utilisé lors de la fabrication des produits de charcuterie, et cela pour la qualité des caractères organoleptiques (couleur, goût) qu'il confère à ces derniers. Les nitrites sont des additifs réglementés, utilisés uniquement dans les produits de salaison de viandes crues ou cuites, ainsi que dans les conserves de viande. L'activité antimicrobienne du nitrite de sodium est fortement dépendante du pH. L'effet d'inhibition sur *E. coli* O157 : H7 est observé pour des pH de 5,5, et cet effet est d'autant plus élevé que la température de conservation est basse (AFSSA, 2003).

VII.6 Ionisation

L'irradiation des denrées alimentaires consiste à les exposer à l'action directe de rayonnements de haute énergie (photon de courte longueur d'onde, électrons accélérés) dans

le but d'accroître leur durée de conservation et/ou d'améliorer leurs qualités hygiéniques (Leyral et Vierling, 1997). L'effet des rayonnements ionisants sur la viabilité d'*E. coli* O157 : H7 dépend de la dose appliquée, mais aussi de la température d'application, de l'atmosphère, et du stade de croissance des cellules. Plus la température est basse, plus le sérotype O157 : H7 est résistant à l'ionisation (AFSSA, 2003).

VIII Méthodes de détection des STEC dans les aliments

Si de nombreuses méthodes sont utilisées pour la détection et la caractérisation des STEC dans les échantillons de selles au sein d'un laboratoire clinique, les méthodes disponibles en microbiologie alimentaire restent assez longues, sophistiquées et onéreuses à la fois. Cependant, la détection des STEC dans les aliments est une problématique, principalement en raison de la diversité des sérogroupes de STEC et de l'absence de caractéristiques biochimiques communes permettant de les distinguer des autres *E. coli*. Plusieurs approches ont été développées dans le but d'isoler et de détecter les STEC. Ces bactéries peuvent être présentes en faible quantité dans les aliments. Dix bactéries seraient suffisantes pour déclencher des symptômes (Bouvet et Vernozzy-Rozand, 2000). Cela explique que la mise au point de méthodes de détection se heurtent souvent à des problèmes de sensibilité. Il existe à l'heure actuelle un protocole officiel destiné à rechercher *E. coli* O157 dans les denrées alimentaires. Ceci se justifie par le fait que le sérotype O157 : H7 a été le plus incriminé dans les épidémies recensées dans le monde. C'est pourquoi un grand nombre de méthodes commercialisées permettant la détection de ce sérotype est validé AFNOR. Ces méthodes peuvent être divisées en trois catégories :

- méthodes microbiologiques basées sur les caractéristiques biochimiques des souches d'*E. coli* O157 : H7 ;
- méthodes immunologiques basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les Shiga-toxines ou l'antigène somatique des sérotypes recherchés ;
- méthodes génétiques détectant les gènes codant les Shiga-toxines ou des marqueurs associés aux sérotypes recherchés.

VIII.1 Méthodes microbiologiques

Les bactéries pathogènes dans les aliments et dans l'environnement sont généralement présentes en petit nombre et peuvent entrer en concurrence avec une flore saprophyte,

abondante dans certaines matrices alimentaires. Pour dénombrer les bactéries, l'analyse microbiologique classique des aliments nécessite une phase d'enrichissement grâce à la réalisation d'une suspension mère dans laquelle l'échantillon est généralement dilué au dixième. La deuxième étape consiste en une mise en culture sur les milieux gélosés sélectifs. Plusieurs types de milieux peuvent être utilisés, ces milieux doivent permettre au personnel de laboratoire de distinguer facilement les colonies recherchées. L'étape de confirmation consiste en la sélection de cinq colonies caractéristiques en vue de leur purification et leur caractérisation biochimique, sérologique et moléculaire.

VIII.1.1 Détection des STEC O157

Il existe à l'heure actuelle, un protocole officiel destiné à rechercher *E. coli* O157 dans les denrées alimentaires. Il s'agit de la méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157 dans les aliments (ISO 16654 :2001). Le diagnostic de contamination d'un aliment par *E. coli* O157 : H7 nécessite trois phases : l'enrichissement, la détection et la confirmation (Sutra *et al.*, 1998).

VIII.1.1.1 Enrichissement

En raison du faible nombre des cellules susceptibles d'être présentes dans l'aliment, les procédés d'enrichissement sont incontournables (Padhye et Doyle, 1992). L'enrichissement peut être réalisé classiquement en milieu liquide associé ou non à une technique de séparation- concentration (Chapman, 1995). Deux principaux types d'enrichissement ont été décrits :

a) Enrichissement non sélectif

Les bouillons fréquemment utilisés sont le bouillon nutritif trypticase- soja (TSB) (Paddock *et al.*, 2014) et l'eau peptonée tamponnée (EPT). La période de revivification est comprise entre six et sept heures à 37°C. Une durée plus longue n'est pas souhaitable puisqu'elle permet un envahissement par la flore compétitive (De Zutter et Uradzinski, 1997 ; Feng *et al.*, 2011).

b) Enrichissement sélectif

Les bouillons utilisés sont le Luria Broth (LB) qui contient du vert brillant et de la bile, le bouillon Mac Conkey et le bouillon lauryl- tryptose contenant du lauryl sulfate de sodium (Chart *et al.*, 1998). Ces bouillons permettent en général la multiplication des Entérobactéries

à la température optimale. Hormis ces milieux, il existe d'autres milieux comme le mTSB (tampon phosphate, sels biliaires, novobiocine ou acriflavine) et le mEC (modified *Escherichia coli* medium) + novobiocine (mEC + n). La novobiocine est un antibiotique actif sur de nombreuses bactéries Gram positives (Vernozy-Rozand et Monet, 2005). Ces deux milieux semblent montrer une plus grande efficacité en microbiologie alimentaire en tant que milieux d'enrichissement pour *E. coli* O157. La durée d'un enrichissement sélectif et en général de vingt-quatre heures à 37°C, exception faite pour le milieu mTSB où l'incubation est plus efficace à 42°C (Johnson *et al.*, 1995).

L'épreuve anti *E. coli* O157 : H7 de Dynabeads^R est une technique de culture rapide fondée sur l'enrichissement sélectif de la bactérie *E. coli* O157 : H7, effectuée directement à partir d'échantillons pré-enrichis au moyen de la technique de séparation immuno-magnétique (IMS) utilisée dans la norme (ISO 16654 :2001). Cette technique repose sur des microsphères en polystyrène uniformes et super paramagnétiques appelées Dynabeads, couplées à des anticorps anti O157 purifiés par affinité qui permettent de détecter directement le sérotype O157 et ainsi d'isoler sélectivement ce pathogène dans les aliments (Dynabeads, Dynal) (Wright *et al.*, 1994). Cette technique de séparation-concentration, en l'occurrence la technique de séparation immuno-magnétique (IMS) des bactéries présentant l'antigène O157, n'a pas recours aux substances inhibitrices et permet un enrichissement et une concentration rapide d'*E. coli* O157 : H7 à partir d'aliquotes d'échantillons pré-enrichis. Cependant, des résultats faux-positifs et des difficultés de mise en œuvre sur des produits alimentaires gras, comme les produits laitiers, sont rencontrés (Sutra *et al.*, 1998).

VIII.1.1.2 Détection

Environ 93 % des *E. coli* O157 : H7 ne fermentent pas le sorbitol en 24 h et sont β -glucuronidase négatives (Padhye et Doyle, 1992). Ces deux propriétés biochimiques sont utilisées afin d'isoler ce pathogène. La propriété sorbitol- est mise en évidence par l'addition à la gélose Mac Conkey du D- sorbitol sur laquelle les bactéries sorbitol + donnent des colonies roses à rouges, alors que les bactéries sorbitol- donnent des colonies blanches laiteuses. A partir de cette gélose de base qui est le Mac Conkey au sorbitol (SMAC), plusieurs autres milieux sélectifs ont été développés:

- Le milieu CT-SMAC qui en plus du sorbitol contient la céfixime et le tellurite, permettant ainsi d'augmenter la sélectivité en inhibant la croissance de la plupart des *E. coli* non O157 : H7 (Zadik *et al.*, 1993) ;
- L'activité de l'enzyme β - glucuronidase est mise en évidence par l'utilisation du milieu BCIG-SMAC (5-bromo-4chloro 3-indoxyl-B-D-glucuronide) et du milieu SMAC-MUG (4-méthyl umbellifery- β -glucuronide). Cette activité se traduit par l'apparition d'une coloration bleu-vert des colonies ou d'une fluorescence sous lampe à UV (Thompson *et al.*, 1990).

VIII.1.1.3 Confirmation

Il existe plusieurs techniques de confirmation, dont :

- La séro-agglutination qui est un test d'agglutination au sérum anti-O157 réalisé directement sur la colonie suspecte pour la présence de l'antigène somatique O157 (Feng *et al.*, 2011).
- Les tests biochimiques (Nataro *et al.*, 1998).
- La production de Stx (effet cytotoxique sur cultures de cellules Véro) (Woodward *et al.*, 2002).
- La recherche des Shiga-toxines par la technique ELISA (Woodward *et al.*, 2002).
- La recherche des gènes stx par PCR (Bai *et al.*, 2010).

VIII.1.2Détection des STEC non-O157

Les STEC non-O157 n'ont aucune propriété biochimique commune permettant leur détection sur un milieu particulier. On utilise les milieux traditionnels pour les bactéries entéropathogènes (Drigalski, Hektoen), ou bien des milieux chromogènes permettant la mise en évidence de certains sérotypes de STEC, comme le milieu CHROMagar STEC (Gouali *et al.*, 2013).

VIII.2Méthodes immunologiques

Tout comme la méthode microbiologique, les tests immunologiques de détection des STEC doivent être précédés par une phase d'enrichissement afin d'augmenter le nombre des bactéries susceptibles d'être isolées. Parmi les tests immunologiques disponibles on distingue :

- les tests conventionnels ELISA en microplaques ;
- les systèmes immunologiques en une étape ;
- les systèmes complètement automatisés.

VIII.2.1 Système ELISA (validé AOAC Official Method 996.10)

Le test ELISA permet de donner les résultats en deux heures. L'aliquote du bouillon d'enrichissement est déposée dans des puits de microplaques où sont fixés des anticorps spécifiques d'*E. coli* O157. Après une incubation et une série de lavages, un anticorps révélateur anti-O157 est ajouté par la suite pour détecter éventuellement le couple « anticorps-bactérie ». Cet anticorps est couplé à son tour à une enzyme qui permet une révélation colorimétrique (AFSSA, 2003).

VIII.2.2 Système immuno-chromatographique (validé AOAC Official Method 996.09)

Après la phase d'enrichissement qui est en général de 24 h, le système immuno-chromatographique donne un résultat en 15 minutes. C'est une méthode en « une étape » très utilisée par les industriels où les étapes de lavage-rinçage et l'addition de plusieurs réactifs ne sont pas nécessaires. Le dispositif consiste en un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex et recouverte d'anticorps spécifiques d'*E. coli* O157 : H7. Le principe consiste à placer 100 µl du bouillon d'enrichissement dans le puits destiné à l'échantillon alimentaire. La prise d'essai diffuse le long de la membrane jusqu'à la zone test contenant l'anticorps anti-O157. L'apparition d'une ligne colorée dans la fenêtre test après 10 à 20 minutes indique un résultat positif signant la présence probable d'*E. coli* O157 dans l'aliment (AFSSA, 2003).

VIII.2.3 Système automatisé (validé AFNOR 12/08-07/00)

Le principe de la méthode immunologique complètement automatisée est le même que celui d'un système ELISA. Le kit comporte deux éléments prêts à l'emploi :

- Un cône à usage unique servant à la fois de phase solide et de système de pipetage. Sa face interne est recouverte d'anticorps anti-O157.
- Une barrette contenant les solutions de lavage et révélation.

Après une phase d'enrichissement de vingt-quatre heures, une aliquote de 500 µl du bouillon d'enrichissement est placée dans la barrette et subit des cycles d'aspiration-refoulement. Ainsi les bactéries *E. coli* O157 : H7 présentes dans l'échantillon sont captées par les anticorps du cône. Les éléments restants sont éliminés grâce à plusieurs lavages. Des anticorps révélateurs anti-O157 marqués à la phosphatase alcaline, enzyme qui permet la révélation colorimétrique interprétée par l'appareil VIDAS, sont aspirés dans le cône en phase finale. Cet automate peut réaliser jusqu'à 30 analyses simultanément (Vernozy-Rozand et Montet, 2005).

VIII.3 Méthodes génétiques

Les méthodes génétiques permettent la détection des bactéries pathogènes présentes en très faible nombre dans l'aliment, et pour lesquelles l'association de plusieurs facteurs de virulence est un pré-requis pour envisager le caractère éventuellement dangereux d'un aliment (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000).

VIII.3.1 Hybridation ADN et sondes oligonucléotidiques

Le principe de la méthode repose sur la propriété qu'ont les chaînes d'acides nucléiques simple brin de ne s'hybrider qu'avec des séquences de fragments complémentaires. La possibilité de cloner les gènes *stx₁* et *stx₂* a permis de développer des sondes ADN pour détecter les STEC. Initialement, ces sondes étaient marquées avec un isotope radioactif (³⁰P ou ³⁵S). Karch et Meyer, en 1989, ont utilisé quatre oligonucléotides correspondant à quatre régions différentes du gène *stx₁* et un oligonucléotide (quarante-et-une bases) dérivé du gène *stx₂* d'une souche d'*E. coli* O157 : H7. Cette méthode d'hybridation sur colonie pourrait servir de test spécifique et sensible avec possibilité de diagnostic. Cependant, l'utilisation de sondes marquées radio-activement a posé de nombreux problèmes :

- résultats obtenus après un temps trop long ;
- temps de demi-vie court des sondes.

Mais la mise au point de sondes non radioactives marquées à la digoxigénine ou à la biotine (révélation par une réaction enzymatique colorée) a réglé les problèmes rencontrés (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000).

VIII.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'utilisation de la PCR pour détecter les STEC s'est développée ces dernières années. Grâce à cette technique, l'ADN est amplifié à un niveau suffisant même si le nombre des bactéries dans l'échantillon est très faible. Schématiquement, le principe de la PCR est le suivant :

- L'ADN double brin est dénaturé par chauffage ;
- Deux oligonucléotides utilisés par la polymérase comme amorce sont hybridés sur chacune des chaînes ; ils délimitent ainsi la portion d'ADN à amplifier ;
- La polymérase synthétise la portion complémentaire depuis l'extrémité 3'OH des amorces ;
- A partir d'une séquence d'ADN, on obtient donc deux strictement identiques ;
- Le processus est répété plusieurs dizaines de fois (jusqu'à 40 fois).

Le premier système a été mis au point par Karch et Meyer (1989) avec des amorces « dégénérées », c'est à dire un mélange de plusieurs amorces permettant d'amplifier les gènes *stx*₁ et *stx*₂. Les amplifiants obtenus étaient identifiés par hybridation avec des sondes spécifiques complémentaires d'une partie de la séquence amplifiée. Il était alors possible d'identifier les séquences de *stx*₁ et *stx*₂. Pour détecter tous les types de STEC isolés chez l'animal ou dans les aliments, Read *et al.*, (1992) ont développé une PCR avec des paires d'amorces ayant pour cible une séquence conservée des gènes *stx*₁, *stx*₂ et *stx*_{2e}. Les gènes *uidA* codant la β -glucuronidase, *eae* codant l'intimine et le gène *flic* codant la flagelline, peuvent être détectés seuls ou en combinaison avec les gènes *stx* en utilisant la PCR multiplex (China *et al.*, 1996). La PCR multiplex ainsi que la PCR en temps réel (RT-PCR) sont utilisées pour détecter et quantifier plusieurs gènes à la fois tels que : *eae*, *hlyA*, *stx*₁ et *stx*₂ (Son *et al.*, 2014 ; Jacob *et al.*, 2014).

Yu *et al.*, (2006) ont développé une PCR en temps réel qui cible le gène *rfbE* codant l'antigène somatique O157. Comme ce gène est hautement conservé et spécifique à la souche O157, cet essai permet une détection plus spécifique de ce sérotype. Une PCR en temps réel a été développée pour la détection de certains STEC non-O157 tels que : O26, O45, O103, O111, O121 et O145 (Bai *et al.*, 2012; Paddock *et al.*, 2012). Cette technique est décrite dans la norme (ISO/TS 13136:2012). Etant donné qu'il n'existe pas de milieux spécifiques à l'isolement des STEC non-O157, l'échantillon à analyser est soumis directement

à la PCR pour un screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence, que sont *eae*, *stx₁* et *stx₂*. Une fois ces gènes détectés, un second screening est effectué, pour la détection des gènes codant les marqueurs des antigènes somatiques des sérogroupes non-O157, cités précédemment. La mise en culture des bactéries constitue la dernière étape de la recherche des STEC non-O157. D'après Feng *et al.*, (2011) ainsi que Paddock *et al.*, (2014), cette méthode s'est révélée être une technique d'isolement plus efficace que la combinaison IMS/SMAC. Aussi, le screening moléculaire permet un diagnostic rapide des STEC, essentiel à la mise en œuvre rapide de mesures correctives et préventives en cas d'épidémie.

Après cette revue bibliographique relative aux STEC, nous allons aborder la partie expérimentale qui comprend deux études dans lesquelles nous décrirons les objectifs fixés, le développement du matériel et méthodes utilisés, l'interprétation et la discussion des résultats observés. Nous terminerons par une conclusion, des recommandations et des perspectives de recherche.

DEUXIEME PARTIE
ETUDE EXPERIMENTALE

Etude I : Recherche et caractérisation
des STEC 0157 isolés à partir de
carcasses ovines dans deux abattoirs de
la wilaya d'Alger

I Objectifs

Les *E. coli* O157:H7 sont considérés comme des agents zoonotiques émergents, connus pour être potentiellement hautement pathogènes. Ils sont à l'origine de l'éclosion de nombreuses épidémies d'origine alimentaire à travers le monde. Les personnes à risque, comme les enfants, les personnes âgées ainsi que les sujets immunodéprimés, sont les premières victimes de ces toxi-infections. Les séquelles engendrées par les STEC (insuffisance rénale chronique), ainsi que le nombre de décès enregistrés, témoignent de la virulence de ces pathogènes.

La principale cause des infections à *E. coli* O157:H7, est la consommation de viande insuffisamment cuite contaminée par les matières fécales des ruminants. Cette contamination peut survenir à l'abattoir lorsque l'hygiène de l'abattage n'est pas maîtrisée, notamment lors des étapes de dépouillement et d'éviscération. L'étude réalisée sur la contamination des carcasses bovines par *E. coli* O157:H7 par Chahed *et al.* (2006) a révélé une prévalence de 7,8 %. Ceci prouve que les bovins élevés en Algérie sont porteurs de STEC. Qu'en est-il pour le cheptel ovin, exploité majoritairement pour la production de viande? C'est cet aspect de l'épidémiologie peu étudié qui nous a incités à entreprendre ce travail.

Pour atteindre l'objectif visé, des prélèvements à partir de carcasses ovines produites dans deux abattoirs de la wilaya d'Alger ont été effectués.

Cette étude a concerné :

- La recherche et l'isolement des STEC du sérotype O157 par la technique de séparation immuno-magnétique [IMS] (ISO EN 16654 :2001) ;
- La confirmation sérologique des isolats identifiés par la technique d'agglutination en latex ;
- La caractérisation phénotypique des isolats identifiés ;
- La caractérisation moléculaire des *E. coli* O157:H7 isolés par la détection des gènes codant pour les facteurs de virulence par amplification génique (PCR) ;
- L'étude de la sensibilité des *E. coli* O157:H7 isolés à certains antibiotiques.

II Matériel et méthodes

Le protocole de recherche des bactéries pathogènes dans les aliments, et plus précisément des STEC pathogènes, repose sur quatre grandes étapes : la prise d'essai ou échantillonnage, l'enrichissement (phase pendant laquelle les bactéries cibles vont se multiplier), la détection et enfin la confirmation (étape essentielle si la présence de la bactérie est suspectée).

II.1 Recherche des STEC O157 par séparation immuno-magnétique (IMS), norme ISO EN 16654

La recherche d'*E. coli* O157 : H7 a été réalisée à partir d'échantillons prélevés au sein de deux abattoirs de la wilaya d'Alger, l'abattoir de Rouiba et celui d'El-Harrach. Les animaux qui y sont abattus proviennent de différents marchés de bétail du centre de l'Algérie. Dans ces deux abattoirs des moyennes respectives de vingt-sept mille et de quarante-huit mille ovins sont abattus chaque année. Ces deux abattoirs approvisionnent une partie de la population du centre du pays en viande fraîche ovine. Cinq à dix carcasses ont été écouvillonnées au hasard, une fois par semaine, sur une période de six mois. Ces prélèvements ont été réalisés sur des carcasses ovines suspendues, après les opérations de saignée, d'habillage, d'éviscération et de fente thoracique. Le nombre total des échantillons s'est élevé à cent cinquante-et-un : cent provenaient de l'abattoir d'El-Harrach, et cinquante-et-un de celui de Rouiba.

II.1.1 Méthode d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé sur des carcasses ovines suspendues, après les diverses opérations préparatoires usuelles, selon une méthode non destructive reposant sur le double écouvillonnage (humide/sec) des surfaces des carcasses, décrite dans la norme (ISO 17604 :2003). Pour chaque carcasse ovine, quatre zones de 100 cm² chacune, situées au niveau de la zone postéro-externe de la cuisse, du flanc, du gros bout de la poitrine et de la face postérieure des membres antérieurs, ont été écouvillonnées. Ces sites sont considérés comme les plus représentatifs de la contamination fécale des carcasses lors des différentes opérations d'abattage. La contamination de la zone postéro-externe de la cuisse peut survenir lors de la réalisation des opérations d'habillage (enlèvement de la peau). Le choix de l'écouvillonnage du flanc repose sur le risque de la contamination de cette zone lors de l'habillage et de l'éviscération de la carcasse. La contamination du gros bout de la poitrine, peut survenir lors de l'habillage, de la fente ou l'éviscération de la carcasse. Enfin, l'habillage de la carcasse ainsi que les différentes manipulations peuvent être à l'origine de la contamination de la face postérieure des membres antérieurs, d'où le choix de ce site pour

écouvillonnage. Les figures (8, 9, 10 et 11) montrent les zones écouvillonnées après les étapes d'habillage, d'éviscération et de fente thoracique.



Figure 8 : Membre postéro-externe du gigot raccourci (zone A) (Photo personnelle)



Figure 9 : Carré filet (zone B) (Photo personnelle)



Figure 10 : Région du sternum (zone C) (Photo personnelle)



Figure 11 : Face postérieure du membre antérieur (zone D) (Photo personnelle)

→ **Mode opératoire**

La technique du double écouvillonnage est réalisée à l'aide d'écouvillons, qui sont des disques de coton cosmétiques exempts de substances inhibitrices. Les disques de coton cosmétiques ont été stérilisés à 121°C pendant 20 minutes. Huit disques ont été utilisés pour chaque demi-carcasse à raison de deux disques par site écouvillonné. Afin d'éviter les contaminations croisées entre les carcasses écouvillonnées, des gants à usage unique ont servi à la réalisation de chaque échantillon.

La technique du double écouvillonnage a été réalisée selon la procédure suivante :

- 1 -Pour chaque zone, un disque stérile a été imbibé avec une solution stérile de TSE (eau tryptone sel, pH : 7);
- 2 - La zone de la carcasse délimitée (100 cm²) a été frottée avec ce disque humidifié en exerçant une pression aussi forte que possible, d'abord verticalement puis horizontalement et enfin en diagonale, et ce pendant 20 secondes ;
- 3 -La même opération a été répétée sur la même zone, mais cette fois-ci avec un disque sec ;
- 4 - Les huit disques utilisés pour les 4 zones ont été placés dans un même sac stomacher pour constituer un seul échantillon. Ce sac a été fermé de façon étanche,
- 5 - Les informations relatives aux carcasses écouvillonnées (date, numéro, abattoir) ont été inscrites sur chaque sac ;
- 6 - Les échantillons ont été acheminés vers le laboratoire dans une enceinte réfrigérée à +4°C, puis conservés à +4°C jusqu'à leur analyse qui a été effectuée dans les 24 heures suivantes.

II.1.2 Lieux du traitement des échantillons

Le traitement des échantillons (enrichissement, isolement et confirmation) a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire. La détection des gènes codant pour les facteurs de virulence à partir des bactéries isolées a été obtenue par amplification génique des gènes *eae*, *stx₁* et *stx₂* qui codent respectivement les facteurs de virulence suivants : l'intimine et les Shiga-toxines de type 1 et de type 2. Une partie des bactéries isolées a été confirmée au niveau du laboratoire national de référence en microbiologie des denrées alimentaires de l'Université de Liège pour les gènes *stx₁*, *stx₂* et *eae*. L'autre partie des bactéries isolées a été confirmée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA), pour les mêmes gènes de virulence. La sensibilité des STEC O157 aux antibiotiques a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie médicale, antibiothérapie et hygiène hospitalière de l'Institut Pasteur d'Alger.

II.1.3 Equipements

Les équipements utilisés sont décrits en annexe 1.

II.1.4 Milieux de culture et réactifs

Les milieux de culture ainsi que les réactifs utilisés sont décrits en annexe 1.

II.2. Méthodes d'analyses

Les analyses effectuées lors de la présente étude ont compris la recherche des STEC du séro groupe O157 par la technique de séparation immuno-magnétique, la confirmation sérologique, phénotypique et génotypique des isolats identifiés, ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques.

II.2.1. Recherche des STEC du séro groupe O157

Comme toutes les bactéries isolées de denrées alimentaires, la recherche d'*E. coli* O157 : H7 nécessite une étape d'enrichissement, une étape d'isolement et une étape de confirmation (figure 16).

II.2.1.1 Enrichissement non sélectif

L'enrichissement est une étape importante lors de la détection de micro-organismes dans les aliments. La plupart des méthodes de détection utilisées à l'heure actuelle pour la recherche des STEC nécessitent cette étape, étant donné les faibles taux de ces pathogènes retrouvés dans les échantillons. L'étape d'enrichissement consiste à prélever une certaine quantité d'échantillon auquel est ajouté un bouillon d'enrichissement, sélectif ou non. Ce mélange est ensuite incubé à la température appropriée à la croissance des bactéries cibles pendant la durée nécessaire. Cette étape permet de favoriser la croissance de la bactérie recherchée tout en limitant au maximum le développement de la flore annexe. Elle a aussi pour principal objectif d'éviter les faux résultats négatifs. Pour cette étude, un enrichissement non sélectif, a été réalisé selon les étapes suivantes :

1. Ajout de 100 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) dans chaque sac stomacher contenant les écouvillons ;
2. Homogénéisation de l'échantillon au moyen du stomacher péristaltique à 250 cycles pendant deux minutes ;
3. Incubation de l'échantillon homogénéisé à l'étuve à une température de 37°C pendant 6 heures.

II.2.1.2 Immuno-concentration par la technique de séparation immuno-magnétique (IMS) ISO EN 16654

La séparation immuno-magnétique (IMS) est une méthode qui utilise des particules paramagnétiques couvertes d'anticorps spécifiques à la bactérie cible, ajoutées à l'échantillon de l'aliment à analyser. La bactérie cible est capturée à la surface des particules magnétiques et l'ensemble est retiré de l'échantillon par application d'un aimant. Les bactéries cibles sont ensuite séparées par centrifugation des débris alimentaires et des micro-organismes, qui peuvent interférer avec les différents systèmes de détection. Cette technique permet donc d'extraire et/ou de concentrer la bactérie cible du bouillon d'enrichissement. Les figures 12 et 13, montrent le dispositif de rotation (DynaL simple Mixer) et le portoir muni d'une paroi à aimant concentrateur chargé d'eyendorfs (DynaL MPC- M) utilisés dans l'épreuve de l'IMS.



Figure 12 . Dynal simple Mixer
(Photo personnelle)



Figure 13 . Dynal MPC- M
(Photo personnelle)

→ **Mode opératoire**

1. Chargement du Dynal MPC –M d'éppendorfs (maximum 10) ;
2. Numérotation des eppendorfs en fonction du nombre d'échantillons à traiter ;
3. Transfert de façon stérile de 15 μ l de Dynabeads anti-*E. coli* O157 dans chaque eppendorf ;
4. Ajout de 1 ml de la suspension mère pré-enrichie à 37°C dans chaque eppendorf, puis mélange à l'aide du vortex ;
5. Mise en place des eppendorfs dans le Dynal simple Mixer, qu'on laisse tourner à 20 tours/minute pendant 30 minutes pour une bonne homogénéisation ;
6. Mise en place une seconde fois des eppendorfs dans le Dynal MPC- M qu'on remue pendant 2 à 3 minutes jusqu'à ce qu'une tache brune (concentration des bactéries) se forme sur la paroi des eppendorfs ;
7. Vidange de façon aseptique du contenu des eppendorfs sans léser la tache formée, puis ajout de 1 ml du tampon de lavage PBS-Tween, puis bien mélanger au vortex ;
8. Seconde agitation du Dynal MPC-M pendant 2 à 3 minutes, jusqu'à nouvelle concentration des bactéries, puis élimination du contenu ;
9. Répétition de la même opération (étapes 6 à 8) avec le tampon de lavage ;
10. Retrait de la paroi à aimant du Dynal MPC-M et rajout dans chaque eppendorf de 100 μ l de PBS-Tween, puis mélange au vortex. Un complexe billes-bactéries est alors obtenu.

II.2.1.3 Isolement des *E. coli* O157

→ Mode opératoire

1. Prélèvement de façon stérile les 100µl du complexe billes-bactéries et étalement sur la gélose Mac Conkey au sorbitol additionnée de tellurite et cefixime (CT-SMAC) ;
2. Incubation des boîtes à l'étuve à 42°C pendant 18 heures.

→ Lecture des boîtes

Après incubation, deux types de colonies peuvent être obtenues: des colonies rouges indiquant la fermentation du sorbitol (figure 18), et des colonies blanches laiteuses sorbitol négatives (figure 17). Sachant que 93 % des *E. coli* O157 sont sorbitol négatifs (Padhye et Doyle, 1992), 4 à 5 colonies blanches, et 1 à 2 colonies rouges ont été prélevées de chaque boîte et soumises au test d'agglutination au latex anti-O157.

II.2.1.4 Confirmation des colonies suspectes

Cette étape est indispensable pour attribuer les bactéries isolées au séro groupe O157.

a) Test d'agglutination au latex anti- O157

Ce test met en évidence les souches d'*E. coli*, ou d'autres espèces de bactéries possédant l'antigène O157, par agglutination de particules de latex anti-O157, sur une lame (Dry Spot *E. coli* O157). A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une goutte d'eau distillée est déposée au niveau d'un petit cercle destiné à l'agglutination, puis une partie de la colonie suspecte est prélevée avec une anse de platine stérile et mélangée à la goutte d'eau distillée. Le mélange est mis en contact avec les particules de latex anti-O157. Le test est considéré positif s'il y'a formation d'agglutinats. Le test d'agglutination au latex anti-O157 est représenté dans la figure 14.

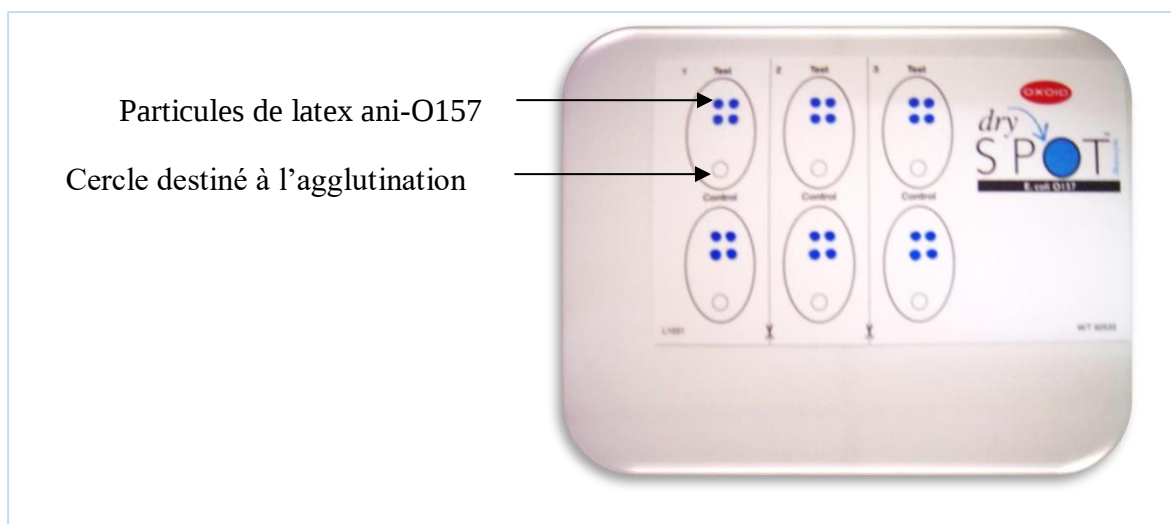


Figure 14. Test d'agglutination au latex anti-O157 (Photo personnelle)

b) Test d'agglutination à l'antisérum H7

La mise en évidence de la présence de l'antigène flagellaire H7 est assurée par l'utilisation de l'antisérum H7. Sur une lame en verre, une goutte de l'antisérum H7 est déposée, puis mélangée avec la colonie à tester. Une agglutination en moins d'une minute signe un résultat positif (figure 21).

c) Mise en évidence de l'activité β -glucuronidase

Le milieu utilisé est le milieu chromogène Rapid *E. coli* 2 validé AFNOR (ISO 16140). Son principe repose sur la mise en évidence d'une activité enzymatique β -D-glucuronidasique (GLUC) d'*E. coli* par la présence d'un substrat chromogénique spécifique à l'enzyme. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les colonies d'*E. coli* β -glucuronidase positives apparaissent violettes (figure 19).

d) Caractérisation phénotypique

La confirmation de l'appartenance des isolats identifiés à l'espèce *E. coli*, par leur caractérisation biochimique, a été réalisée à l'aide de la galerie API 20^E.

II.2.2 Détection des gènes codant pour les facteurs de virulence des STEC O157 : H7 par amplification génique (PCR)

L'amplification génique, réalisée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA), a été effectuée par PCR simplex pour la détection des gènes *stx*₁, *stx*₂ et *eae*.

II.2.2.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN s'est faite par ébullition selon le protocole de China *et al.* (2006), en suivant les étapes suivantes :

1. Prise d'une colonie purifiée de chaque isolat d'*E. coli* O157 : H7 à tester pour la faire pousser dans du BHIB (bouillon cœur-cerveille) sous agitation à 37°C pendant 18 heures ;
2. Répartition de 300 µl du bouillon dans des eppendorfs, puis centrifugation à 4 500 tours/minute ;
3. Récupération du culot pour y ajouter 50 µl d'eau distillée stérile, ensuite chauffage à 100°C pendant 10 minutes ;
4. Centrifugation pour une seconde fois dans une mini-centrifugeuse pendant 30 secondes afin de récupérer le surnageant contenant l'ADN et le transférer dans des tubes pour PCR.

II.2.2.2 Préparation des mix pour la détection des gènes

Les séquences des amorces utilisées dans cette étude, ainsi que leur taille et leur température d'hybridation, sont rapportées dans le tableau 8.

Tableau 8. Paires d'amorces utilisées dans cette étude

Gène	Amorce et séquence (China <i>et al.</i> , 1996)	Taille du produit de la PCR (pb)	Température optimale de l'hybridation (°C)
<i>Eae</i>	B52, AGGCTTCGTCACAGTTG B53, CCATCGTCACCAGAGGA	570	51,9
<i>stx</i> ₁	B54, AGAGCGATGTTACGGTTTG B55, TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	52 ,9
<i>stx</i> ₂	B56, TGGGTTTTTCTTCGGTATC B57, GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	53,4

eae : gène codant l'intimine ; *stx*₁ : gène codant la Shiga-toxine de type 1 ; *stx*₂ : gène codant la Shiga-toxine de type 2 ; pb : paire de base.

a) Préparation du mix 1 pour la détection du gène *eae*

Transférer 5 µl du surnageant (ADN bactérien extrait) dans un tube pour PCR ; puis ajouter :

- 2 µl de MgCl₂ (25 mM) ;
- 2,5 µl de dNTP (2 mM) ;
- 5µl du tampon 5x Flexi Buffer (pH : 8,8) ;
- 2,5 µl de l'amorce B52 (10 µM) ;
- 2,5 µl de l'amorce B53 (10 µM) ;
- 0,5 µl de Taq polymérase (Go taq Flexi DNA polymérase) (5U/ µl) ;
- 30 µl d'eau pure stérile.

b) Préparation du mix 2 pour la détection du gène *stx₁*

Transférer 5 µl du surnageant (ADN bactérien extrait) dans un tube pour PCR ; puis ajouter :

- 2 µl de MgCl₂ (25 mM) ;
- 2,5 µl de dNTP (2 mM) ;
- 5µl du tampon 5x Flexi Buffer (pH : 8,8) ;
- 2,5 µl de l'amorce B54 (10 µM) ;
- 2,5 µl de l'amorce B55 (10 µM) ;
- 0,5 µl de Taq polymérase (Go taq Flexi DNA polymérase) (5U/ µl) ;
- 30 µl d'eau pure stérile.

c) Préparation du mix 3 pour la détection du gène *stx₂*

Transférer 5 µl du surnageant (ADN bactérien extrait) dans un tube pour PCR ; puis ajouter :

- 2 µl de MgCl₂ (25 mM) ;
- 2,5 µl de dNTP (2 mM) ;
- 5µl du tampon 5x Flexi Buffer (pH : 8,8) ;
- 2,5 µl de l'amorce B56 (10 µM) ;
- 2,5 µl de l'amorce B57 (10 µM) ;
- 0,5 µl de Taq polymérase (Go taq Flexi DNA polymérase) (5U/ µl) ;
- 30 µl d'eau pure stérile.

d) Conditions d'amplification des gènes *eae*, *stx₁* et *stx₂* par PCR

Les tubes pour PCR ont été placés dans un thermocycleur réglé pour les temps suivants (China *et al.*, 1996):

dénaturation à 94°C : 5 minutes ;	
dénaturation à 94°C : 30 secondes ;	} 30 cycles
hybridation à 50°C : 30 secondes ;	
elongation à 72°C : 30 secondes.	

e) Détection des produits d'amplification

La détection du produit d'amplification s'est fait par migration en électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (figure 15) selon le mode opératoire suivant :

1. 2 g d'agarose ont été dissous dans 100 ml de TBE (Tris, Borate, EDTA) à pH 8,8 puis chauffés au micro-ondes. Après refroidissement 12 µl de BET (bromure d'éthidium) ont été ajoutés à 10 mg/ml ;
2. Les deux extrémités du moule ont été obturés avec du ruban adhésif ;
3. Le peigne nécessaire à la réalisation des puits dans le gel a été disposé dans les encoches prévues à cet effet ;
4. Le gel préparé a été versé lentement dans le moule ;
5. Après solidification du gel, le peigne a été enlevé délicatement ;
6. Le gel a été démoulu et placé dans la cuve, après quoi cette dernière a été remplie de tampon TBE jusqu'au niveau supérieur du gel ;
7. Les puits ont été placés du côté de la cathode ;
8. 5 µl des produits d'amplification, les souches à tester plus les souches témoins ont été placés dans chaque puits. L'un des puits a été réservé au marqueur de taille moléculaire 100 pb ;
9. Les fragments d'ADN, placés dans un champ électrique et chargés négativement, vont ainsi se déplacer vers l'anode dès la mise en marche de l'appareil ;
10. La séparation s'est faite sur la base des poids moléculaires des fragments, chaque bande correspondant à un fragment de taille précise ;
11. Les bandes ont été visualisées dans une chambre noire par transillumination ultraviolette (302 nm). Les profils obtenus ont été photographiés et comparés par rapport aux

souches témoins. Une souche ayant le même profil que celui de la souche témoin a été considérée comme porteuse du gène recherché.

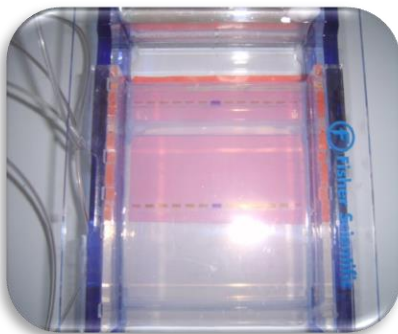


Figure 15. Migration des bandes d'ADN sur l'électrophorèse sur gel

II.2.3 Test de sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des *E. coli* O157 : H7 isolés a été testée à 32 antibiotiques appartenant aux différentes classes (voir la liste en annexe 1), selon les normes (NCCLS : 1993) (National Committee for Clinical Laboratory Standards) recommandées par l'OMS. Le protocole suivant a été appliqué :

1. A partir d'une culture pure de 18 heures sur gélose nutritive, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été raclées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ;
2. La pipette a été déchargée dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 % ;
3. La suspension bactérienne a été bien homogénéisée, jusqu'à ce que son opacité eut atteint 0,5 Mc Farland ;
4. Un écouvillon stérile a été trempé dans la suspension bactérienne ;
5. L'écouvillon a été pressé contre la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum ;
6. L'écouvillon a été frotté sur la totalité de la surface gélosée Mueller Hinton, en tournant la boîte (12 cm) à chaque fois ;
7. Les disques d'antibiotiques ont été placés sur la géloseensemencée à l'aide d'un applicateur dédié ;
8. Les boîtes ont été incubées à 35°C pendant 18 heures ;
9. Le contrôle de qualité a été réalisé à l'aide de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à l'ensemble des antibiotiques testés) pour valider les résultats.

→ Lecture des boîtes

La lecture des boîtes a été réalisée à l'aide d'un appareil spécial « Osiris », qui mesure les zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les antibiotiques et les compare aux valeurs critiques, et par conséquent classe les bactéries en sensibles, intermédiaires ou résistantes. Les différentes étapes de recherche d'*E. coli* O157 : H7 sont schématisées dans la figure 16.

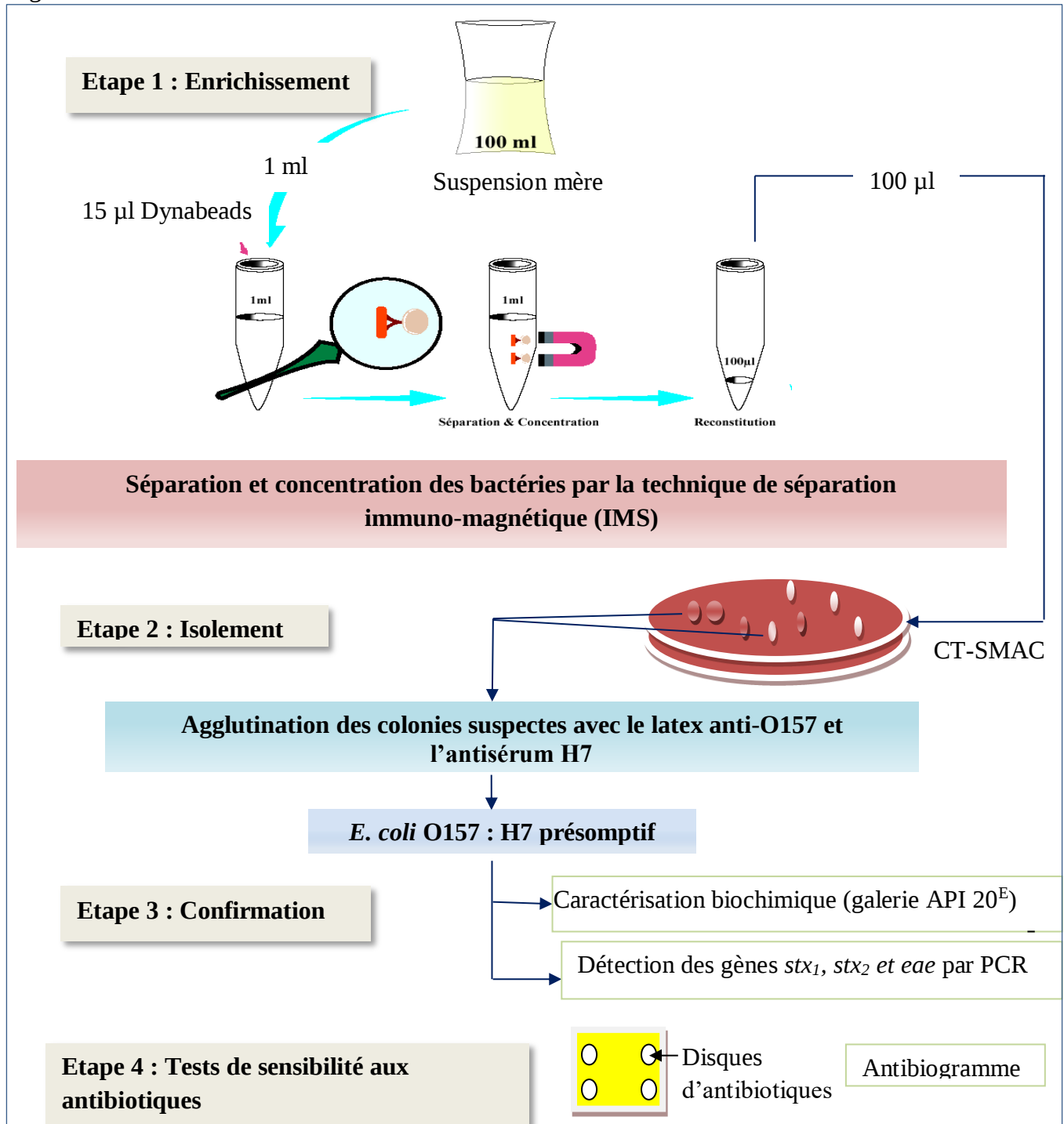


Figure 16. Protocole de recherche d'*E. coli* O157 : H7

II.2.4 Analyse statistique

Les résultats obtenus sont essentiellement exprimés en pourcentage et donnés avec un intervalle de confiance à 95%. Le test khi² a été utilisé pour la comparaison entre les pourcentages. Le test est considéré significatif lorsque le *P* est inférieur à 0,05.

III Résultats

Les résultats de la recherche, la caractérisation, ainsi que la sensibilité des *E. coli* O157 : H7 aux antibiotiques sont rapportés ci-dessous.

III.1 Isolement des *E. coli* O157 :H7

Les épreuves de séparation immuno-magnétique, les tests d'agglutination au latex anti-O157 et à l'antisérum H7, réalisés sur les 151 échantillons analysés, ont montré que onze carcasses ovines étaient contaminées par la bactérie *E. coli* O157 : H7, soit une prévalence de 7,28 %. Parmi les onze carcasses ovines contaminées par *E. coli* O157 : H7, neuf (9 %) ont été écouvillonnées au niveau de l'abattoir d'El-Harrach et deux (3,92 %), l'ont été au niveau de celui de Rouiba. L'analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus a montré qu'il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) entre le nombre de carcasses contaminées au niveau des deux abattoirs. La présence des *E. coli* O157 : H7 sur la surface des carcasses ovines a indiqué que les ovins abattus dans les deux abattoirs étaient porteurs de ces pathogènes. Comme les bonnes pratiques d'hygiène d'abattage ne sont respectées dans aucun de ces deux abattoirs, il en résulte une contamination fécale des carcasses, et par conséquent présence de ces pathogènes sur leurs surfaces.

A partir de ces onze carcasses positives, treize isolats d'*E. coli* O157 : H7 (8,60 %) ont été identifiés. Quatre isolats (7,84 %) ont été identifiés à partir de deux carcasses au niveau de l'abattoir de Rouiba, et neuf isolats (9 %), à partir de neuf carcasses issues de celui d'El Harrach. Des treize *E. coli* O157 : H7 isolés, dix (76,92 %) sont sorbitol et β -glucuronidase négatifs tandis que trois (23,08 %) sont sorbitol et β -glucuronidase positifs. Le nombre de carcasses ovines contaminées par les *E. coli* O157 : H7 au niveau des deux abattoirs (Rouiba et El-Harrach) ainsi que le nombre d'isolats identifiés sont rapportés dans le tableau 9.

Tableau 9. Nombre de carcasses ovines contaminées par *E. coli* O157 : H7 dans les deux abattoirs, ainsi que le nombre d'isolats identifiés

Abattoir	Carcasses contaminées par <i>E. coli</i> O157 : H7			<i>E. coli</i> O157 : H7 Isolés		
	Nombre	%	Intervalle de confiance (95%)	Nombre	%	Intervalle de confiance (95%)
El-Harrach	9 /100	9%	[3,39 ; 14,60]	9	9%	[0 ; 27,69]
Rouiba	2/51	3,92%	[0 ; 9,25]	4	7,84%	[0 ; 34,18]
Total	11/151	7,28%	[3,13 ; 11,42]	13	8,60%	[0 ; 23,84]

III.1.2 Aspect des colonies d'*E. coli* O157 : H7 sur gélose d'isolement

Les figures 17 et 18 montrent l'aspect des colonies d'*E. coli* O157 : H7 sorbitol négatives et positives sur gélose CT-SMAC.

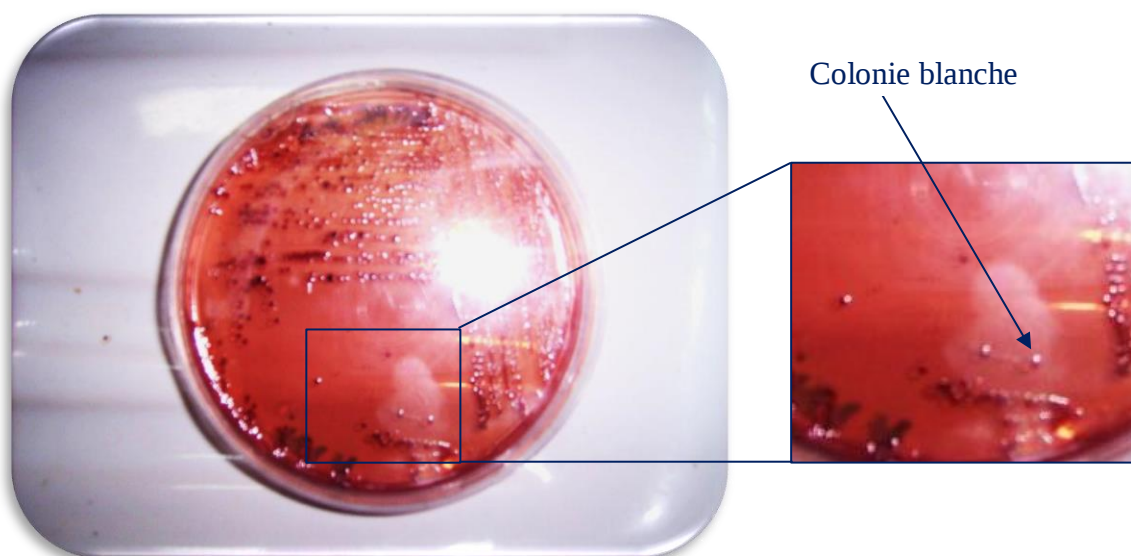


Figure 17. Colonies d'*E. coli* O157 sorbitol négatives sur le milieu CT-SMAC (Photo personnelle)

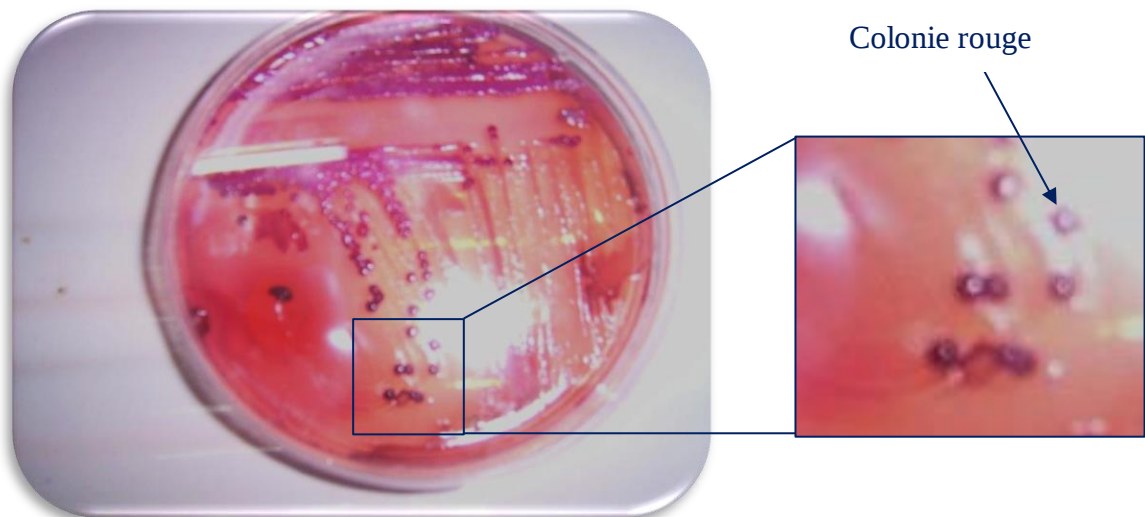


Figure 18. Colonies d'*E. coli* O157 sorbitol positives sur le milieu CT-SMAC
(Photo personnelle)

La figure 19 montre l'aspect des colonies d'*E. coli* O157 : H7 β -glucuronidase positives sur le milieu chromogène Rapid *E. coli* 2.

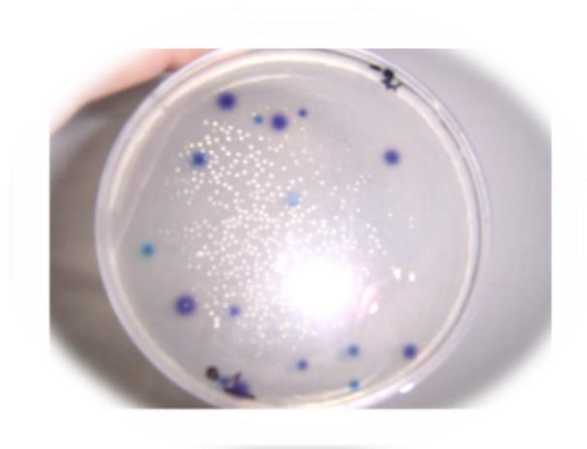


Figure 19. Colonies d'*E. coli* sur milieu Rapid *E. coli* 2
(Colonies violettes: *E. coli* β -glucuronidase positives) (Photo personnelle)

III.1.3 Aspect des tests d'agglutination

La figure 20 montre l'aspect des agglutinats sur le latex anti-O157 mettant en évidence la présence de l'antigène somatique O157.



Figure 20. Colonie agglutinant le latex anti-O157 (à gauche : réaction d'agglutination négative ; à droite : réaction d'agglutination positive)

La figure 21 montre les agglutinats formés sur la lame en présence de l'antisérum H7, témoignant la présence de l'antigène flagellaire H7.



Figure 21. Colonie agglutinant l'antisérum H7 (Photo personnelle)

L'identification phénotypique et sérologique des *E. coli* O157 : H7 isolées est rapportée dans le tableau 10.

Tableau 10. Identification phénotypique et sérologique des *E. coli* O157 : H7 isolés à partir des carcasses ovines au niveau des deux abattoirs

Nombre des échantillons positifs	Bactériologie				Sérologie		Ifentification
	Milieu	Isolat	Sorbitol	β-glucuronidase	Latex anti-O157	Antisérums H7-	Phénotype
1	CT –SMAC	1	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
		2	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
2	CT –SMAC	3	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
		4	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
3	CT –SMAC	5	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
4	CT –SMAC	6	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
5	CT –SMAC	7	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
6	CT –SMAC	8	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
7	CT –SMAC	9	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
8	CT –SMAC	10	Négatif	Négatif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype3
9	CT –SMAC	11	Positif	Positif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
10	CT –SMAC	12	Positif	Positif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1
11	CT –SMAC	13	Positif	Positif	Positif	Positif	<i>E. coli</i> biotype1

III.2 Détection des gènes codant pour les facteurs de virulence des *E. coli* O157 : H7 isolés par PCR

Les résultats de la caractérisation génotypique des *E. coli* O157 : H7 isolés à partir de chaque carcasse ainsi que le profil génotypique de l'ensemble des *E. coli* O157 : H7 isolés sont développés ci-dessous.

III.2.1 Caractérisation génotypique des *E. coli* O157 : H7 isolés à partir de chaque carcasse

Six *E. coli* O157 :H7 sur les treize isolés ont été confirmées au niveau de la Faculté de Liège. Parmi eux, deux ont été isolés à partir d'une même carcasse et présentaient un profil génotypique différent, $stx_2^+ eae^+$ pour le premier (isolat 1), et $stx_1^+ eae^+$ pour le second (isolat 2). Deux autres isolats, les 3 et 4, provenant eux aussi d'une même carcasse, présentaient un profil génotypique différent : $stx_2^+ eae^+$ pour le premier (isolat 3) et eae^+ pour le second (isolat 4). Quant aux deux isolats restants, les 5 et 6, ils ont été isolés à partir de deux carcasses différentes, avec le même génotype $stx_2^+ eae^+$. Sept *E. coli* O157 : H7 sur les treize isolés, ont été confirmées au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger. Les isolats 7, 9 et 10 possédaient le gène eae et stx_2 , alors que les isolats 8, 11 et 12 possédaient uniquement le gène stx_2 . L'isolat 13 quant à lui ne possédait aucun gène codant pour les facteurs de virulence. Les caractères génotypiques des *E. coli* O157 : H7 isolés par carcasse sont rapportés dans le tableau 11.

Tableau 11. Caractère génotypique des *E. coli* O157: H7 isolés à partir de chaque carcasse prélevée

N° carcasse ovine	Isolat	Génotype	Laboratoire de confirmation
1	1	$stx_2 eae$	Faculté de Liège
	2	$stx_1 eae$	Faculté de Liège
2	3	$stx_2 eae$	Faculté de Liège
	4	eae	Faculté de Liège
3	5	$stx_2 eae$	Faculté de Liège
4	6	$stx_2 eae$	Faculté de Liège
5	7	$stx_2 eae$	Institut Pasteur d'Alger
6	8	stx_2	Institut Pasteur d'Alger
7	9	$stx_2 eae$	Institut Pasteur d'Alger
8	10	$stx_2 eae$	Institut Pasteur d'Alger
9	11	stx_2	Institut Pasteur d'Alger
10	12	stx_2	Institut Pasteur d'Alger
11	13	-	Institut Pasteur d'Alger

- : aucun gène détecté.

La figure 22, montre les différentes bandes d'ADN correspondant chacune à la taille du gène recherché.

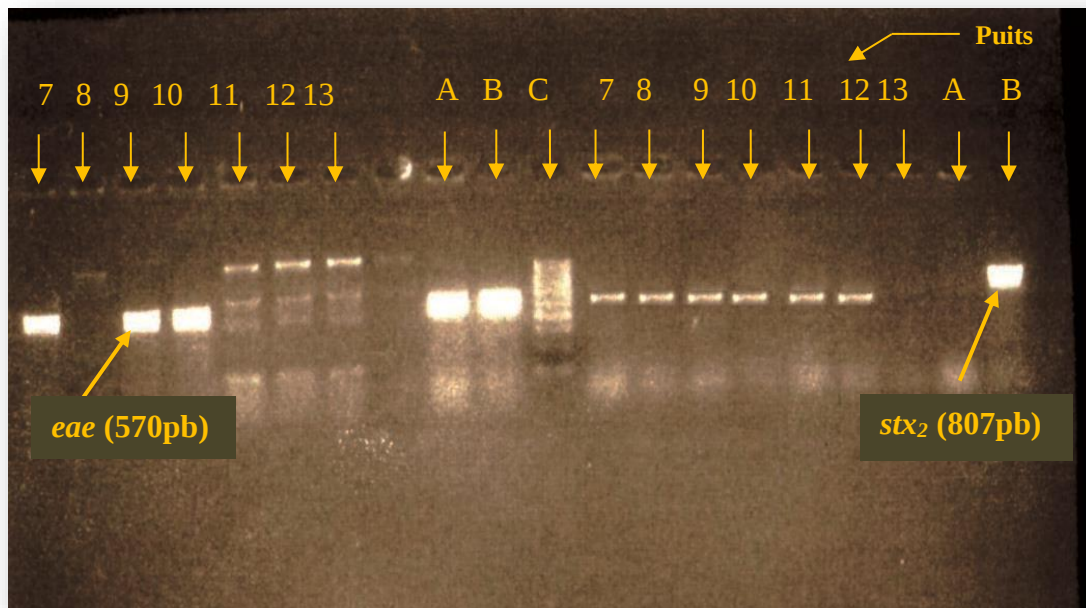


Figure 22. Visualisation des gènes *eae* et *stx₂* des *E. coli* O157: H7 après PCR par transillumination (Photo personnelle)

Dans la figure 22, les numéros des isolats 7 à 13 correspondent à des isolats dont la caractérisation moléculaire a été effectuée au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger. On peut également distinguer de gauche à droite les puits suivants :

- Puits A, souche témoin positive portant le gène *eae* ($eae^+ stx_2^-$).
- Puits B, souche témoin positive portant le gène *eae* ($eae^+ stx_2^+$).
- Puits C, marqueur de taille (100 pb).
- Puits A, souche témoin négative ne portant pas le gène *stx₂* ($eae^+ stx_2^-$).
- Puits B, souche témoin positive portant le gène *stx₂* ($eae^+ stx_2^+$).

III.2.2 Profil génotypique de l'ensemble des *E. coli* O157 : H7 isolés

Au total, treize isolats *E. coli* O157 : H7 ont été identifiés. Sept (53,85 %) étaient *stx*₂⁺ *eae*⁺, un (7,69 %) *stx*₁⁺ *eae*⁺, trois (23,08 %) *stx*₂⁺ et un (7,69 %) *eae*⁺. Seul un isolat (7,69 %) ne possédait aucun gène codant pour les facteurs de virulence. La caractérisation génotypique des *E. coli* O157 : H7 isolés est présentée dans le tableau 12.

Tableau 12. Caractérisation génotypique des *E. coli* O157: H7 isolés

Nombre d' <i>E. coli</i> O157 : H7 isolés	<i>eae</i>	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	Pourcentage des gènes isolés	Intervalle de confiance à 95%
7	+	-	+	53.85%	[26,75 ; 80,94]
3	-	-	+	23.08%	[0,175 ; 45,98]
1	+	+	-	7.69%	[0 ; 22,17]
1	+	-	-	7.69%	[0 ; 22,17]
1	-	-	-	7,69%	[0 ; 22,17]

+ : positif ; - : négatif.

La caractérisation génotypique des *E. coli* O157 : H7 isolés est illustrée par la figure 23.

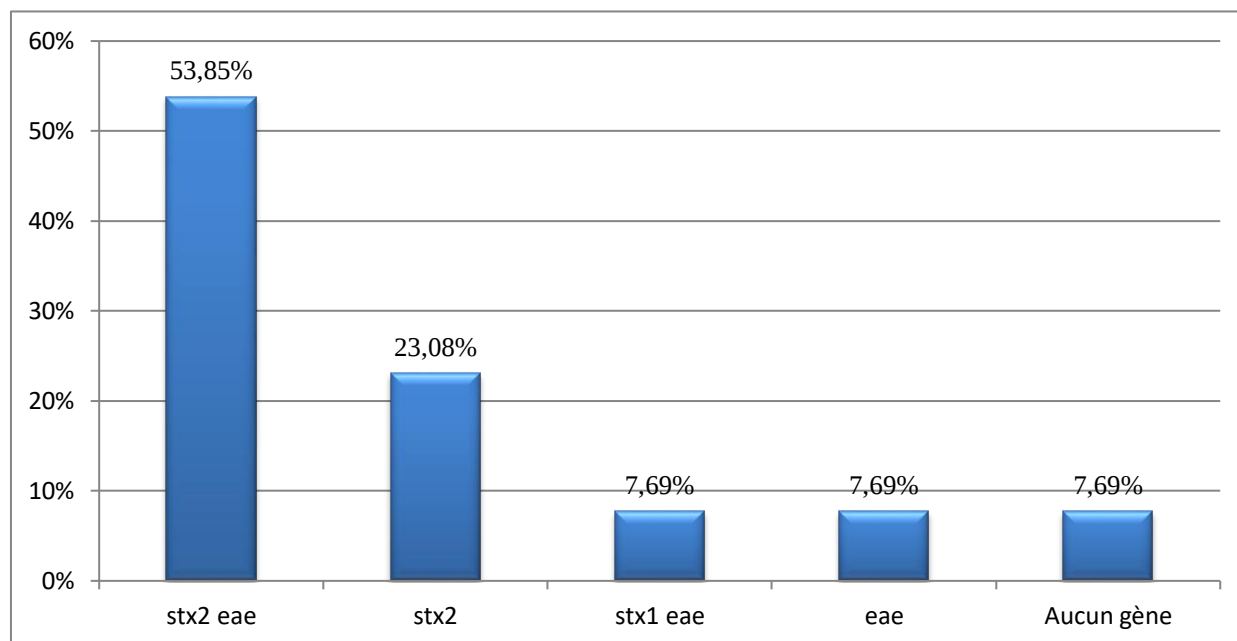


Figure 23. Taux des gènes identifiés à partir des *E. coli* O157 :H7 isolés

III.3 Test de sensibilité aux antibiotiques

Des treize isolats d'*E. coli* O157 : H7 identifiés, trois (23,08%) sont résistants à la tétracycline, un (7,69%) aux furanes et un (7,69%) à la fois aux furanes et à la tétracycline. Huit (61.54%) sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Sur la figure 24 on peut observer les zones d'inhibitions de la croissance bactérienne due à la diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Mueller Hinton.



Figure 24. AntibioGramme (Photo personnelle)

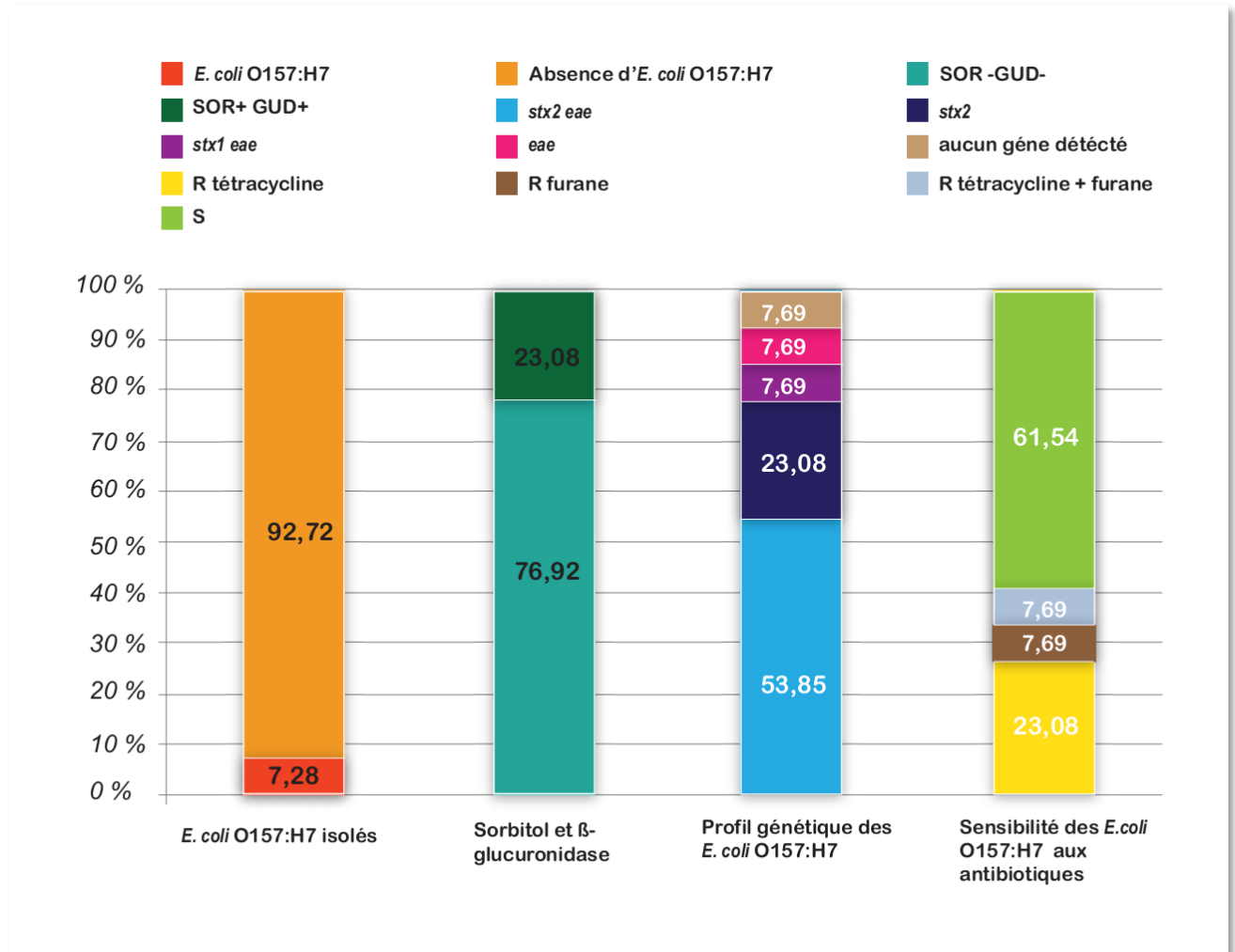
La caractérisation des *E. coli* O157 : H7 isolés, ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques sont rapportées dans le tableau 13.

Tableau 13. Caractérisation et sensibilité aux antibiotiques des *E. coli* O157: H7 isolés

Isolat	Sérotype	Sorbitol et β -glucuronidase	Génotype	Antibiorésistance	Abattoir
1	O157 : H7	-	<i>stx₂ eae</i>	S	Rouiba
2	O157 : H7	-	<i>stx₁ eae</i>	R tétracycline	
3	O157 : H7	-	<i>stx₂ eae</i>	S	
4	O157 : H7	-	<i>eae</i>	R tétracycline	
5	O157 : H7	-	<i>stx₂ eae</i>	S	El-Harrach
6	O157 : H7	-	<i>stx₂ eae</i>	S	El-Harrach
7	O157 : H7	-	<i>stx₂ eae</i>	R furane	El-Harrach
8	O157 : H7	-	<i>stx₂</i>	R tétracycline	El-Harrach
9	O157 : H7	-	<i>stx₂ eae</i>	R tétracycline R furane	El-Harrach
10	O157 : H7	-	<i>stx₂ eae</i>	S	El-Harrach
11	O157 : H7	+	<i>stx₂</i>	S	El-Harrach
12	O157 : H7	+	<i>stx₂</i>	S	El-Harrach
13	O157 : H7	+	—	S	El-Harrach

- : négatif ; + : positif ; R : résistante ; S : sensible.

La caractérisation phénotypique et génotypique ainsi que la sensibilité des *E. coli* O157 : H7 aux antibiotiques sont illustrées par la figure 25.



SOR: sorbitol; GUD: β -glucuronidase, S: sensible; R : résistant ; +: positif, -: négatif.

Figure 25. Caractérisation phénotypique et génotypique des *E. coli* O157 : H7 isolés, ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques

Etude II : Recherche et caractérisation
des *STEC* 0157 et non-0157 à partir des
carcasses ovines

I Objectifs

Les résultats de la première étude relative à la recherche et à l'isolement des STEC O157 ont montré que 7,28 % des carcasses ovines étaient contaminées par ces agents pathogènes extrêmement virulents. D'après ces résultats, on constate que le risque de toxi-infections alimentaires dues au sérotype O157 : H7 existe réellement en Algérie, où la viande ovine est très prisée. Hormis le sérotype O157, il existe d'autres STEC potentiellement pathogènes pour l'homme, tels que le O26 qui est le plus fréquemment rencontré lors d'infections à STEC non- O157, et le O111 qui est considéré comme le deuxième agent responsable des cas de SHU après O157 : H7 (Eklund *et al.*, 2001). Dans le cadre de ce travail, et afin d'avoir une meilleure appréciation de la situation des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en Algérie, une deuxième étude a été entreprise pour rechercher à la fois les STEC O157 et non-O157 à partir des carcasses ovines.

Pour atteindre cet objectif, des prélèvements ont été réalisés à partir de carcasses ovines produites dans l'abattoir d'El-Harrach.

Cette étude a compris :

- Le screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence des STEC par PCR multiplex ;
- L'isolement des STEC O157 et non-O157 ;
- La caractérisation phénotypique des isolats identifiés ;
- La détermination du sérotype des STEC isolés ;
- La caractérisation moléculaire des bactéries isolées ;
- La sensibilité des STEC isolés aux antibiotiques.

II Matériel et méthodes

Dans cette seconde étude, une méthode basée essentiellement sur la PCR a été adoptée. Cette dernière, du fait de sa rapidité, de son efficacité et de sa sensibilité, s'est imposée au sein des laboratoires d'analyses et de recherches pour la détection des STEC.

II.1 Recherche des STEC O157 et non- O157 par screening moléculaire

Pour cette recherche, les prélèvements ont été effectués au sein de l'abattoir d'El-Harrach, celui de Rouiba n'étant plus fonctionnel. Au total trois cent soixante trois (363) échantillons ont été prélevés au hasard, sur une période de neuf mois, à raison de 10 carcasses ovines par semaine.

II.1.1 Méthode d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé sur des carcasses ovines suspendues, après les opérations de saignée, d'habillage, d'éviscération et de fente thoracique, par la méthode non destructive reposant sur le double écouvillonnage (humide/sec) des surfaces des carcasses, selon la norme (ISO 17604 :2003) décrite dans l'étude I.

II.1.2 Lieux du traitement des échantillons

L'enrichissement des écouvillons a été réalisé au sein du laboratoire d'HIDAOA de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger. La caractérisation moléculaire, sérologique et phénotypique des STEC, ainsi que le test de sensibilité aux antibiotiques des STEC isolés, ont été réalisés au niveau du laboratoire des entérobactéries et autres bactéries apparentées de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA).

II.1.3 Equipements

Les équipements utilisés sont décrits en annexe 1.

II.1.4 Milieux de culture et réactifs :

Les milieux de culture ainsi que les réactifs utilisés sont décrits en annexe1.

II.2 Méthodes d'analyses

Après réalisation des prélèvements, le dépistage des STEC par screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence : *stx*₁, *stx*₂ et *eae* a été effectué par PCR multiplex.

Une fois les gènes détectés, les bactéries ont été isolées sur milieu chromogénique. Par la suite une détermination du sérotype des STEC isolés, ainsi qu'un antibiogramme, ont été réalisés.

II.2.1 Screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence

Les écouvillons de chaque carcasse composant un échantillon ont été soumis à un enrichissement, puis à une extraction de l'ADN, suivie d'une amplification génique par PCR multiplex.

II.2.1.1 Enrichissement non sélectif

100 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) ont été ajoutés à chaque sac stomacher contenant les écouvillons. Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C pendant 6 heures.

II.2.1.2 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN s'est faite directement à partir de 300 µl du bouillon d'enrichissement, centrifugé à 4 500 tours /minute pendant 5 minutes. Par la suite, le culot a été récupéré pour subir un premier lavage par ajout de 500 µl d'eau physiologique, puis une centrifugation pendant 3 minutes. Le culot a été récupéré une seconde fois, auquel on a additionné 180 µl de tampon TE (Tris EDTA), ainsi que 20µl d'ARNase. Après une homogénéisation et une incubation à température ambiante pendant 2 minutes, suivie d'une centrifugation, le culot a été soumis à deux lavages successifs, en rajoutant 500 µl d'eau physiologique, et en centrifugeant pendant 3 minutes à chaque étape. Une fois le culot récupéré, on lui a rajouté 50µl d'eau distillée. Après homogénéisation, le mélange a été mis à ébullition pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 30 secondes le surnageant contenant l'ADN a été récupéré.

II.2.1.3 Amplification de l'ADN

L'amplification de l'ADN a été effectuée par PCR multiplex, pour la détection des gènes *eae*, *stx1* et *stx2*, selon le protocole de China *et al*, (1996). Pour la détection de chaque gène une quantité de 5 µl d'ADN a été transférée dans un tube pour PCR, auquel ont été rajoutés 2µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de dNTP (2mM), 5µl du tampon (pH : 8,8), 5µl (10µM) de la paire

d'amorce considérée, 0,5 µl de Taq polymérase (5U/µl) et 30 µl d'eau distillée stérile. Les amorces utilisées, ainsi que les conditions d'amplification, sont identiques à celles utilisées dans l'étude I.

II.2.1.4 Détection des produits d'amplification

La détection du produit d'amplification s'est faite par migration en électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %.

II.2.2 Isolement des STEC O157 et non-O157

Le screening moléculaire par PCR permet seulement d'obtenir un résultat présumptif sur la présence des STEC. Il est donc toujours nécessaire de réaliser une confirmation de ce résultat. Cette étape comprend l'isolement et l'identification de la bactérie recherchée (sérogroupage, phénotypage et géotypage). Afin d'isoler les STEC présumptifs, 100 µl du bouillon d'enrichissement de chaque échantillon ayant donné un résultat positif à la PCR ont été ensemencés sur le milieu chromogène CHROMagar STEC, et incubés à 37°C pendant 18 heures. Seules les colonies violettes présumées STEC positives ont été retenues pour un sérogroupage et une identification biochimique, suivie d'une caractérisation moléculaire.

II.2.2.1 Sérogroupage des STEC isolés

Pour le sérogroupage, les neuf sérogroupe les plus souvent incriminés dans l'apparition d'épidémies à travers le monde (O157, O91, O111, O103, O145, O26, O128, O121 et O45) ont été recherchés. A partir de chaque boîte, cinq colonies violettes ont été prélevées au hasard, et soumises aux tests d'agglutination aux sérums anti- O157, anti- O45 et anti-O121, ainsi qu'aux tests d'agglutination aux latex anti- O91, O111, O103, O145, O26 et O128 (DrySpot *E. coli* Serocheck et Seroscreen).

II.2.2.2 Caractérisation phénotypique

La confirmation de l'appartenance des isolats identifiés à l'espèce *E. coli* par leur caractérisation biochimique a été réalisée à l'aide de la galerie API 20^E.

II.2.2.3 Caractérisation moléculaire des bactéries isolées

Après isolement des bactéries, une seconde PCR multiplex, réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, a été effectuée en vue de déterminer le profil génétique de chaque isolat.

II.3 Test de sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des STEC isolés a été testée à 32 antibiotiques appartenant aux différentes classes (voir la liste en annexe 1), selon les normes (NCCLS :1993) (National Comittee for Clinical Laboratory Standards) recommandées par l'OMS. Les différentes étapes de la recherche des STEC par screening moléculaire sont illustrées par la figure 26.

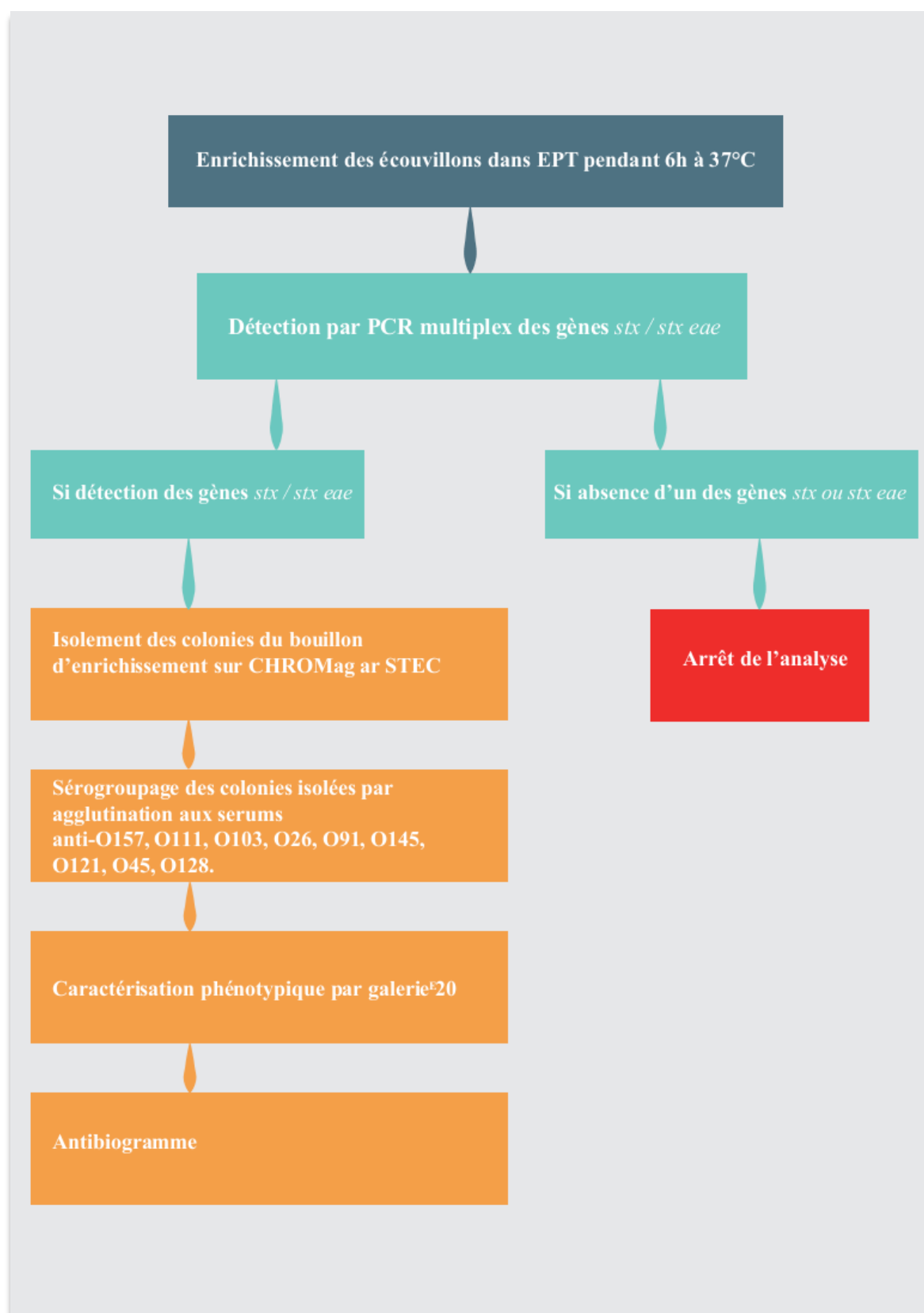


Figure 26. Etapes de recherche des STEC par screening moléculaire

III Résultats

Les résultats du screening moléculaire des gènes codant pour les facteurs de virulence, l'isolement, ainsi que la mise en évidence de la sensibilité des STEC isolés aux antibiotiques, sont rapportés ci-dessous.

III.1 Screening moléculaire

Sur les trois cent soixante-trois échantillons analysés, le nombre de PCR positives pour les gènes *stx*⁺ / *stx*⁺*eae*⁺ était de cent-seize, soit 31,95 %. Trente-six prélèvements (9,92 %) contenaient le gène *eae* uniquement. Deux cent onze prélèvements (58,13 %) ne contenaient aucun des gènes ciblés. Les résultats du screening moléculaires sont illustrés par la figure 27.

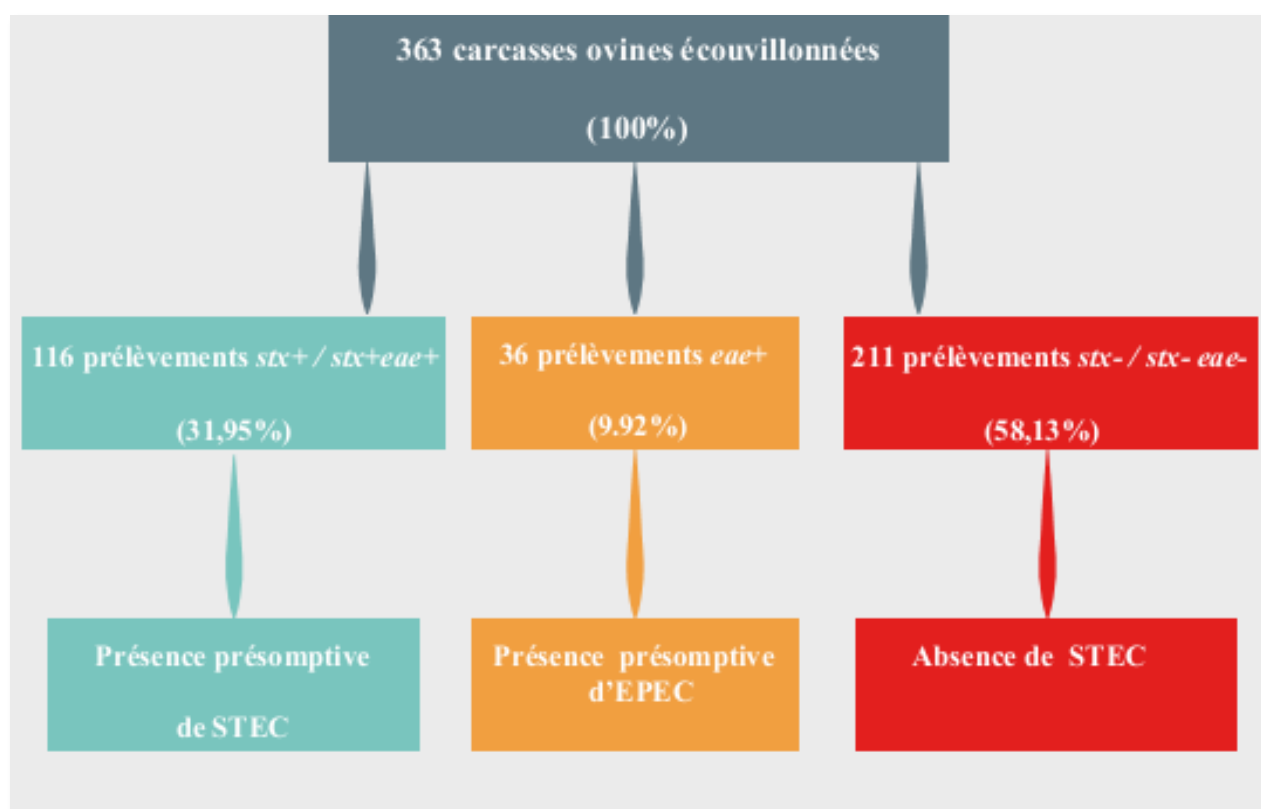
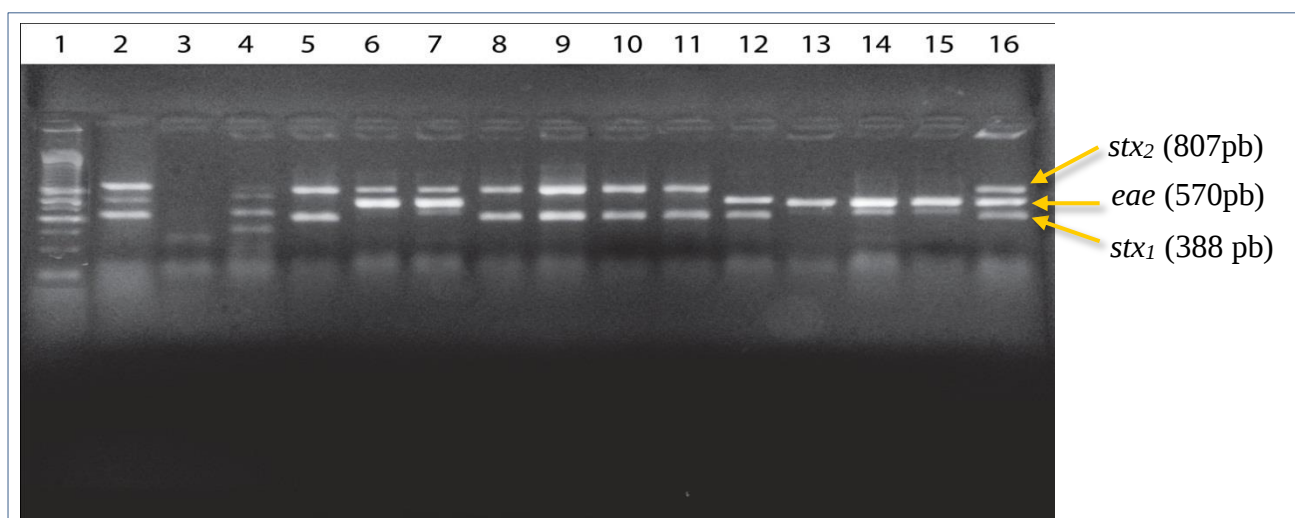


Figure 27. Résultats du screening moléculaire

La visualisation des gènes codant pour les facteurs de virulence *stx*₁, *stx*₂ et *eae* est représentée dans la figure 28.



1 : Marqueur de taille moléculaire 100 pb; 2 : témoin positif (souche de référence, *stx*₁⁺*stx*₂⁺*eae*⁺) ; 3 : témoin négatif ; 5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16 : échantillons positifs à au moins l'un des gènes de virulence.

Figure 28. Visualisation des gènes de virulence *eae* , *stx*₁ et *stx*₂ après screening par PCR multiplex

Les résultats du screening des gènes par PCR multiplex sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14. Résultats du screening par PCR multiplex pour les gènes *eae*, *stx*₁ et *stx*₂

Nombre de carcasses ovines positives à au moins l'un des gènes de virulence	<i>eae</i>	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	Pourcentage des gènes isolés	Intervalle de confiance à 95%
75	-	+	-	20,66%	[13,29 ; 28,02]
26	+	+	-	7,16%	[02,46 ; 11,85]
6	-	-	+	1,65%	[00,00 ; 03,96]
5	-	+	+	1,38%	[00,00 ; 03,50]
2	+	-	+	0,55%	[00,00 ; 01,89]
2	+	+	+	0,55%	[00,00 ; 01,89]
36	+	-	-	9,92%	[04,48 ; 15,35]

+ : présence ; - : absence.

Les résultats du screening par PCR multiplex pour les gènes *eae*, *stx*₁ et *stx*₂ sont illustrés par la figure 29.

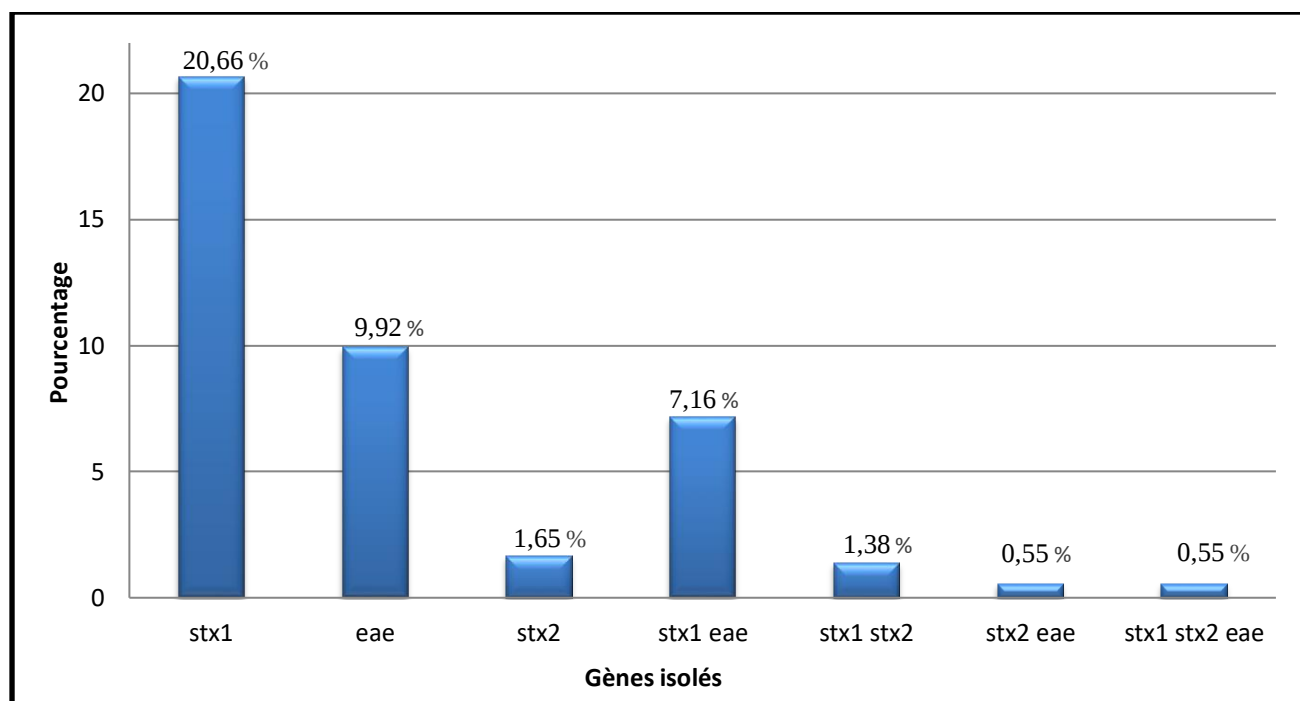


Figure 29. Taux de détection des gènes codant pour les facteurs de virulence

III.2 Isolement et caractérisation des bactéries isolées

A partir des cent seize PCR positives pour les gènes *stx*⁺ / *stx*⁺*eae*⁺, vingt isolats (17,24 %) ont été identifiés. Dix-neuf (16,37 %) appartenaient à l'espèce *E. coli* (STEC) et un (0,86 %) à *Citrobacter braakii*. L'aspect des colonies isolées sur CHRMagar STEC est présenté dans les figures 30 et 31.

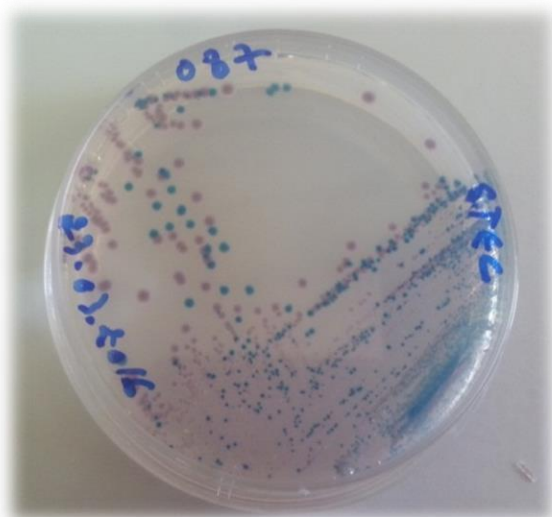


Figure 30 : Aspect des STEC sur le milieu chromogène CHROMagar STEC (colonies mauves : STEC, colonies bleus : autres entérobactérie) (Photo personnelle)

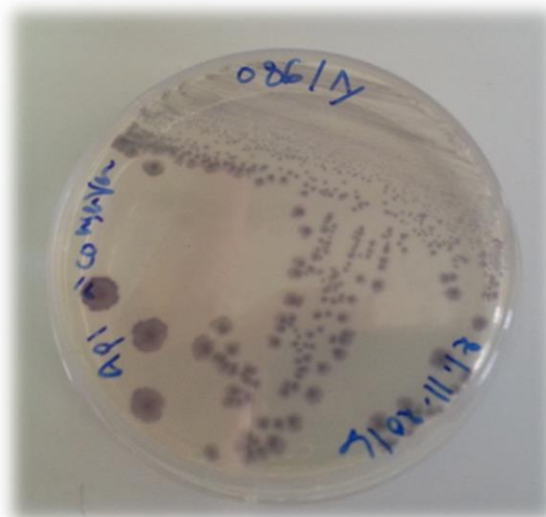


Figure 31 : Aspect de *Citrobacter braakii* sur CHROMagar STEC (colonies pourpres à bord irrégulier et à centre opaque) (Photo personnelle)

III.2.1 Détermination du sérotype des STEC isolés

Des dix-neuf STEC isolés, cinq (26,3 %) - dont deux $stx_1^+ eae^+$, un $stx_1^+ eae^+$, un stx_1^+ et un stx_2^+ - ont agglutiné avec le sérum O26. Quatorze (73,7 %) ont donné un résultat négatif vis-à-vis des différents sérums testés. L'aspect des agglutinats sur le latex *E. coli* Seroscreen et celui du latex anti-O26 sont présentés dans les figures 32 et 33.



Figure 32 : Colonie agglutinant le latex *E. coli* Seroscreen (Photo personnelle)



Figure 33 : Colonie agglutinant le latex anti-O26 (Photo personnelle)

Les taux de bactéries isolées à partir des échantillons positifs à la PCR sont schématisés dans la figure 34.

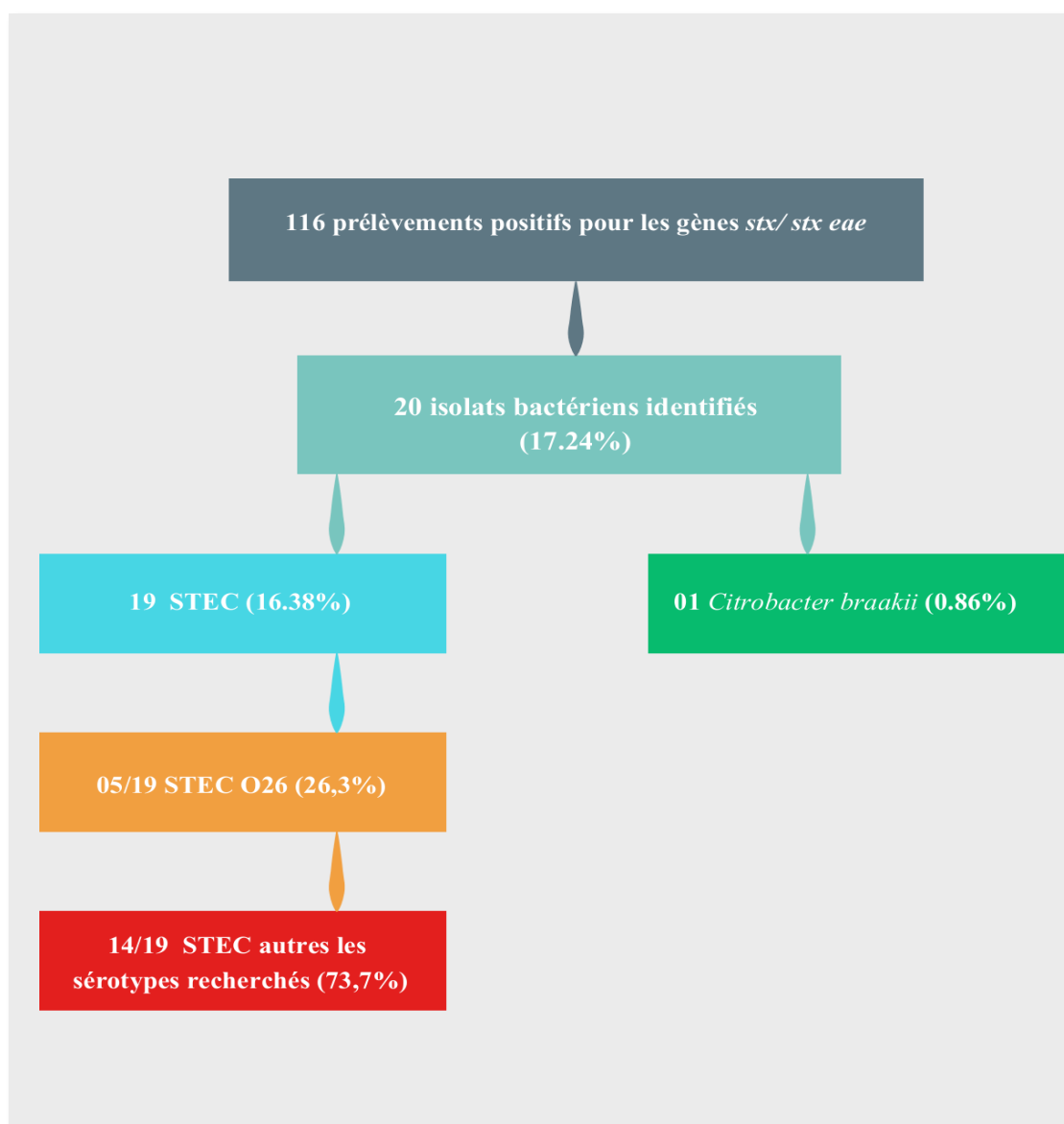
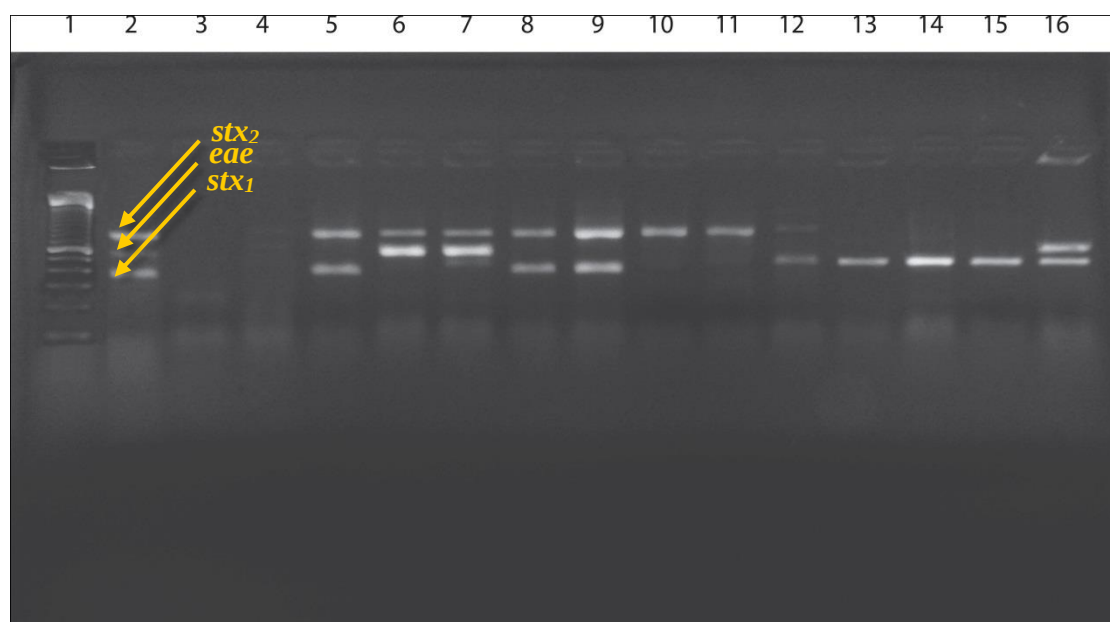


Figure 34. Taux des bactéries isolées après screening moléculaire

III.2.2 Caractérisation moléculaire des bactéries isolées

Les *E. coli* isolés présentait les profils génotypiques suivants : six (31,58 %) étaient $stx_1^+ eae^+$, cinq (26,31 %) stx_2^+ , trois (15,79 %) $stx_1^+ stx_2^+$, trois (15,79 %) stx_1^+ et deux (10,53 %) $stx_2^+ eae^+$. *Citrobacter braakii* était $eae^+ stx_1^+$. La caractérisation moléculaire après isolation des bactéries est présentée dans la figure 35.



1 : marqueur de taille moléculaire 100 pb ; 2 : témoin positif (souche de référence, $stx_1^+stx_2^+eae^+$) ; 3 : témoin négatif ; 5 à 15 : STEC ; 16 : *Citrobacter braakii*.

Figure 35. Visuallisation des gènes stx_1 , stx_2 et *eae* après isolement et caractérisation des bactéries

La caractérisation génotypique des bactéries isolées à partir du CHRMagar STEC est rapportée dans le tableau 15.

Tableau 15. Caractérisation génotypique des bactéries isolées à partir du CHRMagar STEC

Nombre de bactéries isolées	Espèce	<i>eae</i>	stx_1	stx_2	Pourcentage des gènes isolés	Intervalle de confiance à 95%
6	STEC	+	+	-	30%	[21,66 ; 38,33]
5	STEC	-	-	+	25%	[17,11 ; 32,88]
3	STEC	-	+	+	15%	[08,50 ; 21,49]
3	STEC	-	+	-	15%	[08,50 ; 21,49]
2	STEC	+	-	+	10%	[04,54 ; 15,45]
1	<i>Citrobacter braakii</i>	+	+	-	5%	[01,03 ; 08,97]

La caractérisation génotypique des bactéries isolées à partir du CHROMagar STEC est illustrée par la figure 36.

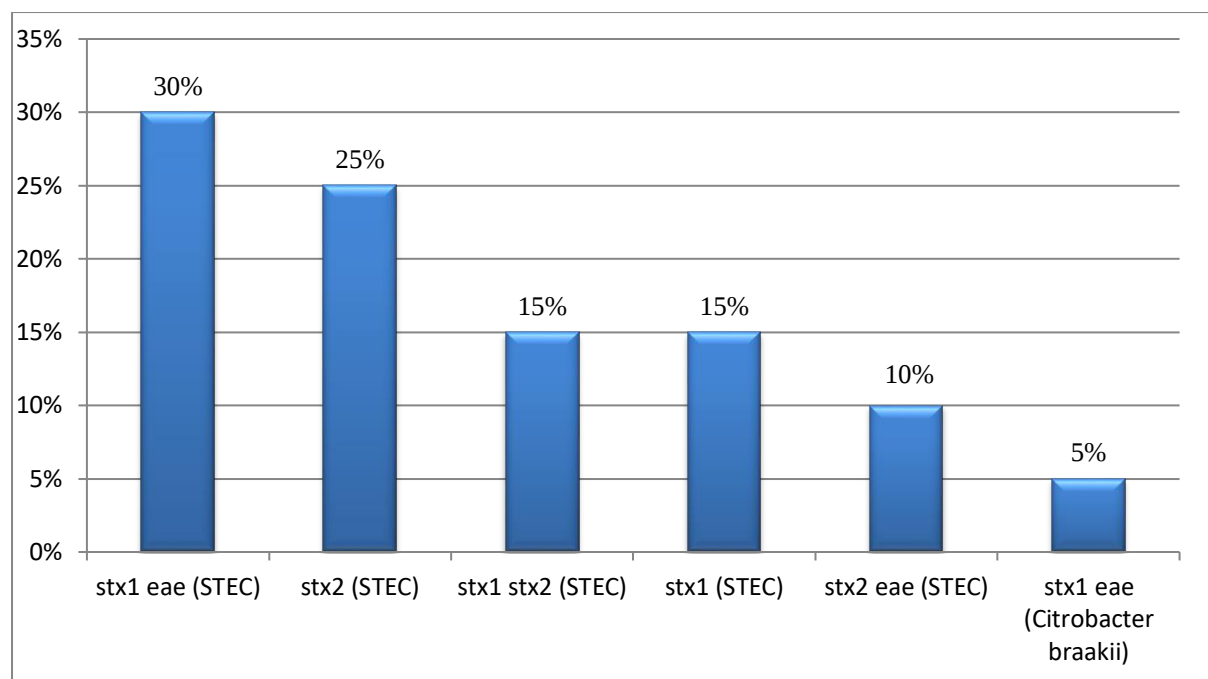


Figure 36. Représentation graphique des taux des gènes détectés par espèce bactérienne isolée

III.3 Test de sensibilité aux antibiotiques

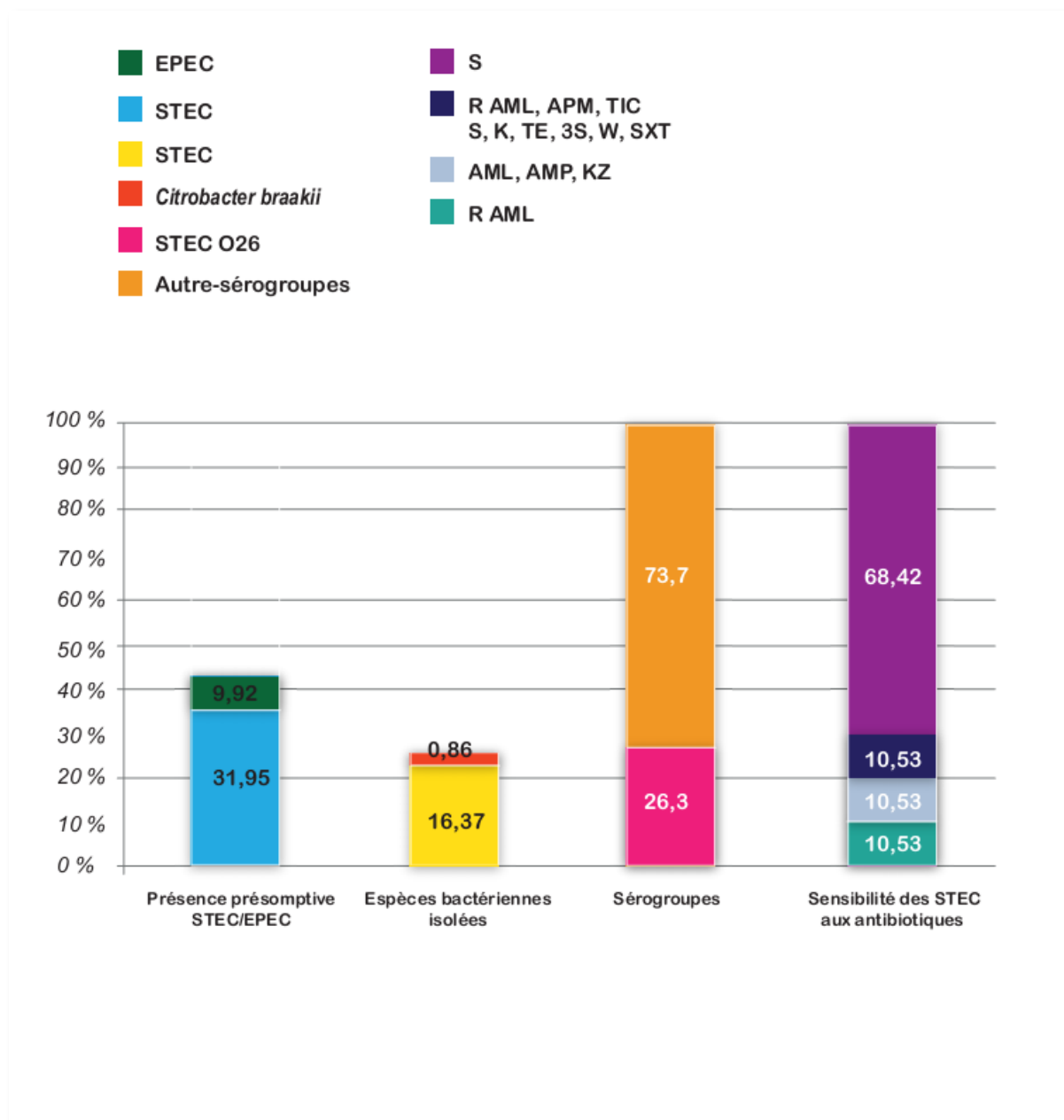
Des dix-neuf STEC isolés, six (31,58 %) ont présenté une résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Deux (10,53 %), dont une appartenant au sérotype O26, étaient résistants à l'amoxicilline. Deux (10,53 %) étaient résistants à trois antibiotiques différents : l'amoxicilline, l'ampicilline et à la cefazoline. Deux (10,53 %) étaient résistants à neuf antibiotiques : l'amoxicilline, l'ampicilline, la ticarcilline, la streptomycine, la kanamycine, la tétracycline, les sulfamides, la triméthoprine et la cotrimoxazole. Treize (68,42 %) étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Les résultats de la caractérisation et de l'antibiorésistance des STEC isolés sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Caractérisation et antibiorésistance des STEC isolés

Nombre de STEC	Sérogroupe	Génotype	Antibiorésistance
2	-	<i>stx₁</i>	S
2	O26	<i>stx₁ eae</i>	S
1	-	<i>stx₂ eae</i>	R (AML)
1	-	<i>stx₂ eae</i>	S
1	O26	<i>stx₂</i>	S
1	-	<i>stx₂</i>	S
1	-	<i>stx₁ stx₂</i>	S
1	-	<i>stx₁eae</i>	S
1	O26	<i>stx₁ eae</i>	R (AML)
1	O26	<i>stx₁</i>	S
2	-	<i>stx₁ stx₂</i>	R (AML, AMP, KZ)
3	-	<i>stx₂</i>	S
2	-	<i>stx₁ eae</i>	R (AML, AMP, TIC, S, K, TE, 3S, W, SXT)

AML: Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; KZ : Cefazoline ; TIC : Ticarcilline ; S : Streptomycine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; 3S : Sulfonamides ; W : Triméthoprine ; SXT : Cotrimoxazole ; - : Agglutination négative à l'ensemble des sérums testés ; R: résistant, S: sensible.

Les taux des espèces bactériennes isolées, des sérogroupes identifiés, ainsi que la sensibilité des STEC isolés aux antibiotiques sont illustrés par la figure 37.



AML: Amoxicilline ; AMP : Ampicilline ; KZ : Cefazoline ; TIC : Ticarcilline ; S : Streptomycine ; K : Kanamycine ; TE : Tétracycline ; 3S : Sulfonamides ; W : Triméthoprime ; SXT : Cotrimoxazole ; S : sensible ; R : résistant.

Figure 37. Représentation graphique des taux des pathogènes détectés, des espèces bactériennes isolées, des sérogroupes identifiés et de la sensibilité des STEC isolés aux antibiotiques

Discussion Générale

Discussion générale

Comme les bovins, les ovins sont des réservoirs de STEC (Ferreira *et al.*, 2015) potentiellement pathogènes pouvant être à l'origine de toxi-infections alimentaires (Perelle *et al.*, 2007) . Il existe un véritable manque concernant la connaissance du potentiel zoonotique des STEC lié à la consommation de la viande ovine (Jacob *et al.*, 2013 ; Marin *et al.*, 2014 ; Madzingira, 2016). Le manque d'informations sur la prévalence des STEC O157 et non-O157 chez les moutons et les chèvres comparé aux bovins, pourrait s'expliquer par le fait que l'intérêt chez les petits ruminants en tant que réservoirs de STEC pathogènes pour l'homme n'a émergé que récemment. Bien que l'exposition environnementale aux excréments d'ovins et de caprins contaminés par les STEC soit courante et cause des épidémies et des maladies humaines (Keen *et al.*, 2006). La menace potentielle pour la sécurité alimentaire reste sous-estimée. En Algérie, l'absence de données concernant la présence des STEC au niveau de la viande ovine a suscité notre intérêt pour la réalisation de cette recherche qui est la première dans le pays.

E. coli O157: H7 est le sérotype le plus connu dans le groupe des STEC. Une grande partie des connaissances de la pathogénie et de l'épidémiologie des STEC repose sur le travail effectué sur ce sérotype. C'est pour cette raison que nous avons choisi de rechercher en premier lieu ce pathogène lors d'une première étude. A l'issue des résultats de cette dernière, nous avons mené une seconde recherche qui consistait en un screening moléculaire des STEC O157 et non-157 tel que : O26, O103, O111, O121, O45 et O145, les plus souvent incriminés dans l'apparition de flambées épidémiques dans le monde (Gould *et al.*, 2013).

I Méthode de prélèvement

Pour estimer la contamination superficielle des carcasses par les différents germes, deux méthodes de prélèvement peuvent être envisagées, la méthode destructive et la méthode non destructive. La méthode destructive repose sur l'excision : des trous sont pratiqués à la surface de la carcasse à l'aide d'un emporte-pièce stérile afin d'obtenir des disques de peau ou de tissu de 2 mm d'épaisseur environ (ISO 17604 :2003). Cette méthode est considérée comme étant la plus représentative car elle permet de récupérer le maximum de bactéries ; néanmoins sa pratique dévalue la valeur marchande du produit (Capita *et al.*, 2004).

La méthode non destructive comprend la méthode du double écouvillonnage (humide/sec) réalisée à l'aide de cotons stériles, la méthode de prélèvement à l'éponge (comme son nom

l'indique, c'est une éponge stérile exempte de substance à effet inhibiteur qui est utilisée), et enfin la méthode reposant sur l'utilisation de tampon de gaze stérile imbibée d'une solution de peptone sel. Dans cette étude, c'est la méthode non destructive reposant sur le double écouvillonnage (humide/sec) des carcasses à l'aide de cotons stériles qui a été utilisée de la manière décrite dans la norme ISO 17604 :2003. Cette méthode non destructive est d'application directe et facile à réaliser. Elle présente aussi l'avantage de détecter de faibles niveaux d'*E. coli* O157 ou d'autres bactéries pathogènes à partir de plus grandes surfaces de carcasses, 400 cm² pour les bovins et 100 cm² pour les ovins (Capita *et al.*, 2004).

Plusieurs chercheurs ont comparé ces différentes méthodes de prélèvements que sont les méthodes destructives et les méthodes non destructives. Miraglia *et al.*, (2005) ont toujours obtenu un nombre de bactéries (nombre total de germes) significativement plus élevé avec la méthode par excision comparée au double écouvillonnage. Les auteurs signalent cependant qu'il est difficile d'établir une relation précise entre les résultats obtenus avec la méthode par excision d'une part, et la méthode par écouvillonnage d'autre part, ces deux méthodes présentant une grande variabilité du nombre de germes collectés. Hutchison *et al.*, (2005) ont essayé de quantifier la relation entre les résultats de l'excision et de la technique par écouvillonnage en ce qui concerne le nombre total de germes sur des carcasses de bovins, d'ovins et de porcs. Les deux techniques ont été alternativement appliquées sur les mêmes carcasses. La corrélation linéaire entre les dénombrements obtenus d'après les deux techniques est toutefois très faible. D'après les auteurs, ceci peut avoir différentes causes, comme par exemple une répartition non uniforme des bactéries sur les sites échantillonnés. La différence de dénombrement entre la méthode d'excision et celle de l'écouvillonnage est essentiellement liée au degré d'adhérence des bactéries à la surface de la carcasse. Cette adhérence est influencée par de nombreux facteurs, comme le type de carcasse, le type de tissu, l'espèce bactérienne, le niveau de contamination et le degré d'humidité. Même si les performances des méthodes non-destructives sont moindres par rapport à celles affichées par l'excision en termes de récupération, elles peuvent, dans certains cas, s'avérer plus performantes. Gill et Jones., (2000) ont montré que le nombre d'échantillons positifs en coliformes et *E. coli* augmente lorsque la taille de la surface échantillonnée s'accroît (de 10 à 1000 cm²).

La méthode d'excision n'a pas été choisie lors de cette étude. L'excision donne les dénombrements les plus fiables et les moins variables grâce à une récupération presque complète des bactéries, même en cas de forte adhérence à la carcasse. Mais comme la portion analysée par cette méthode est petite, cela peut provoquer des inexactitudes importantes lorsque la contamination totale est faible et répartie de façon hétérogène, ou lorsque la présence du pathogène cible est irrégulière (tel *E. coli* O157 : H7). En outre, l'excision détériore la carcasse entraînant une baisse de sa valeur marchande, ce qui est inacceptable par le propriétaire. Avec la technique par écouvillonnage, la récupération des bactéries est favorisée si le matériel utilisé est de nature plus abrasive. Avec les écouvillons de coton, peu abrasifs, une forte amélioration de la récupération peut être obtenue en utilisant successivement un écouvillon humide et un écouvillon sec. C'est ce qui a été fait lors de la présente étude. La méthode du double écouvillonnage est connue pour sa simplicité et sa praticité lors des prélèvements et la possibilité d'échantillonner une surface importante de la carcasse sans engendrer de dommages. D'où le choix de cette méthode, cela d'autant plus qu'elle permet à la fois de préserver la qualité de la carcasse (valeur marchande) et de détecter des bactéries présentes seulement en faible nombre et réparties de façon inégale sur la carcasse, ce qui est le cas des STEC, germes recherchés dans cette étude.

II Méthodes d'analyses et milieux de détection

La détection d'*E. coli* O157 a été réalisée par séparation immuno-magnétique (IMS), et celle des STEC O157 et non-O157 par screening moléculaire.

II.1 Détection d'*E. coli* O157 selon la norme (ISO EN 16654 :2001)

Compte tenu de la faible quantité d'*E. coli* O157 présente dans l'aliment, sa détection nécessite de recourir à une phase d'enrichissement dont l'objectif est une croissance optimale du pathogène tout en limitant le développement des autres micro-organismes présents dans la matrice alimentaire. De nombreuses études ont comparé et évalué l'efficacité des milieux d'enrichissement et d'isolement des STEC O157. D'après Vimont *et al.*, (2006), les résultats relatifs à l'efficacité du protocole d'enrichissement sont différents d'une étude à l'autre. Johnson *et al.*, (1995) ont rapporté que *E. coli* O157 : H7 dans les viandes hachées naturellement contaminées est plus facilement détecté après un enrichissement dans le milieu *E. coli* additionné de novobiocine (mEC + n) que dans le bouillon tryptone soja additionné d'acriflavine (mTSB+ a). Vimont *et al.*, (2007) ont démontré que l'ajout de la novobiocine

dans des bouillons d'enrichissement, tel que celui du TSB, inhibe la croissance de certaines souches STEC non-O157: H7. Tutenel *et al.*, (2003) ont rapporté que l'utilisation du bouillon (mTSB + a) permet un taux de détection d'*E. coli* O157 significativement plus élevé qu'avec l'utilisation de l'eau peptonnée tamponnée (EPT), et cela après une durée d'incubation de six heures. Bennett *et al.*, (1995) ont montré que le pourcentage d'*E. coli* O157 isolé des viandes hachées après utilisation de la technique d'IMS est plus élevé avec le milieu mEC + n qu'avec du EPT + vancomycine (8mg/l), cefsulodine (10mg/l) et cefixime (0,05mg/l) (EPT + vcc). Cependant, De Zutter et Uradzinski, (1997) ont constaté que l'enrichissement sélectif n'est pas exigé. De bons résultats peuvent être obtenus en utilisant un enrichissement de courte durée (six heures) dans un milieu non sélectif d'eau peptonnée tamponnée. Ils ont également démontré qu'une durée d'enrichissement plus longue provoque la croissance de la flore compétitive massive sur les géloses et ainsi masque les colonies d'*E. coli* O157. Dans la présente étude la phase d'enrichissement a été réalisée en utilisant le milieu non sélectif, qui est l'EPT, pendant une durée de six heures ; et comme pour De Zutter et Uradzinski, des résultats satisfaisants ont été obtenus. Il reste à souligner que dans cette étape particulièrement délicate, un équilibre reste à trouver entre l'inhibition de la croissance des autres micro-organismes et le développement optimum de la bactérie recherchée.

Afin d'améliorer les méthodes conventionnelles, de nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées au développement de techniques de type séparation-concentration. Ces techniques sont représentées notamment par la centrifugation et la filtration. Wright *et al.*, (1994) ont constaté que l'introduction d'une étape de séparation immuno-magnétique, utilisant des particules paramagnétiques couvertes d'anticorps anti-O157, augmente la sensibilité d'environ cent fois, pour une détection limite d'environ deux organismes par gramme de bœuf. Dans cette étude, de bons résultats ont été obtenus en complétant l'étape d'enrichissement par une technique de séparation-concentration qui est la séparation immuno-magnétique (IMS).

Concernant l'isolement des STEC O157, plusieurs milieux ont été utilisés. *E. coli* O157 ne fermente pas le sorbitol à l'inverse des autres *E. coli* (Cebula *et al.*, 1995) . Cette propriété biochimique a justifié l'utilisation de la gélose Mac Conkey au sorbitol (SMAC). Des modifications de la gélose SMAC ont été mises au point dans l'objectif d'augmenter le caractère sélectif vis à vis des STEC O157. Thompson *et al.*, (1990) ont développé un test

rapide fluorescent pour la détection d'*E. coli* O157. Ce test utilise le 4-méthyl umbellifery- β -glucuronide (MUG) comme indicateur hydrolysé en un composé fluorescent par l'enzyme β -glucuronidase. Dans cette étude, l'isolement des *E. coli* O157 : H7 a été réalisé en utilisant le milieu SMAC additionné de cefixime et tellurite de potassium à raison de 40 μ l/l de gélose. L'activité β -glucuronidase a été mise en évidence par le milieu Rapid *E. coli* 2 (REC2), car le clivage du substrat chromogène contenu dans ce milieu par la β -glucuronidase entraîne une coloration violette des colonies d'*E. coli* β -glucuronidase positives. Cependant, ces techniques semblent à l'heure actuelle insuffisantes pour détecter la majorité des autres souches de STEC. L'émergence en Europe de souches O157 : H- sorbitol et β -glucuronidase positives (Ammon *et al.*, 1999), met en doute l'efficacité de la méthode de détection basée uniquement sur ces caractères. Pour la présente étude, l'agglutination au latex anti-O157 des colonies sorbitol négatives a été testée, ainsi que celles de quelques colonies sorbitol positives isolées sur gélose CT-SMAC. Ceci a permis de détecter trois *E. coli* O157 sorbitol et β -glucuronidase positives. La phase d'isolement est suivie d'une détection de l'antigène somatique O157 par l'utilisation de tests immunologiques. L'absence de détection de l'antigène O157 permet de dire que *E. coli* O157 n'est pas présent dans l'échantillon utilisé pour l'analyse. Par contre, sa détection ne signe pas obligatoirement sa présence dans l'aliment. Avec le test d'agglutination au latex anti-O157, de même qu'avec l'ensemble des tests actuellement commercialisés pour détecter le pathogène, on peut avoir une réponse positive avec certaines souches de *Citrobacter freundii* (Bettelheim *et al.*, 1993). C'est pour cette raison qu'un résultat positif au test d'agglutination est suivi d'une identification biochimique de la bactérie pour pouvoir l'attribuer à l'espèce *E. coli*

L'association de plusieurs facteurs de virulence aux bactéries isolées permet de déterminer le caractère éventuellement dangereux de l'aliment. Les méthodes génétiques sont donc intéressantes pour détecter les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines. Le seul frein à l'application de ces méthodes génétiques à grande échelle en diagnostic alimentaire est le nécessaire investissement en matériel et en formation du personnel. De très nombreux systèmes PCR ont été décrits pour détecter ou caractériser les STEC. Les cibles génétiques principales sont les gènes *stx*₁, *stx*₂, le gène *eae* ainsi que le gène *ehxA*. Certains systèmes sont spécifiques des *E. coli* O157 : H7. Les gènes ciblés sont le gène *rfbE* codant pour l'antigène O157, le gène *fliCH7* codant pour l'antigène H7 et le gène *uidA* codant pour la β -

glucuronidase, et dont la séquence (mutation du gène à +93) est spécifique de ces souches (Yoshitomi, 2006). Les gènes de virulence *stx* et *eae* peuvent être recherchés séparément. Le système d'amorces développé par Lin *et al.*, (1993) permet de détecter, dans un seul système, tous les variants connus des gènes *stx*. Dans la présente étude, la détection des gènes codant pour les facteurs de virulence a été réalisée par amplification génique en utilisant les amorces de China *et al.*, (1996) en PCR classique à partir de colonies pures. Six isolats ont été identifiés par PCR multiplex, qui permet l'amplification des gènes *eae*, *stx*₁ et *stx*₂ simultanément d'après les conditions décrites par China *et al.*, (1996). Les gènes *stx*₂ et *eae* de sept isolats ont été détectés séparément par PCR simple. D'autres techniques ont été développées ces dernières années, comme la PCR-ELISA et la PCR en temps réel. Ces systèmes sont plus sophistiqués (automate). La PCR en temps réel par exemple permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification (China, 2002).

II.2 Détection des *E. coli* O157 et non-O157 par screening moléculaire

Les STEC non-O157 n'ont pas de propriétés biochimiques communes permettant leur isolement sélectif sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite de recourir à des méthodes génétiques, dont la PCR, avec utilisation d'amorces spécifiques des gènes de virulence codant pour la production de Shiga-toxines (*stx*) et de l'intimine (*eae*). L'obtention d'un bouillon positif après enrichissement pour les gènes *stx* / *stx eae* est le signe de la présence potentielle d'un STEC (Anses, 2017). Le screening par PCR a révélé une présence non négligeable (31,95 %) des gènes de virulence *stx*⁺ / *stx*⁺*eae*⁺ sur les surfaces de carcasses ovines écuvillonnées lors de la présente étude. La présence du gène *eae* a été mise en évidence dans 9,92 % des échantillons. Le gène de virulence *eae* est porté dans la majorité des cas par les EPEC (*Escherichia coli* entéropathogènes) (Knutton *et al.*, 1989) et peut être présent aussi chez *Citrobacter rodentium* (Luperchio et Schauer, 2001 ; Verstraete *et al.*, 2014). La recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence par PCR a permis lors de cette étude de noter la présence éventuelle de deux types de pathogènes différents, pathovars, à savoir les STEC et les EPEC.

Après détection des gènes codant pour les facteurs de virulence, l'identification sur gélose est beaucoup plus fastidieuse. En effet, comme mentionné précédemment, les STEC non-O157 n'ont pas de caractéristiques biochimiques communes rendant possibles l'utilisation de

milieux d'isolements particuliers. Dans cette étude, le milieu chromogénique CHROMagar STEC a été utilisé comme moyen de détection. Plusieurs études se sont intéressées à l'efficacité de ce milieu pour l'isolement des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines, tous sérogroupes confondus. Jari *et al.*, (2012) ont démontré une bonne sensibilité de ce milieu, une détection plus élevée ayant été observée pour quelques sérogroupes de STEC : O26 (90 %), O111 (100 %), O121 (100 %), O145 (100 %) et O157 (84,9 %). La spécificité du milieu était de 98,9 %. Wylie *et al.*, (2013) suggèrent d'utiliser le CHROMagar STEC comme un moyen complémentaire et efficace pour l'isolement des différents sérotypes de STEC encore méconnus, permettant ainsi de mieux comprendre leur prévalence, leurs caractéristiques cliniques et leur épidémiologie, et aider à l'élaboration ou à l'amélioration d'un programme de lutte contre ces pathogènes émergents, ceci afin d'assurer une bonne surveillance de la salubrité des aliments en ciblant tous les sérotypes. Contrairement à l'isolement des *E. coli* O157 par la technique de séparation immuno-magnétique (IMS) où nous avons enregistré un taux d'isolement d'*E. coli* O157 : H7 de 7,28 %, aucun STEC O157 n'a été isolé sur CHROMagar STEC à partir des bouillons positifs à la PCR. Nous en concluons que la technique reposant sur l'utilisation de l'IMS, qui permet une bonne concentration du sérotype ciblé suivie d'un isolement sur gélose CT-SMAC, est mieux adaptée pour l'isolement des *E. coli* O157.

III Prévalence d'*E. coli* O157 : H7 par (IMS)

Sur les cent cinquante-et-une carcasses ovines analysées, onze (7,28 %) étaient contaminées par la bactérie pathogène *E. coli* O157 : H7. Parmi les treize *E. coli* O157 : H7 isolés, dix (76,92 %) portent le gène *stx*₂ qui code pour la Shiga-toxine de type 2. Les souches produisant la toxine Stx₂ sont mille fois plus virulentes que celles qui produisent Stx₁ (Joly et Reynaud, 2003). De ce fait, les *E. coli* isolés lors de cette étude sont potentiellement pathogènes et sont susceptibles de provoquer des épidémies. Un des treize isolats identifiés (7,69 %) possède uniquement le gène *eae*. Le même génotype a été isolé par Zweifel *et al.*, à partir de selles de moutons (Zweifel *et al.*, 2006). Toujours dans cette étude, deux *E. coli* O157 : H7 sorbitol et β -glucuronidase positifs portant le gène *stx*₂ ont été isolés. Ces nouveaux caractères phénotypiques sont dus d'après Armstrong soit à une mutation, soit à l'appartenance de ce variant phénotypique peu fréquent à un clone primitif préexistant (Armstrong *et al.*, 1996). D'après Karch, (1999), ce variant est à l'origine une souche EPEC O55 : H7 qui a gardé la

capacité à fermenter le sorbitol et à produire une β -glucuronidase, mais qui a subi un transfert latéral de la région *rfb* suite à une transfection, acquérant ainsi le plasmide des EHEC et le gène *stx₂* par conversion phagique. En ce qui concerne ces STEC O157 : H7 sorbitol, β -glucuronidase positifs isolés lors de cette étude, bien qu'ils soient dépourvus du gène *eae* codant l'intimine, ils sont considérés comme potentiellement pathogènes. Le même génotype a été mis en évidence lors d'une épidémie survenue en France où les bactéries responsables des gastro-entérites ainsi que du syndrome hémolytique et urémique possédaient uniquement le gène *stx_{2c}* (Espié et Vaillant, 2002). Des cas de SHU ont été aussi associés à des souches STEC O157 : H- sorbitol, β - glucuronidase positives en Allemagne. Ce phénotype est à l'origine de la majorité des cas de SHU en pédiatrie dans ce pays, et a causé non seulement des cas sporadiques, mais aussi des foyers, avec vingt-huit cas de SHU (Ammon *et al.*, 1999).

Quelques études se sont intéressées à la possibilité de contamination des carcasses ovines par le sérotype O157 : H7 à travers le monde. En Afrique, les études menées en Ethiopie par Mersha *et al.*, (2010) et Abreham *et al.*, (2019), et en Namibie par Madzingira (2016), ont révélé des taux d'isollements respectifs d'*E. coli* O157 : H7 de 8.7 %, 2,5 % et 3,3 %. Le résultat trouvé lors de notre étude (7,28 %) est proche à celui trouvé par Mersha *et al.*, et supérieur à ceux enregistrés par Madzingira, Abreham *et al.* Le sérotype O157 : H7 a été isolé aussi à partir de cas de diarrhées survenues dans certains pays africains, dont l'Afrique du Sud, le Swaziland, la République Centre Africaine, le Kenya, l'Ouganda, le Gabon et le Nigéria (Raji *et al.* 2006). Cela prouve que les bactéries isolées lors de cette étude peuvent être également à l'origine de l'apparition de cas d'infection à *E. coli* O157 :H7 en Algérie. En Europe, les taux d'isolement d'*E. coli* O157 : H7 de 1,5 % en Irlande (Lenahan *et al.*, 2007), de 1,8 % en Suède (Söderlund *et al.*, 2012) et de 4 % en Italie (Bilei *et al.*, 2012), sont inférieurs aux 7,28 % trouvés lors de la présente recherche, alors que la prévalence observée en Turquie (Gencay, 2014) en représente le double (14 %.) du taux enregistré lors de cette étude. Nos résultats sont également supérieurs aux 3,5 % trouvés aux États-Unis (Kalchayanand *et al.*, 2007) et au 0,2 % en Australie (Phillips *et al.*, 2013). Aucune contamination par *E. coli* O157 : H7 n'a été décelée dans des échantillons d'agneaux, d'après l'étude menée par Zarei *et al.*, (2013) en Iran. Il en est de même pour celle menée par Zhang *et al.*, (2015) en Chine. D'après ces résultats, on constate que le sérotype O157 : H7 a été

retrouvé dans la plupart des pays où il a été recherché, confirmant ainsi le portage de ce pathogène par les ovins.

IV Prévalence des STEC O157 et non-O157 par screening moléculaire

Le screening par PCR a révélé une présence non négligeable (31,95 %) de gènes de virulence stx^+ / stx^+eae^+ sur les surfaces de carcasses ovines écouvillonnées. Ce résultat est proche de celui enregistré par Zweifel et Stephan (2003) en Suisse (36,6 %), mais supérieur à ceux enregistrés par Bai *et al.*, (2015) en Chine (20,6 %) et Mazzette *et al.*, (2012) en Italie (14,7 %). Le gène stx_1 est prédominant avec un taux de 20,66 %. Ce résultat est inférieur à celui enregistré par Mazzette *et al.*, en 2012 (36,91 %). La combinaison des deux gènes ($stx_1^+stx_2^+$) est retrouvée dans 1,38 % des carcasses. Ce taux est inférieur au résultat obtenu par Mazzette *et al.*, en 2012 (5,7 %). La présence du gène eae en combinaison avec les gènes stx a été détectée dans 8,26 % des échantillons, résultat inférieur au taux de 17,94 % obtenu par Momtaz *et al.* (2013). L'apparition de CH et du SHU est étroitement associée aux types de STEC portant le gène eae codant pour l'intimine (Blanco *et al.*, 2004). Le portage du gène eae a pu être mis en évidence dans 9,92 % des échantillons. Mazzette *et al.*, (2012) ont détecté ce gène à un taux de 18,9 % à partir des carcasses ovines tandis que Maluta *et al.*, (2014) ont rapporté un taux de détection de 11,11 %. Le gène eae est présent dans tous les EPEC (*Escherichia coli* entéropathogènes) (Trabulsi *et al.*, 2002). Pour identifier les EPEC, il est d'abord nécessaire de détecter la présence du gène eae (Mora *et al.*, 2016). Les EPEC sont responsables de pathologies rencontrées le plus souvent chez les enfants de moins de deux ans dans le monde (Varela *et al.*, 2015). Ils sont responsables en moyenne de 5 à 10 % des épisodes de gastro-entérite infantile (GEI) dans les pays en développement (Ochoa *et al.*, 2008). Les EPEC et les STEC (stx^+eae^+) appartiennent aux groupes des *Escherichia coli* attachantes et effaçantes (AEEC) du fait de leur similitude à pouvoir provoquer la même lésion « attachement /effacement (A/E)» des entérocytes (Knutton *et al.*, 1989). D'après ces résultats, on peut constater que cette étude a révélé la présence éventuelle de deux types de pathovars différents - les STEC et les EPEC - sur la surface des carcasses ovines, dont le pouvoir pathogène est non négligeable.

Les sérogroupes O91, O111, O26, O103, O145, O128 ont été associés à l'apparition de la majorité des épidémies recensées en France (Brugère *et al.*, 2012). Le O45 et le O121 sont considérés comme les sérogroupes les plus à risque de provoquer des toxi-infections alimentaires aux États-Unis (Beutin et Fach, 2014). *E. coli* O157 est considéré comme le séro groupe le plus incriminé dans l'éclosion des flambées épidémiques (Lim *et al.*, 2010). Ces données justifient l'intérêt de la recherche de ces sérogroupes dans la présente étude. Vingt isolats bactériens (17,24 %) ont été identifiés à partir des cent-seize échantillons positifs à la PCR pour un ou plusieurs gènes (stx^+ / $stx^+ eae^+$). Parmi eux, dix-neuf (16,38 %) appartiennent à l'espèce *E. coli* (STEC) et un (0,86 %) appartient à *Citrobacter braakii*. Le faible taux de bactéries isolées peut s'expliquer par le fait que de nombreux facteurs peuvent influencer le taux d'isolement des STEC dans un échantillon, comme la présence d'autres espèces bactériennes (stx^+) autre que *E. coli*, tel *Shigella dysenteriae* de type 1 ou *Shigella flexneri* (Herold *et al.*, 2004). La présence de bactéries compétitives comme *Pseudomonas spp*, *Proteus spp* et *Klebsiella spp* peuvent masquer la poussée des STEC (Fukushima et Seki, 2004) et la viabilité des STEC présents. Verstraete *et al.*, (2014), rapportent qu'aucune souche de STEC n'a pu être isolée à partir de quinze échantillons positifs à la PCR pour les gènes *eae* et *stx*. Les STEC O26 (26,3 %) dans la présente étude sont considérés comme étant potentiellement hautement pathogène car ils sont classés dans le groupe des « EHEC typiques majeurs ». Ce sont des agents pathogènes émergents rencontrés à l'échelle mondiale (EFSA, 2011 ; EFSA, 2012). Le O26 est le deuxième séro groupe le plus fréquemment signalé en Europe après le O157 (EFSA, 2016). Cent vingt-sept souches O26 ont été isolées à partir de patients présentant un SHU en Europe (Bielaszewska *et al.*, 2013). Elles ont été à l'origine d'éclosion de flambées épidémiques dans 66 % des cas aux États-Unis (Luna-Gierke *et al.*, 2014). Le même profil génotypique du O26 portant les gènes eae^+ stx_1^+ , mis en évidence dans la présente étude ; a été isolé chez un patient présentant un SHU (Mora *et al.*, 2012) et de patients diarrhéiques en Chine par Bai *et al.*, (2016). Cela confirme le fait que sa présence sur les surfaces des carcasses ovines représente bel et bien un risque potentiel pour l'homme.

Des dix-neuf STEC isolés lors de la présente étude, quatorze appartiennent à des sérogroupes autres que les sérogroupes recherchés. Cinq sur les quatorze (35,71 %) sont qualifiés de potentiellement pathogènes, car présentant les mêmes caractéristiques des EHEC typiques qui sont la possession simultanée des gènes *stx* et *eae* (Anses, 2017). Cette combinaison génétique confère à la bactérie une virulence accrue, se traduisant par des manifestations cliniques plus

sévères chez les personnes infectées (Werber *et al.*, 2003). Neuf sur les quatorze (64,29 %) portent le gène *stx*₂, soit seul, soit combiné avec d'autres gènes, *stx*₁ et *eae*. La présence du gène *stx*₂ est plus fréquemment associée à un risque accru de développer un SHU (Lu *et al.*, 2014). Quels que soient les sérogroupes, les résultats montrent que les STEC porteurs de gènes de virulence isolés lors de cette étude sont considérés comme potentiellement pathogènes. Ils représentent une menace certaine pour la population vulnérable, si elle venait à consommer cette viande contaminée, avec un risque d'apparition de cas de SHU et même de décès, comme ce fut le cas en Europe et aux États-Unis (Bielaszewska *et al.*, 2013 ; Luna-Gierke *et al.*, 2014).

Citrobacter braakii portant les gènes de virulence *stx*₁⁺*eae*⁺ a été isolé et rapporté lors de cette étude pour la première fois dans le monde. Le gène de virulence *eae* avait déjà été isolé chez *Citrobacter rodentium* (Luperchio et Schauer, 2001 ; Verstraete *et al.*, 2014). Le gène *stx* est présent chez *E. coli*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Acineobacter*, *Campylobacter* et *Citrobacter* (Moore *et al.*, 1988 ; Alperi *et al.*, 2010). Le gène *eae* était initialement porté par un îlot de pathogénicité particulier appelé LEE (Locus of Enterocyte Effacement), situé sur un plasmide de *Shigella spp.* Ensuite le LEE a été acquis par d'autres agents pathogènes, éventuellement via le transfert horizontal de ce plasmide (Donnenberg et Whittam, 2001). Les gènes *stx* sont portés par des éléments génétiques mobiles, les phages, dont le génome s'insère dans le chromosome bactérien (Beutin *et al.*, 1997). Le transfert des phages vers d'autres *E. coli* par transduction a entraîné l'émergence de nouveaux clones de STEC (Quirós et Muniesa, 2017), ainsi que l'acquisition de ces gènes par d'autres espèces bactériennes tel que *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae* (Herold *et al.*, 2004). Cela explique la présence des gènes *eae* et *stx*₁ chez *Citrobacter braakii*, acquis vraisemblablement par un transfert des éléments mobiles codant les facteurs de virulence, c'est-à-dire les plasmides et les bactériophages, à partir d'autres espèces bactériennes. *Citrobacter freundii*, productrice de Shiga-toxine, a été responsable de sévères cas de gastro-entérites et de SHU dans une crèche en Allemagne (Tschape *et al.*, 1995). En conséquence, *Citrobacter braakii* (*eae*⁺ *stx*₁⁺) peut être considéré comme potentiellement pathogène pour l'homme.

Les résultats obtenus lors de ces travaux indiquent que les ovins sont des réservoirs de STEC O157 et non -O157. La viande de mouton est donc une source potentielle d'infections par les STEC chez l'homme en Algérie. Par conséquent, les abattoirs devraient prendre en compte les

STEC dans leurs systèmes de gestion de la sécurité des denrées alimentaires, par la mise en place de mesures de prévention et de contrôle, en amont et pendant les opérations d'abattage, afin d'éviter la contamination de cette denrée dans les abattoirs. Les conséquences du portage des STEC par les ovins sont graves puisque des épidémies d'infections à *E. coli* O157 : H7 et non-O157, liées à des contacts avec des ovins ou à la consommation de la viande de mouton, ont été décrites (Chapman *et al.*, 2000 ; Schilling *et al.*, 2012). En juillet 2002, onze cas de gastro-entérites, dont deux cas compliqués de SHU, ont été identifiés en France chez des personnes ayant consommé de la viande de mouton en méchoui lors d'un mariage (Espié et Vaillant, 2002). La souche de STEC isolée à partir des selles des cas de SHU appartenait au sérotype O148 : H8. En 2006, la consommation de la viande ovine sous forme de saucisses séchées a déjà été à l'origine de dix-sept cas de gastro-entérites, avec dix cas de SHU chez des enfants, dont un mortel, en Norvège. Cet aliment contenait *E. coli* O103 (Schimmer *et al.*, 2008).

V Résistance des STEC O157 et non-O157 aux antibiotiques

Parmi les treize STEC O157 isolés, trois (23,1 %) se sont avérés résistants à la tétracycline, un (7,7 %) résistant aux furanes et un (7,7 %) résistant à la tétracycline et aux furanes. Les huit STEC restants (61,5 %) ne présentaient aucune résistance vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques testés. L'utilisation des furanes en médecine vétérinaire est interdite en Algérie. La résistance de la bactérie aux furanes montrée par cette étude indique que ces substances sont probablement utilisées dans le pays. Ou bien encore que cette antibiorésistance a été acquise avant l'interdiction de l'usage des furanes, et continue à se transmettre d'une génération bactérienne à une autre. Plusieurs travaux ont été réalisés sur la résistance des *E. coli* O157 aux antibiotiques. L'étude réalisée en Jordanie sur la multi-résistance des souches de sérotype O157 : H7 isolées d'ovins a révélé que cinq souches étaient résistantes à l'ampicilline et à la streptomycine, une à la co-trimoxazole, une à l'ampicilline, à l'ampicilline-sulbactame céphalosporines (cefazoline, cefuroxime), à l'aztreonam, aux sulphonamides, au co-trimoxazole, aux aminoglycosides, à la tétracycline et chloramphénicol (Novotna *et al.*, 2005). En Iran, sur les 7,6 % *E. coli* O157: H7 qui ont été isolés, 56 % présentaient une résistance à la gentamycine, 48 % à l'ampicilline, 40 % à l'érythromycine, 16 % à l'amoxicilline, 12 % à la tétracycline, 8 % au chloramphénicol, 8 % à l'acide nalidixique, et 4 % à la streptomycine. Tous les *E. coli* O157 isolés étaient sensibles à la

céfuroxime (Rahimi et Nayebpour, 2012). Au Mexique, neuf souches d'*E. coli* O157:H7 d'origine ovine présentaient une antibiorésistance à un antibiotique parmi les quinze testés (Amézquita-López *et al.*, 2016). En Turquie, aucune des souches d'*E. coli* O157:H7 isolées à partir de carcasses ovines n'a montré de résistance envers l'ensemble des antibiotiques testés (Gencay, 2014). D'après ces résultats, l'on constate que la résistance d'*E. coli* O157 à la tétracycline a été retrouvée par la plupart des études, de même que par la notre. Cela est dû probablement à l'utilisation irrationnelle de cette substance, qui ne peut avoir que des répercussions néfastes sur la santé publique. Les tétracyclines ont été utilisées de façon inappropriée dans les aliments du bétail dans de nombreux pays, ce qui a entraîné l'apparition de résistances chez les travailleurs de secteur (éleveurs, fermiers, abatteurs d'animaux...) et les consommateurs (de viandes, de lait...). Cela a poussé certains pays, comme le Royaume Uni, à interdire l'utilisation de cet antibiotique dans l'alimentation du bétail (Helali, 2002). Six des dix-neuf STEC (31,58 %) isolés après screening moléculaire sont résistants aux antibiotiques appartenant aux différentes classes : penicillines, cephalosporines, aminoglycosides, sulfamides-triméthoprim et tetracyclines. 10,53 % présentent une résistance envers un seul antibiotique, tandis que 21,1 % sont multi-résistants. Ces résultats sont supérieurs aux 15 % enregistrés au Mexique par Amézquita-López *et al.*, (2016). Les taux de multirésistance des souches d'origine ovine isolées en Arabie Saoudite par Sharafa et Shabanaa en 2016 (6,3 %) sont inférieurs aux taux enregistrés dans la présente étude. La résistance aux différentes classes antibiotiques décrites dans ces études témoigne de l'utilisation irrationnelle des antibiotiques incorporés parfois dans l'alimentation du bétail pour améliorer sa croissance (Sarmah *et al.*, 2006), et/ou utilisés à titre sub-thérapeutique dans les élevages intensifs (Van Boeckel *et al.*, 2015). Les STEC isolés à partir des carcasses ovines produites dans les abattoirs étudiés présentent un double danger pour le consommateur. Le premier est lié au pouvoir pathogène des bactéries présentes ; le second à la possibilité de transmission de la bactérie résistante et/ou des gènes de résistance via la viande ovine (Asai *et al.*, 2014). Ceci peut se traduire par des échecs thérapeutiques lors de l'apparition d'une infection donnée, aussi banale soit-elle. Il est donc nécessaire de sensibiliser les éleveurs ainsi que les vétérinaires sur l'importance de l'utilisation rationnelle et appropriée des antibiotiques afin d'assurer la sécurité sanitaire des aliments.

Conclusion, Recommandations et Perspectives

I Conclusion

La première étude entreprise dans le cadre de la réalisation des présents travaux de recherche a permis de révéler la présence des *E. coli* O157 : H7 sur la surface des carcasses ovines produites dans deux abattoirs de la wilaya d'Alger. L'identification biochimique des bactéries isolées a montré que 23,08 % des isolats présentaient un profil phénotypique peu commun à ce sérotype, consistant en la capacité à fermenter le sorbitol et à produire la β -glucuronidase. Les résultats obtenus renforcent les données avancées dans la littérature relatives aux propriétés biochimiques des *E. coli* O157 : H7. La caractérisation moléculaire des bactéries isolées a abouti à la mise en évidence de l'existence de profils génotypiques différents, avec une prédominance du gène *stx*₂, connu pour être extrêmement cytotoxique, conférant à la bactérie qui le porte une virulence accrue.

La deuxième étude a concerné la recherche des STEC O157 et non-O157 à la surface des carcasses ovines par la détection des marqueurs génétiques *stx* / *stx eae*. Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence présomptive de STEC, mais également celle d'autres pathogènes, les EPEC. Ces derniers sont des agents diarrhéogènes, à l'origine d'infections humaines. Le dépistage des gènes codant pour les facteurs de virulence a été suivi d'un isolement bactérien et a abouti à l'identification de STEC O26, mais également à l'isolement d'autres STEC, appartenant à des sérogroupes autres que ceux recherchés. Les STEC O26 sont des agents zoonotiques, classés comme étant « potentiellement hautement pathogènes » de par leur implication dans l'éclosion de flambés épidémiques à travers le monde. Ils sont qualifiés de « EHEC typiques majeurs » lorsqu'ils sont isolés de cas humains. En dehors des STEC, cette étude a permis d'isoler, et cela pour la première fois, une nouvelle espèce bactérienne du genre *Citrobacter braakii*, porteuse des gènes *stx*₁ *eae*. Ce résultat témoigne de la plasticité génomique des *E. coli*, ainsi que celle d'autres espèces bactériennes, dont le transfert horizontal des éléments génétiques mobiles aboutit à l'émergence d'espèces bactériennes avec des profils génotypiques nouveaux.

A la lumière de ces résultats, on peut conclure que les ovins en Algérie sont des réservoirs majeurs de STEC potentiellement pathogènes pour l'homme. Outre leur pouvoir pathogène, leur résistance aux antibiotiques constitue une autre menace en matière de dissémination de souches résistantes. La présence de ces agents sur la surface des carcasses ovines est la

conséquence du non-respect des bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication lors des opérations d'abattage. Afin de prévenir l'éclosion de flambées épidémiques dues aux STEC, une bonne connaissance de l'épidémiologie de ces pathogènes en Algérie, une bonne mise en oeuvre des règles générales d'hygiène sur toute la filière « viande », depuis l'élevage jusqu'à la distribution, ainsi qu'une utilisation rationnelle des antibiotiques, doivent conduire à diminuer les taux de contamination de la viande. Cela d'autant plus que le système moderne de contrôle des denrées alimentaires a recentré les stratégies de sécurité sanitaire des aliments sur la prévention plutôt que, comme de par le passé, sur la riposte et le redressement de la situation après qu'une denrée contaminée ait été mise sur le marché. Les actions à développer sont d'une part des mesures préventives générales s'intégrant dans une démarche de type assurance-sécurité (bonnes pratiques d'hygiène) et d'autre part des actions plus spécifiques à la maîtrise de cette prévention, par l'analyse des risques.

II Recommandations

La prévention des infections humaines à STEC présente de multiples facettes. Elle est cependant essentiellement orientée vers les filières animales par le fait que les animaux en sont les réservoirs les plus importants. Pour les viandes et les produits carnés, les procédures, ainsi que la formation aux bonnes pratiques d'hygiène des employés des abattoirs, doivent permettre de réduire le plus possible les risques aux étapes dangereuses de la transformation de l'animal en viande. Le respect strict des règles d'hygiène générale, avec limitation des contaminations fécales au cours de la production primaire des denrées alimentaires, est un prérequis essentiel. Au cours de cette étude, nous avons relevé quelques anomalies au niveau des abattoirs d'El-Harrach et de Rouiba, que ce soit avant ou après l'abattage des animaux. Les quelques recommandations émises plus bas seront peut être utiles et contribueront à la diminution de la contamination des carcasses. Ces mesures concerneront aussi bien l'éleveur que le personnel d'abattoir ou les services vétérinaires.

- Les STEC semblent pouvoir survivre et rester infectieux pendant plusieurs semaines dans l'environnement (sédiments d'abreuvoir, fèces ou fumier). Le maintien en bon état de propreté des stabulations, le changement régulier de l'eau d'abreuvement et du lisier, aussi bien dans la ferme qu'à l'abattoir, sont indispensables pour minimiser la contamination de l'environnement ;

- Les animaux (ovins, bovins) doivent être acheminés séparément vers l'abattoir, dans de bonnes conditions de transport. En effet, les animaux affaiblis et stressés évacuent plus d'excréments, et donc plus de bactéries potentiellement à l'origine de toxi-infections alimentaires. Le transport constitue donc une étape d'amplification de l'excrétion, de transmission de contaminants d'un animal à l'autre. La peau des animaux issus de troupeaux non porteurs peut se retrouver contaminée par les déjections des animaux porteurs ;
- Le nettoyage et la désinfection des véhicules entre deux chargement d'animaux doivent être rendus obligatoires ;
- La formation aux bonnes pratiques d'hygiène des employés des abattoirs et des personnes impliquées dans la production de la viande crue est indispensable pour réduire la contamination microbienne ;
- Une bonne maîtrise de l'hygiène de l'habillage, pour éviter à la face extérieure de la peau d'entrer en contact avec la viande. Toute incision de la peau doit se faire avec un couteau dédié de façon hygénique ;
- L'hygiène de l'éviscération doit être maîtrisée, cette opération ne devant pas engendrer de souillure sur la carcasse. Avant chaque utilisation, la désinfection des outils d'abattage (couteaux, haches,..) à une température égale ou supérieure à 82 °C est indispensable pour éviter les contaminations croisées ;
- Pendant la période d'attente précédant l'abattage, les animaux sur pied ne doivent pas entrer en contact avec les carcasses, les agents pathogènes présents sur la peau des animaux risquant de contaminer directement ou indirectement (par voie aérienne) la surface de la viande ;
- Des prélèvements doivent être réalisés périodiquement sur les carcasses par les services compétents afin d'y rechercher des contaminants bactériens. Cette démarche devrait permettre d'évaluer le niveau des pratiques d'hygiène, d'apporter les correctifs nécessaires, et de contrôler l'efficacité des mesures mises en oeuvre.

La consommation de denrées contaminées (lait cru, végétaux, eau...) a été aussi incriminée dans l'apparition de cas d'infection à STEC. Pour ces produits des mesures de prévention et de contrôle doivent être adoptées. Afin d'éviter la contamination du lait cru dans les élevages, de grandes précautions d'hygiène doivent être prises lors de la traite des animaux laitiers.

L'introduction de phases de nettoyage et/ou de pasteurisation dans le processus de transformation des produits à base de fruits et légumes constituent un élément clé de la prévention des infections humaines. Cela sans oublier les zones aquatiques et les sources d'eau de boisson, qui doivent être protégées des déjections animales.

Pour conclure, le développement en Algérie de dispositifs d'épidémio-surveillance des infections à STEC pourrait permettre de prévenir la transmission des maladies, mais également de mieux connaître l'origine et les moyens de transmission de ces pathogènes.

III Perspectives

Nos recherches ont permis de détecter et d'isoler des STEC O157 et non-O157 à la surface de carcasses ovines. En Algérie, où la viande ovine est la plus consommée, une étude épidémiologique plus approfondie, visant à mettre en évidence la corrélation entre le portage des STEC par les ovins et la contamination des carcasses à l'abattoir, est à envisager. Elle pourrait porter sur l'analyse des différents facteurs mettant en relation les variations d'âge, de sexe, de race, de saisons... avec la présence de ces pathogènes, et leur circulation dans les élevages.

Hormis la viande, le lait et les produits laitiers sont aussi des vecteurs de contamination par les STEC. Ils ont été impliqués dans de nombreuses épidémies alimentaires de par le monde. Le sérotype le plus souvent incriminé est le O26, le même que celui qui a été isolé à la surface des carcasses ovines lors de notre seconde étude. Ce sérotype pourrait éventuellement être présent dans le lait et ses dérivés. Une recherche effectuée sur ces denrées pourrait également se révéler intéressante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abreham, S., Teklu, A., Cox, E., and Tessema, T. S. 2019. *Escherichia coli* O157:H7: distribution, molecular characterization, antimicrobial resistance patterns and source of contamination of sheep and goat carcasses at an export abattoir, Mojo, Ethiopia. *BMC Microbiology*, 19:215.
- Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.M., Slutsker, L. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.*, 177, 1588–93.
- AFSSA, 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments: Nancy, 220 p.
- AFSSA, 2010. Avis relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis AFSSA du 15 juillet 2008, rendu le 27 mai 2010 – Saisine 2010-SA-0031.
- Aidar-Ugrinovich, L., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Leomil, L., Dahbi, G., Mora, A., Onuma, D.L., Silveira, W.D., Pestana de Castro, A.F. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 297–306.
- Allison, H.E. 2007. Stx-phages: Drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiology*, 2(2):165-74.
- Amézquita-López, B.A., Quiñones, B., Lee, B.G., Chaidez, C. 2014. Virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico. *Front Cell Infect Microbiol*, 31; 4:7.
- Amézquita-López, B.A., Quiñones, B., Soto-Beltrán, M., Lee B.G., Yambao, J.C., Lugo-Melchor, O.Y., Chaidez, C. 2016. Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5, 5-1.
- Ammon, A. 1997. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infection and haemolytic and uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Euro Surveillance*, 2(12).
- Ammon, A., Petersen, L.R., Karch, H. A. 1999. large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157. *Journal of Infectious Diseases*, 179, 1274-1277.
- Anonyme, 1999. Ecllosion d'infection à *E. coli* O157:H7 associée à un cidre de pomme artisanal non pasteurisé- ONTARIO, Canada *Communicable Disease Report*, 25-13.

- Anonyme, 2018. Cas de syndromes hémolytiques et urémiques en lien avec la consommation de fromage reblochon fabriqué par l'entreprise Chabert, Santé Publique France.
- Anonyme, 2019. Epidémie de syndrome hémolytique et urémique (SHU) pédiatrique à *Escherichia coli* O26 en France métropolitaine en lien avec la consommation de fromages Saint Marcellin et Saint Félicien, Santé Publique France.
- Anses. 2011. Caractéristiques et sources d'*E. coli* entérohémorragiques (EHEC).
- Anses. 2017. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la détection des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine.
- Armstrong, G.L., Hollingsworth, J., Morris, J.G. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157: H7 as model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol, Rev*; 18: 29-51.
- Asai, T., Hiki, M., Ozawa, M., Koike, R., Eguchi, K., Kawanishi, M., Kojima, A., Endoh, Y.S., Hamamoto, S., Sakai, M., Sekiya, T. 2014. Control of the development and prevalence of antimicrobial resistance in bacteria of food animal origin in Japan: a new approach for risk management of antimicrobial veterinary medicinal products in Japan. *Food borne Pathogens and Disease*, 11(3), 171-6.
- Bai, J., Paddock, Z. D., Shi, X., Li, S., An, B., Nagaraja, T. G. 2012. Applicability of a multiplex PCR to detect the seven major Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on genes that code for serogroup-specific O-antigens and major virulence factors in cattle feces. *Foodborne Pathog Dis*, 9(6), 541-548.
- Bai, J., Shi, X., Nagaraja, T. G. 2010. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods*, 82, 85-89.
- Bai, X., Bin, H., Yanmei, X., Hui, S., Ailan, Z., Pengbin, B., Shanshan, F., Ruyue, F., Yujuan, J., Hong, W., Qiusheng, G., Xuebin, X., Shan, L., Yanwen, X. 2016. Molecular and Phylogenetic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6,143.
- Bai, X., Wang, H., Xin, Y., Wei, R., Tang, X., Zhao, A., Sun, H., Zhang, W. *et al.* 2015. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. *Int J Food Microbiol*, 200, 31– 38.
- Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., Calderon, R.L. 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *MMWR CDC SurveillSumm* 49: 1-21.

- Basu, D., Li, X. P., Kahn, J. N., May, K. L., Kahn, P. C., Tumer, N. E. 2016. The A1 subunit of Shiga toxin 2 has higher affinity for ribosomes and higher catalytic activity than the A1 subunit Shiga toxin 1. *Infect. Immun*, 84, 149–161.
- Baylis, C.L. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol*, 62, 293–307.
- Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G. 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA*, 272, 1349–53.
- Bennett, A.R., Mac Phee, S., Betts, R.P. 1995. Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef. *Lett. Appl. Microbiol*, 20: 375-379.
- Berger, C. N., Crepin, V. F., Baruch, K., Mousnier, A., Rosenshine, I., Frankel, G. 2012. EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation. *mBio*, 3 (5).
- Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V., Martin, C. 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol*, 39: 3060-3065.
- Bettelheim, K.A., Evangelidis, H., Pearce, J.L., Sowers, E., Strockbine, N.A. 1993. Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J Clin Microbiol*, 31(3):760-1.
- Beutin, L., Fach, P. 2014. Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonhuman Sources and Strain Typing. *Microbiol Spectr*, 2(3).
- Beutin, L. 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res*, 30:285-298.
- Beutin, L. Martin, A. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J. Food Prot*, 75, 408–18.
- Beutin, L., Delannoy, S., Fach, P. 2016. Genetic Analysis and Detection of fliC H1 and fliC H12 Genes Coding for Serologically Closely Related Flagellar Antigens in Human and Animal Pathogenic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol*, 7,135.
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (9):2483-2488.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H. A., Whittam, T. S. 1997. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains

- producing shiga toxins in separate populations of cattle and sheep, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2175-2180.
- Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-Like Toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2559-25.
- Bgoshu. 2000. The investigation report of the Walkerton outbreak of waterborne gastroenteritis. Bruce-Grey-Oewen Sound Health Unit, Ontario.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Aldick, T., *et al.* 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis*, 43 (9): 1160-7.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Bletz, S., Zhang, W., Köck, R., Kossow, A., Prager, R., Fruth, A., Orth-Höller, D., Marejková, M., Morabito, S., Caprioli, A., Piérard, D., Smith, G., Jenkins, C., Curová, K., Karch, H. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clinical Infectious Diseases*, 56(10), 1373-81
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*, 11:671-67.
- Bilei, S., FloresRodas, E.M., Tolli, R., De santis, P., Di domenico, I., Delfrate, S., Palmieri, P., Condoleo, R. 2012. Prevalence of major pathogens on sheep carcasses slaughtered in Italy. *Ital. J. Food Sci*, 24.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Gonzalez, A., Bernardez, M. I., Alonso, M. P., Coira, A., Rodriguez, A., Rey, J., Alonso, J.M., Usera, M. A. 2003. Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans, *Experimental Biology and Medicine*, 228:345-351.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M. P., Gonzalez, E. A., Bernandez, M. I., Blanco, J. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 645-651.
- Bong, J. Lee., Won, Yoon. J. 2016. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South Korea. *J. Prev. Vet. Med*, 40(4): 172-178.
- Bouvet, J., Vernozzy-Rozand, C. 2000. Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxique (VTEC) et des *Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments, *Revue Méd. Vét*, 151 : 907-914.

- Brisabois, A., Gauchard, F., Andral, B., Brugere, H., Espie, E., Roze, S., Vernozy-Rozand, C. 2004. Epidémiologie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine, *Bulletin épidémiologique*, 12.
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., Strockbine, N.A. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis*, 15; 192(8):1422-9.
- Brown, J. A., Hite, D. S., Gillim-Ross, L. A., Maguire, H. F., Bennett, J. K., Patterson, J. J., Comstock, N. A., Watkins, A. K., Ghosh, T. S., Vogt, R. L. 2012. Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serotype O26:H11 Infection at a Child Care Center in Colorado. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 31 (4):379-383.
- Browne, A.S., Midwinter, A.C., Withers, H., Cookson, A. L., Biggs, P. J., Marshall, J. C., Benschop, J., Hathaway, S., Haack, N.A., Akhter, R.N., French, N.P. 2018. *Appl Environ Microbiol*, 2; 84 (14).
- Brugère, H., Auvray, A., Mariani-Kurkdjian, P., King, L.A., Loukiadis, E. 2012. *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Bull. Epid. Santé Anim. Alim*, 50, 23-30.
- Brugère, H., Auvray, F., Mariani-Kurkdjian, P., King, L., Loukiadis, E. 2013. *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Feuillets de Biologie*, 311 : 1- 8.
- Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S., Gouali, M., Le Hello, S., Van Cauteren, D., de Valk, H. 2015. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans. *Santé Publique France*. 1-4.
- Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Bonacorsi, S., Gouali, M., Le Hello, S., Van Cauterend, D., Valk, H. 2016. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2015.
- Bruyand, M., Mariani-Kurkdjian, P., Le Hello, S., Lefevre, S., JourdanDa Silva, N., Nisavanh, A., Mailles, A., Bonacorsi, S., de Valk, H. 2017. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez l'enfant de moins de 15 ans. *Santé Publique France*, 1-5.
- Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H.F., Meyer, D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., Daniel, R. 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology*, 193 (12):883-891.

- Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M.M., Remschmidt C., Wilking, H., Deléré, Y., Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G., Greiner, M., Höhle M., Ivarsson, S., Jark, U., Kirchner, M., Koch, J., Krause, G., Lubert, P., Rosner, B., Stark, K., Kühne, M. 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med*, 10; 365(19):1763-70.
- Burk, C., Dietrich, R., Açar, G., Moravek, M., Bülte, M., Märklbauer E. 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol*, 41: 2106-2012.
- Calderwood, S.B., Akeson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J., Griffin, P.M. 1996. In: Berardin M. Caractérisation de souches d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) isolés de fromages au lait cru français et génotypage des variants stx d'une collection d'*Escherichia coli* O157:H7, 2005.
- Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. 2004. Sampling Methods for Microbiological Analysis of Red Meat and Poultry Carcasses. *Journal of food protection*, 67(6):1303-8.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere H., Oswald, E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 36:289-311.
- CDC. 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach--United States, September 2006. *MMWR.Morb.Mortal.Wkly. Rep.* 55, 1045-6.
- CDC. 2010. Investigation update: multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility.
- Cebula, T. A., Payne, W. L., Feng, P. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 248-250.
- Chahed, A., China, B., Mainil, J., Daube, G. 2006. Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria. *J. Appl Microbiol*, 101: 361-368
- Chapman, P.A. 1995. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *Escherichia coli* O157. *Food control*, 6: 187-193.
- Chapman, P.A., Cornell, J., Green, C. 2000. Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. *Epidemiol Infect*, 125:531-6.
- Chapman, P.A., Wright, D.J., Higgins, R. 1993. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157. *Vet Rec*, 133: 171-172.

- Chart, H., Kenkins, C., Smith, H.R., Hedges, D., Rowe, B. 1998. Haemolysin production by strains of verocytotoxin-production *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*, 141: 103-107.
- China, B. 2000. Attaching and effacing *Escherichia coli*. *Recent. Res. Devel Microbiol*, 4: 1-30.
- China, B., Ghafiri., Daube, G. 2002. Estimation qualitative et quantitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét*, 147, 99-109.
- China, B., Prison, V., Mainil, J. 1996. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol*, 62, 3462-3465.
- Chui, L., Li, V., Fach, P., Delannoy, S., Malejczyk, K., Patterson-Fortin, L. 2015. Molecular profiling of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans and cattle in Alberta, Canada. *J. Clin. Microbiol*, 53, 986–990.
- Clement, S.A., Young, J. C., Constantinou, N., Frankel, G. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3:2, 71 – 87.
- Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G., Vugia, D.J., 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann. Intern. Med*, 130, 202–9.
- Coimbra, R.S., Grimont, F *Et al.* 2000. Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res. Microbiol*, 151:639-654.
- Croxen, M. A ET Finlay, B. B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol*, 8:26-38.
- Croxen, M. A., Law,R. J., Scholz,R., Keeney,K. M., Wlodarska,M., & Finlay,B. B. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 4, 822–880.
- De Rycke, J. 1991. Les colibacilles producteurs de cytotoxines : importance en médecine vétérinaire et en santé publique, *ANN Rech Vét*, 22 : 105-126 ;
- De Zutter, Uradzinski, J. 1997. Evaluation of a short non selective enrichment step for the isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from artificially contaminated cattle faeces. Abstracts of the second international symposium of the European study group on Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Acta.Clin. Belg*; 54 (1), 48.
- Djaout, A., Afri-Bouzebda, F., Chekal, F., El-Bouyahiaoui, R., Boubekeur, A., Bendir, M., AmeurAmeur, A., Gaouar, S.B.S. 2017. Etat de la biodiversité des « races » ovines Algériennes, *Genetics and Biodiversity Journal*, 1(1), 1-17.

- Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J., Kaper, J. B. 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest*, 92, 1418–1424.
- Doublet, B. 2004. Thèse pour obtention de grade de Docteur de l'université de Tours : caractérisation des éléments mobiles du gène de résistance au florfénicol *flor R* chez *Salmonella* et *Escherichia coli*, , 249p.
- Doyle, M.P., Schoeni, J.L. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*, 48: 855-856.
- Edelstein, M., Sundborger, C., Hergens, M.-P., Ivarsson, S., Dryselius, R., Insulander, M., Jernberg, C., Hutin, Y., Wallensten, A., 2014. Barriers to Trace-back in a Salad-associated EHEC Outbreak, Sweden, June 2013. *PLoS Curr*.
- EFSA. 2016. Multi-country outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with haemolyticuraemic syndrome. *Supporting publication*, 13 (4).
- EFSA. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009, EFSA Journal, vol. 9 pg.
- EFSA.2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal, vol. 10 pg. 259
- Eklund, M., Scheutz, F. and Siitonen, A. 2001. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J. Clin. Microbiol*, 39:2829-2834.
- Escherich, T. 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings,. In: Pohl. P. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann. Méd. Vét*, 1993, 137, 325-333.
- Espié, E., Vaillant, V. 2002. Toxi-infection alimentaire collective à *Escherichia coli* O148 :H8 producteur de shigatoxines ; *Rapport d'investigation* ; Institut De Veille Sanitaire, Gironde.
- Espié, E., Grimont, F., Pihier, N., Debré, H.R., Pasteur, I., 2008. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows, cheese, France. 11, 94415.
- Espie, E., Grimont, F., Vaillant, V., Montet, M. P., Carle, I., Bavai, C., de Valk, H., VernozyRozand, C. 2006. O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(10):992-998.
- Euzeby, J.P. 2007. Dictionnaire de bacteriologie vétérinaire. 1998-2007, posting date.

- FAO/OMS. 2018. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring.
- Feng, E. P., Weagant, S. D., Jinneman, K. 2011. BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France, 2005 11, 94415.
- Feng, P., Lampel, K. A., Karch, H., Whittam, T. S. 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis*, 177:1750-1753.
- Ferreira, M.R.A., Silva, T.S., Stella, A.E., Conceição, F.R., Reis, E.F., Moreira, C.N. 2015. Detection of virulence factors and antimicrobial resistance patterns in Shiga toxin- producing *Escherichia coli* isolates from sheep. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35, 775-780.
- Frank, C., D. Werber, J. P., Cramer, M. Askar., M., Faber., M., Heiden, H., Bernard, A., Fruth, R., Prager, A., Spode, M., Wadl, A., Zoufaly, S., Jordan, M. J., Kemper, P., Follin, L., Müller, L. A., King, B., Rosner, U., Buchholz, K., Stark, G., Krause, H. I. Team. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxinproducing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England Journal of Medecine*. 365 (19):1771-1780.
- Freedman, S.B., Xie, J., Neufeld, M.S., Hamilton, W.L., Hartling, L., Tarr, P.I., Nettel-Aguirre, A., Chuck, A., Lee, B., Johnson, D., *et al.* 2016. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infection, Antibiotics, and Risk of Developing Hemolytic Uremic Syndrome: A Meta-analysis. *Clin. Infect. Dis*, 62, 1251–1258.
- Frezen, P. D., Drake, A. *et al.* 2005. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *J. Food Prot*, 68: 2623-263 in *bioniche life science, INC*.
- Gencay, Y. E. 2014. Sheep as an important source of *E. coli* O157/O157:H7 in Turkey, *Veterinary Microbiology*, 172, 590–595.
- Gill, C. O et Jones, T. 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *J Food Prot*, 63:167-173.
- Goodship, T. Hj. 2004. Génétique et physiopathologie du syndrome hémolytique et urémique (SHU) et du purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). *Flammarion Médecine-Sciences_Actualités néphrologiques*, 58- 65.
- Gouali, M., Ruckly, C., Carle, I., Lejay-Collin, M., Weill, F.X. 2013. Evaluation of CHROM agar STEC and STECO104 chromogenic agar media for detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in stool specimens. *J Clin Microbiol*, 51 (3): 894-900.
- Gould, L.H., Mody, R.K., Ong, K.L., Clogher, P., Cronquist, A.B., Garman, K.N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N.L., Webb, T.H., White, P.L., Wymore, K., Gierke, R.E., Mahon, B.E., Griffin, P.M. 2013. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis*, 10(5):453-60.

- Grad, Y.H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H.M., Cerqueira, G.C., Fitzgerald, M., Godfrey, P., Haas, B.J., Murphy, C.I., Russ, C., Sykes, S., Walker, B.J., Wortman, J.R., Young, S., Zeng, Q., Abouelleil, A., Bochicchio, J., Chauvin, S., Desmet, T., Gujja, S., McCowan, C., Montmayeur, A., Steelman, S., Frimodt-Møller, J., Petersen, A.M., Struve, C., Krogfelt, K.A., Bingen, E., Weill, F.-X., Lander, E.S., Nusbaum, C., Birren, B.W., Hung, D.T., Hanage, W.P., 2012. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 109, 3065–70.
- Grif, K., Orth, D., Lederer, I., Berghold, C., Roedl, S., Mache, C. J., Dierich, M. P., Wurzner, R. 2005. Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24 (4):268-271.
- Griffin, P.M et Tauxe, R.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev*, 13: 60-92.
- Grimont, P.A.D. 1987. Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine Mal. Infect.* 17, 6–10.
- Gyles, C.L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : an overview. *J Anim Sci.*, 85:E45-62.
- Hall, G., Kurosawa, S., Stearns-Kurosawa, D.J. 2017. Shiga Toxin Therapeutics: Beyond Neutralization. *Toxins (Basel)*, 19; 9(9).
- Havelaar, A.H et Swart, A.N., 2014. Impact of acquired immunity and dose-dependent probability of illness on quantitative microbial risk assessment. *Risk Anal*, 34:1807–1819.
- Helali, A. 2002. Pharmacologie fondamentale et Clinique à l’usage des étudiants en médecine, *Santé Collection*, ENAG/ éditions, 183p.
- Herold, S., Karch, H., Schmidt, H. 2004. Shiga. toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology*, 94, 115-21
- Hilborn, E.D., Mshar, P.A., Fiorentino, T.R., Dembek, Z.F., Barrett, T.J., Howard, R.T., Cartter, M.L., 2000. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol. Infect*, 124, 31–6.
- Hong, S., Song, S.E., Oh, K.H., Kim, S.H., Yoo, S.J., Lim, H.S, Park, M.S. 2011. Prevalence of Farm and Slaughterhouse Workers Carrying Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Korea. *Osong Public Health Res Perspect*, 2:198–201
- Hong, W., Wu, Y. E., Fu, X., Chang, Z. 2012. Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. *Trends Microbiol*, 20, 328–335.

- Honish, L., Punja, N., Nunn, S., Nelson, D., Hislop, N., Gosselin, G., Stashko, N., Dittrich, D. 2017. Escherichia coli O157:H7 Infections Associated with Contaminated Pork Products - Alberta, Canada, July-October 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65:1477-81.
- Hu, J et Torres, A.G. 2015. Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect*, 21:729-734
- Hunt, J.M. 2010. Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC). *Clin Lab Med*, 30(1), 21-45.
- Hussein, S et Bollinger, L.M. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing Escherichia coli in beef cattle. *Journal of Food Protection*, 68(10), p.2224-2241.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Reid, C.A., Avery, S.M., Wilson, D., Howell, M., Johnston, A., Buncic, S. 2005. A comparison of wet-dry swabbing and excision-sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of food protection*, 68 (10): 2155-2162.
- Hyland, R. M., Sun, J., Griener, T. P., Mulvey, G. L., Klassen, J. S., Donnenberg, M. S., Armstrong, G. D. 2008. The bundlin pilin protein of enteropathogenic Escherichia coli is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol*, 10:177-87.
- Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M., Hayashi, T., Thomson, N.R. 2015. A complete view of the genetic diversity of the Escherichia coli O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA. Res*, 22, 101–7.
- InVS. 2012. Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique dans le Nord-Pas-de-Calais et la Picardie. Situation au 12 juillet 2011.
- ISO. 16654.2001. Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des Escherichia coli O157.
- ISO/TS13136.2012. Microbiologie des aliments — Méthode basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Méthode horizontale pour la détection des Escherichia coli producteurs de Shigatoxines (STEC) et la détermination des sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145.
- ISO/TSO.17604.2003. Microbiologie des aliments- prélèvements d'échantillons sur des carcasses en vue de leur analyse microbiologique, ISO, Suisse.
- Jacob, M. E., Bai, J., Renter, D. G., Rogers, A. T., Shi, X., Nagaraja, T. G. 2014. Comparing real-time and conventional PCR to culture-based methods for detecting and quantifying Escherichia coli O157 in cattle feces. *J Food Prot*, 77(2), 314-319.

- Jacob, M. E., Foster, D. M., Rogers, A. T., Balcomb, C. C., Sanderson, M. W. 2013. Prevalence and relatedness of *Escherichia coli* O157:H7 strains in the feces and on the hides and carcasses of U.S. meat goats at slaughter. *Appl Environ Microbiol*, 79(13), 4154-4158.
- James, C. E., Stanley, K. N., Allison, H. E., Flint, H. J., Stewart, C. S., Sharp, R. J., Sounders, J., R. & McCarthy, A. J. 2001. Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4335-4337.
- Jari, J.H., Anja, S., Suvi-Sirkku, K. 2012. Usability and Performance of CHROMagar STEC Medium in Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 3586-3590.
- Jarvis, K. G ET Kaper, J. B. 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* 64, 4826–4829.
- Jerse, A.E ET Kaper, J.B. 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun*, 59: 4302-4309.
- Johnson, J.L., Rose, B.E., Sharar, A.K., Ranson, G.M., Lattuada, C.P., Mcnamara A.M. 1995. Methods used for detections and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a foodborne disease outbreak. *J. Food. Protect*, 58: 597-603.
- Joly, B ET Reynaud. 2003. Entérobactéries, systématique et méthodes de diagnostic. Monographie de microbiologie, 2^{ème} édition. TEC&DOC, 356p.
- Jones, G., Lefèvre, S., Donguy, M.P., Nisavanh, A., Terpant, G., Fougère, E., Vaissière, E., Guinard, A., Mailles, A., de Valk, H., Fila, M., Tanné, C., Le Borgne, C., Weill, F.X., Bonacorsi, S., Jourdan-Da Silva, N., Mariani-Kurkdjian, P. 2019. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. *Euro Surveill*, 24(22).
- Kalchayanand, N., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Guerini, M.N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M. 2007. Microbiological characterization of lamb carcasses at commercial processing plants in the United States. *J. Food Prot*, 70, 1811–1819.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol*, 2, 123–140.
- Karch, H ET Meyer, T. 1989. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-toxin producing *Escherichia coli*. *J. Clin.Microbiol*, 27, 1180-1186.

- Karch, H ET Meyer, T. 1989. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 27(12):2751-7.
- Karch, H. 1999. Origin of EHEC. Abstracts of the second international symposium of the European study group on Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Acta.Clin. Belg*, 54(1): 48.
- Karch, H., Russmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Heesemann J. 1995. Long-term shedding and clonal turnover of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J. Clin. Microbiol*, 33: 1602-1605.
- Karmali, M. A., Gannon, V., Sargeant, J. M. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*, 140, 360–370.
- Karpman, D., Loos, S., Tati, R., Arvidsson, I. 2017. Haemolytic uraemic syndrome. *J. Intern. Med*, 281, 123–148.
- Kauffmann, F. 1947. The serology of the coli group. *J. Immunol*, 57, 71.
- Keen, J. E., Wittum, T. E., Dunn, J. R., Bono, J. L., Durso, L. M. 2006. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in Agricultural Fair Livestock, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 780-786.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., Finlay, B.B. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, 91: 511-520.
- King, L. A., F., Nogareda, F. X. Weill, P., Mariani-Kurkdjian, E., Loukiadis, G., Gault, N., JourdanDaSilva, E., Bingen, M., Macé, D., Thevenot, N., Ong, C., Castor, H., Noël, D., Van Cauteren, M., Charron, V., Vaillant, B., Aldabe, V., Goulet, G., Delmas, E., Couturier, Y., Le Strat, C., Combe, Y., Delmas, F., Terrier, B., Vendrely, P., Rolland., de Valk, H. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (11):1588-1594.
- King, L.A., Filliol-Toutain, I., Mariani-Kurkidjian, P., Vaillant, V., Vernozzy-Rozand, C., Ganet, S., Pihier, N., Niaudet, P., De Valk, H. 2010. Family outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O123: H-, France, 2009. *Emerg. Infect. Dis*, 16, 1491–3.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S. 1989. Actin accumulation at sites bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 57, 1290-1298.
- Koch, C., Hertwig, S., Lurz, R., Appel, B., Beutin, L. 2001. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stxOx3* gene which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J. Clin. Microbiol*, 39, 3992-3998

- Kohli, H.S., Chaudhuri, A.K., Todd, W.T., Mitchell, A.A., Liddell, K.G.A. 1994. Severe outbreak of *E. coli* O157 in two psychogeriatric wards. *J Public Health Med*, 16: 11-15.
- Konowalchuck, J., Speirs, J.I., Stavric, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun*, 18:775-779.
- Krüger, A., Lucchesi, P.M.A. 2015. Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology*, 161, 451–462
- Kudva, I.T., Hatfield, P.G., Hovde, C.J. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol*, 34: 431- 433.
- Lapeyraque, A.L., Malina, M., Fremaux-Bacchi, V., et al. 2011. Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med*; 364(26): 2561-3.
- Lauvrak, S., Torgersen, M. L., Sandvig, K. 2004. Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *Journal of Cell Science*, 117(Pt11):2321-31.
- Le Bouguenec, C., Servin, Al. 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol. Lett*, 256:185–194.
- Le minor, L et Veron, N. 1989. Bactériologie Médicale. *Flam. Med. Science*, Paris. Pages : 318-333-773-823.
- Leclerc, V., Le Querrec, F., Andral, B., Vernozy-Rozand, C. 2002. Epidémiologie des *Escherichia coli* vérocytotoxiques et alimentation. *Bulletin épidémiologique*, 4.
- Lee, J. B et Yoon, J.W. 2016. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South Korea. *J. Prev. Vet. Med*, 40, 4: 172-178.
- Lenahan, M., O'Brien, S., Kinsella, K., Sweeney, T., Sheridan, J.J. 2007. Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 on Irish lamb carcasses, fleece and in faeces samples. *J.App. Microbiol*, 103, 2401–2409.
- Leopold, S. R., Dobrindt, U., Karch, H., Mellman, A. 2014. Genomic plasticity and the emerge of new pathogenic *Escherichia coli*. In: *Pathogenic Escherichia coli* (pp.445-52). ISBN: 978-1-908230-37-9. Norfolk, U.k.
- Levine, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis*, 1987. 155:377–389
- Leyral, G et Vierling, E. 1997. Microbiologie et toxicologie des aliments. Hygiène et sécurité alimentaire. Bioscience et technologie. 2^{ème} édition. Doin, 272p.

- Liang, J.L., Dziuban, E.J., Craun, G.F., Hill, V., Moore, M.R., Gelting, R.J., Calderon, R.L., Beach, M.J., Roy, S.L. 2006. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking--United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ*, 55: 31-65.
- Lin, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S., Takeda, Y. 1993. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. In: AFSSA. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments: Nancy, 2003, 220 p.
- Lindblad, M. et Lindqvist, R. 2010. Modelling time to growth of *Escherichia coli* as a function of water activity and undissociated lactic acid. *Lett Appl Microbiol*, 50(3):308-13.
- Lior, H. 1994. Classification of *Escherichia coli*. In: Mainil J (a). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Les adhésines et facteurs de colonisations. *Ann. Méd. Vét*, 2003;147 :105-126.
- Loirat, C et Taylor, C.M. 2004. Hemolytic uremic syndromes. In: Pediatric Nephrology, Avner ED, Harmon WE, Niaudet P Eds, Lippincott Williams and Wilkins, 5th edition, pp 887-915.
- Loirat, C., Mariani-Kurkdjian, P., Fremeaux-Bacchi, V. 2013. Le syndrome hémolytique et urémique. *Arch Pédiatr*, 20: 827-30.
- Lu, X., Skurnik, D., Pozzi, C., Roux, D., Cywes-Bentley, C., Ritchie, J. M., Pier, G. B. 2014. A Poly-N-acetylglucosamine-Shiga toxin broad-spectrum conjugate vaccine for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *MBio*, 5(2), e00974-00914.
- Luperchio, S.A., Schauer, D.B. 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes and Infection*, 3, 333-40.
- Madzingira, O. 2016. Shiga toxin-producing *E. coli* isolated from sheep in Namibia. *J Infect Dev Ctries*, 10(4):400-403.
- Mainil, J. 2003a. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Les adhésines et facteurs de colonisations, *Ann. Méd. Vét*, 147 :105-126.
- Mainil, J. G., Daube, G. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol*, 98, 1332-1344.
- Mainil, J. 2003b. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Franchissement des muqueuses et propriétés invasives, *Ann. Méd. Vét*, 147 : 159-171
- Majowicz, S.E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J.M., Stapleton, J., Angulo, F.J., Yeung, D.H., Kirk, M.D. 2014. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia*

coli infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis*, 11:447-55.

Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, É. 2012. Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation* 21, 268-279.

Marin, J.M., Maluta, R.P., Borges, C.A., Beraldo, L.G., Maesta, S.A., Lemos, M.V.F., Ruiz, U.S., Ávila, F.A., Rigobelo, E.C. 2014. Fate of non O157 Shigatoxigenic *Escherichia coli* in ovine manure composting. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 1771-1778.

Martínez-Castillo, A., Allué-Guardia, A., Dahbi, G., Blanco, J., Creuzburg, K., Schmidt, H., Muniesa, M. 2012. Type III effector genes and other virulence factors of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from wastewater. *Environmental Microbiology Reports*, 4 (1):147-155.

Matthew Croxen, A., Robyn Law, J., Roland Scholz., Kristie Keeney, M., Marta Wlodarska., Brett Finla, B. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev*, 26, 4 822-880.

Mazzette, R., Mureddu, A., Busia, G., Mazza, R., Lamon, S., Meloni, D. 2012. Prevalence of verocytotoxin-Producing *E. coli* in Sheep Meat at a Slaughterhouse. *Veterinary Science*, (pp. 161-165).

McIntyre, L., Fung, J., Paccagnella, A., Isaac-Renton, J., Rockwell, F., Emerson, B., Preston, T., 2002. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Canada Commun. Dis. Rep. = Relev. des Mal. Transm. au Canada*, 28, 6– 8.

Melton-Celsa, A.R et O'Brien, A.D. 2000. Shiga Toxins of *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli*. *Hand book Experiment. Pharm*, 145:385-406.

Melton-Celsa, A.R. 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectrum*, 2 (3): EHEC-20024-2013.

Mersha, G., Asrat, D., Zewde, B.M., Kyule, M. 2010. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in faeces, skin and carcasses from sheep and goats in Ethiopia. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 71–76

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., Yanagawa, H., 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol*, 150, 787–96.

Milon, A. 1993. Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *Escherichia coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal. *Revue Méd. Vét*, 144 : 857-878.

- Miraglia, D., Ranucci, D., D'ovidio, V., Branciarì, R., Severini, M. 2005. Comparison between carcass Microbial load Recovered by Swabbing surfaces of different size and Using the Reference Excision Method. *Veterinary Research Communications*, 29: 339-341
- Momtaz, H., Farzan, R., Rahimi, E., Sa farpoor Dehkordi, F., Souod, N. 2012. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. *The Scientific World Journal*, 2012, 231342.
- Mora, A., López, C., Dhahi, G., López-Beceiro, A. M., Fidalgo, L.E., Díaz, E.A., *et al.* 2012. Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2578–2585.
- Mora, F.X., Aviles-Reyes, R.X., Guerrero-Latorre, L. and Fernandez-Moreira, E. 2016. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in children under five years old with diarrhea in Quito (Ecuador). *Int. Microbiol*, 19, 157–160.
- Nagano, H., Hirochi, T., Fujita, K., Wakamoni, Y., Takeshi, K., Yano, S. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of β -glucuronidase-positive Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer (Cerfs). *Journal of Medical Microbiology*, 53: 1037-1043.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbio. Rev*, 11: 144-201.
- Nauta, M.J et Dufrenne, J. 1999. Variability in growth characteristics of different *E.coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant. Microbiol*, 1: 137-155.
- Navarro-Garcia, F. 2015. *Escherichia coli* O104: H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. In: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other Shigatoxin producing *E. coli* (pp.505-529). *Microbiology spectrum*, 2(6).
- Naylor, S. W., Gally, D. L., Low, J. C. 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*, 295(6-7):419-41.
- NCCLS. 1993. Suggested Modifications of Standards Methods for Susceptibility Testing of Some Fastidious and Special Problem Bacteria. M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Neisser, M et Shiga, K. 1903. Lieber freie Rezeptoren von Typhus- und Dysenterie-Bazillen und ueber das Dysenterie Toxin. *Dtsch. Med, Wochenschr.* 29: 61–62

- Novotna, R., Alexa, P., Hamrik, J., Madanta, A., Smola, J., Cizek. 2005. Isolation and characterization Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep and goats in Jordan with evidence of multiresistant serotype O157: H7. *Vet. Med.-Czech*, 50(3): 111-118.
- Nyholm, O., Halkilahti, J., Wiklund, G., Okeke, U., Paulin, L., Auvinen, P., Haukka, K., Siitonen, A. 2015. Comparative Genomics and Characterization of Hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains. *Plos One*, 10 (8):e0135936.
- O'Brien, A.D et Melton-Celsa, A.R. 2014. New Therapeutic Developments against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol.Spectr*, 2.
- O'Brien, S.J., Adak, G.K., Gilham, C., 2001. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg. Infect. Dis*, 7, 1049–51.
- O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., Formal, S.B. 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. (*Letter*).*Lancet*, 1:702.
- Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C., Mercado, E. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(9):852-6.
- O'Loughlin, E.V Robins-Browne, R.M. 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins oneukaryotic cells. *Microbes Infect*, 3(6), 493-507
- Orr, P., Lorencz, B., Brown, R., Kielly, R., Tan, B., Holton, D., Clugstone, H., Lugtig, L., Pim, C., Macdonald, S., Hammond, G., Moffatt, M., Spika, J., Manuel, D., Winther, W., Milley, D., Lior, H., Sinuff, N. 1994. An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand. J. Infect. Dis*, 26, 675–684.
- Orth, D., Grif, K., Khan, A.B, *et al.* 2007. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 59 (3): 235-42.
- Pacheco, A. R., Sperandio, V. 2012. Shiga toxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli*:
- Paddock, Z., Renter, D. G., Cull, C. A., Shi, X., Bai, J., Nagaraja, T. G. 2014. *Escherichia coli* O26 in Feedlot Cattle: Fecal Prevalence, Isolation, Characterization, and Effects of an *E. coli* O157 Vaccine and a Direct-Fed Microbial. *Foodborne Pathog Dis*, 11(3), 186-193.
- Paddock, Z., Shi, X., Bai, J., Nagaraja, T. G. 2012. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet Microbiol*, 156(3-4), 381-388.

- Padhye, N.V., Doyle, M.P. 1992. *Escherichia coli* O157:H7. Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in foods. *J. Food. Protect*, 55: 555-565.
- Paton, A., Ratcliff, R., Doyle, R., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J., Paton, J., 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic- uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga- like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol*, 34, 1622–1627
- Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., Paton, J.C. 2001. Characterization of saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun*, 69, 6999-7009.
- Peng, S., Tasara, T., Hummerjohann, J., Stephan, R. 2011. An overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production. *J Food Prot*, 74, 849–864.
- Pennington, H. 2010. *Escherichia coli* O157. *Lancet*, 23; 376(9750):1428-35.
- Pennington, T. H. 2014. *E. coli* O157 outbreaks in the United Kingdom: past, present, and future. *Infect Drug Resist*, 7: 211–222.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P. 2007. Screening food raw materials for the presence of the world's most clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 284-8.
- Phillips, A.D, Frankel, G. 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis*, 181: 1496-1500.
- Phillips, D., Tholath, S., Jenson, I., Sumner, J. 2013. Microbiological quality of Australian sheep meat in 2011. *Food Control*, 31, 291–294.
- Pohl, P. 1993. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann. Méd. Vét*, 137 : 325-333.
- Quilliam, R. S., Chalmers, R. M., Williams, A. P., Chart, H., Willshaw, G. A., Kench, S. M., Edwards-Jones, G., Evans, J., Thomas, D. R., Salmon, R. L., Jones. D. L. 2012. Seroprevalence and Risk Factors Associated with *Escherichia coli* O157 in a Farming Population. *Zoonoses and Public Health*, 59(2):83-88.
- Quirós, P., Muniesa, M. 2017. Contribution of cropland to the spread of Shiga toxin phages and the emergence of new Shiga toxin-producing strains. *Scientific Reports*, 10, 7, 7796.
- Rahimi, E, Nayeypour, F. 2012. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157:H7/NM isolated from feces of ruminant animals in Iran. *Journal of Cell and Animal Biology*, 6(6), 104-108.

- Rahimi, E., Kazemeini, H. R., Salajegheh, M. 2012. *Escherichia coli* O157:H7/NM prevalence in raw beef, camel, sheep, goat, and water buffalo meat in Fars and Khuzestan provinces, Iran. *Veterinary Research Forum*, 3, 13 – 17.
- Raji, M., Minga, U., Machangu, R. 2006. Current Epidemiological status of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Africa. *Chin Med J (Engl)*, 119, 217–222.
- Ramos Moreno, A. C., Cabilio Guth, B. E., Baquerizo Martinez, M. 2006. Can the fliC PCR-restriction fragment length polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing the H antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains? *J Clin Microbiol*, 44, 1453–1458.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N. R., Chaudhuri, R., Henderson, I. R., Sperandio, V., Ravel, J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*, 190:6881-93.
- Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S.A., Hii, J., Mcewens, S., Gyles C.L. 1992. Polymerase chain reaction for detection of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources, In: Bouvet. J Et Vernozy-Rozand. 2000. C. Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxique (VTEC) et des *Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments, *Revue Méd. Vét*, 151 : 907-914.
- Remuzzi, G., Ruggenti, P. 1995. The hemolytic uremic syndrome, *Kidney Int*, 47: 2-19.
- Remuzzi, G., Ruggenti, P. 2000. Traitement du syndrome hémolytique et urémique de l'adulte, *Flammarion Médecine- Sciences_ Actualités néphrologiques*, 218- 226.
- Rey, J., Sanchez, S., Blanco, J.E., Hermoso De Mendoza, J., Hermoso De Mendoza, M., Garcia, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J.M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 212-217.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., Mcgee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, 308: 681-685.
- Rosales, A., Hofer, J., Zimmerhackl, L.B., Jungraithmayr, T.C., Riedl, M., Giner, T., Strasak, A., Orth-Höller, D., Würzner, R., Karch, H. 2012. Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin Infect Dis*, 54:1413–1421.
- Rousset, E., Dubreuil, D. 2000. Les récepteurs des entérotoxines bactériennes, *Vet. Res*, 33 : 413-435

- Russo, T. A et Johnson, J. R., 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis*, 181:1753-4.
- Ryan, C.A., Tauxe, R. V., Hoses, G.W., Wells, J.G., Stoesz, P.A., McFadden, H.W., Smith, P.W., Wright, G.F., Blake, P.A. 1986. *Escherichia coli* O157:H7 Diarrhea in a Nursing Home: Clinical, Epidemiological, and Pathological Findings. *J. Infect. Dis*, 154, 631–638.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725-59.
- Scheiring, J, Andreoli, S.P, Zimmerhackl, .LB. 2008. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated haemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*, 23: 1749-60.
- Scheutz, F. 2014. Taxonomy meets public health: the case of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(3).
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., *et al.* 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol*, 50 2951–2963.
- Schilling, A. K., Hotzel, H., Methner, U., Sprague, L. D., Schmoock, G., El-Adawy, H., Geue, L. 2012. Zoonotic agents in small ruminants kept on city farms in southern Germany. *Appl Environ Microbiol*, 78(11), 3785-3793.
- Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H.M., Lassen, J., Lindstedt, B.A., Brandal Lin, T., Kapperrud, G., Aavitsland, P. 2008. Outbreak of haemolyticuraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infectious Diseases*, 8, 41.
- Schmidt, H., Rüßman, H., Schwarzkopf, A., Aleksic, S., Heesemann, J., Karch, H. 1994. Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Zentralbl Bakterio*, 281: 201-213
- Sekse, C., O’Sullivan, K., Granum, P.E., Rørvik, L.M., Wasteson, Y., Jørgensen, H.J. 2009. An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25 - bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *Int. J. Food Microbiol*, 133, 259–64.
- Sellier-Leclerc, A.L., Fremeaux-Bacchi, V., Dragon-Durey, M.A, *et al.* 2007. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical haemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 18:2392–400.
- Sharaf, E.F et Shabana, I.I. 2016. Prevalence and molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from human and sheep in Al-Madinah Al-Munawarah. *Asociacion Colombiana De Infectiologia*, 81-87.

- Shi, W.W., Mak, A.N.S., Wong, K.B., Shaw, P.C. 2016. Structures and Ribosomal Interaction of Ribosome-Inactivating Proteins. *Molecules*, 21, 1588.
- Siegler, R et Oakes, R. 2005. Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr Opin Pediatr*, 17:200–4
- Söderlund, R., Hedenström, I., Nilsson, A., Eriksson, E., Aspán, A. 2012. Genetically similar strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from sheep, cattle and human patients. *BMC Vet Res*, 24; 8:200.
- Söderström, A., Lindberg, A., Andersson, Y., 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *Euro Surveill. Bull.*
- Son, I., Binet, R., Maounounen-Laasri, A., Lin, A., Hammack, T. S., Kase, J. A. 2014. Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR. *Food Microbiol*, 40, 31-40.
- Stearns-Kurosawa, D.J., Oh, S.Y., Cherla, R.P., Lee, M.S., Tesh, V.L., Papin, J., Henderson, J., Kurosawa, S. 2013. Distinct Renal Pathology and a Chemotactic Phenotype after Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga Toxins in Non-Human Primate Models of Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Pathol*, 182, 1227–1238.
- Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K., O'Brien, A.D. 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol*, 170: 1116-1122.
- Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., O'Brien, A.D. 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun*, 53: 135-140.
- Sutra, L., Federighi, M., Jouve, J.L. 1998. Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica, Paris*, 308p.
- Swerdlow, D.L., Woodruff, B., Brady, R.C., Griffin, P., Tippen, S., Nonnell, H.D., Geldreich, E., Payne, B., Meyer, A., Wells, J.G., Greene, K.D., Bright, M., Bean, N.H., Blake, P. A. 1992. waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine*, 117: 812-819.
- Tabuchi, A., Wakui, T., Yahata, Y., Yano, K., Azuma, K., Yamagishi, T., Nakashima, K., Sunagawa, T., Matsui, T., Oishi, K. 2015. A large outbreak of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157, caused by low-salt pickled Napa cabbage in nursing homes, Japan, 2012. *Western Pac Surveill Response J*, 16; 6(2):7-11.
- Tarr, P.I. 2009. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: distinct mechanisms of pathogenesis. *Kidney IntSuppl*, S29–S32

- Thompson, J.S., Hodge, D.S., Borczyk, A.A. 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol*, 28: 2165-2168.
- Tilden, J., Young, W., Mcnamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., Morris, J.G., 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health*, 86, 1142–5.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Tardelli Gomes, T.A. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 8, 508– 513.
- Tschape, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., Böhme, G. 1995. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolyticuraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiology and Infection*, 114, 441–450.
- Tutenel, A., Pierard, D., Hoof, J.V. And Zutter, L.D. 2003. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157 contamination routes in a cattle slaughterhouse. *J Food Prot*, 66, 1564–1569.
- Upton, P., Coia, J.E. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* (London, England) 344, 1015.
- Vally, H., Hall, G., Dyda, A., Raupach, J., Knope, K., Combs, B., Desmarchelier, P. 2012. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. *BMC Public Health*, 12, 63.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5, 112, 5649-54.
- Varela, G., Batthyany, L., Bianco, M. N., Pérez, W., Pardo, L., Algorta, G., Robino, L., Suárez, R., Navarro, A., Pierez, M. C., Schelotto, F. 2015. Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in Uruguay. *International Journal of Microbiologie*, 1-8.
- Vernozy Rozand, C., Montet, M. 2005. *Escherichia coli* O157:H7. Monographies de microbiologie. 2^{ème} édition. *TEC&DOC*, 164p.
- Verstraete, K., Van Coillie, E., Werbrouck, H., Van Weyenberg, S., Herman, L., Del-Favero, J., De Rijk, P., De Zutter, L., Joris, M.A., Heyndrickx, M., De Reu, K.A. 2014. qPCR assay to detect and quantify Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in cattle and on farms: a potential predictive tool for STEC culture-positive farms. *Toxins (Basel)*. 27, 6, 1201-21.

- Vimont, A., Delignette-Muller, M.L., Vernozy-Rozand, C. 2007. Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use. *Letters in applied microbiology*, 44,326-331
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Delignette-Muller, M.L. 2006. Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Letters in applied microbiology*, 42, 102-108.
- Wagner, C et Hensel, M. 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, p.17-34.
- Waldor, M.K., Friedman, D.I. 2005. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr.Opin. Microbiol*, 8, 459–465.
- Wang, L., Rothmund, D., Curd, H., Reeves, P.R. 2003. Species-Wide Variation in the *Escherichia coli* Flagellin (H-Antigen) Gene. *J. Bacteriol.* 185, 2936–2943.
- Watahiki, M., Isobe, J., Kimata, K., Shima, T., Kanatani, J., Shimizu, M., Nagata, A., Kawakami, K., Yamada, M., Izumiya, H., Iyoda, S., Morita-Ishihara, T., Mitobe, J., Terajima, J., Ohnishi, M., Sata, T., 2014. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan. *J. Clin. Microbiol*, 52, 2757–63.
- Werber, D., Fruth, A., Buchholz, U., Prager, R., Kramer, M.H., Ammon, A., *et al.* 2003. Strong association between shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolyticuraemic syndrome. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 22, 726–730.
- Whittam, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I.K., Orskov, F., Orskov,I., Wilson, R.A. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun*, 61: 1619-1629.
- Willshaw, G.A., Scotland, S.M., Smith, H.R., Rowe, B. 1992. Properties of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. *J. Infect. Dis*, 166: 797-802.
- Wong, A. R. C., Raymond, B., Collins, J. W., Crepin, V. F. & Frankel, G. 2012. The enteropathogenic *E. coli* effector EspH promotes actin pedestal formation and elongation via WASP-interacting protein (WIP). *Cell Microbiol*, 14, 1051–1070.
- Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., Tarr, P.I. 2000. The risk of the hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med*, 342: 1930-1936.

- Woodward, D. L., Clark, C. G., Caldeira, R. A., Ahmed, R., Rodgers, F. G. 2002. Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC): A major public health threat in Canada. *Can J Infect Dis*, 13(5), 321-330.
- Wright, D.J, Chapman, P.M., Siddons, C.A. 1994. Immuno-magnetic separation as a sensitive method for isolation *Escherichia coli* O157:H7 from food samples. *Epidemiol.Infect*, 113: 31-39.
- Wylie, J., Van Caesele, L., Gilmour, P., Sitter, M. W., Guttek, D., Giercke, C. E S. 2013. Evaluation of a New Chromogenic Agar Medium for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Relative Prevalences of O157 and Non-O157 STEC in Manitoba, Canada. *J Clin Microbiol*, 51(2): 466–471.
- Yoshitomi, J., Jinnema, Kc., Weagants, S.D. 2006. Detection of Shiga toxin genes *stx1*, *stx2* and the +93 *uidA* mutation of *E. coli* O157:H7/H- Using SYBER Green I in a real-time multiplex PCR. *Mol. Cell Probes*, 20: 31-41
- Yu, G., Niu, J., Shen, M., Shao, H., & L., C. 2006. Detection of *Escherichia coli* O157 using equal-length double-stranded fluorescence probe in a real-time polymerase chain reaction assay. *Clinica Chimica Acta*, 366, 281-286.
- Zadik, P.M., Chapman, P.M., Siddons, P.A. 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxic *Escherichia coli* O157. *J.Med. Microbiol*, 39:155-158.
- Zahraei Salehi, T., Askari Badouei, M., Mehdizadeh Gohari, I. 2010. Molecular detection and antibacterial susceptibility of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy and diarrhoeic dogs. *Comp. Clin. Path*, 20, 585–589.
- Zarei, M., Basiri, N., Jamnejad, A., Eskandari, and M.H. 2013. Prevalance of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* SPP. In Beef, Buffalo and lamb using multiplex PC. *Jundishapur Microbiol*, 6(8):7244.
- Zhang, S., Zhu, X., Wu, Q., Zhang, J., Xiaoke, X., Haigang, L. 2015. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in retail fresh raw meat in South China. *Annals of Microbiology*, 65: 4, 1993–1999.
- Zhang, X.P., Mcdaniel, A.D., Wolf, L.E., Keusch, G.T., Waldor, M.K., Acsheson, D. W. K. 2000. Quinolone antibiotics induce shiga toxin- encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 664-670
- Zhao, B., Houry, W. A. 2010. Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol*, 88, 301–314
- Zweifel, C., Stephan, R. 2005. Les ruminants, réservoirs de STEC : un problème ? *OVF 3105* magazine, *Rapport Suisse sur les zoonoses*.

Zweifel, C., Stephan, R. 2003. Microbiological monitoring of sheep carcass contamination in three Swiss abattoirs. *J. Food Port.*, 66: 946-952.

Zweifel, C., Kaufman, M., Blanco, J., Stephan, R. 2006. Significance of *Escherichia coli* O157:H7 in sheep at slaughter in Switzerland *Schweiz Arch Tierheilkd*, 148 (6): 289-95.

ANNEXES

ANNEXE 1**Matériel de travail****1-Matériel de prélèvement**

Afin de procéder aux différents prélèvements, le matériel et accessoires suivants ont été utilisés :

- Disques de coton cosmétiques exempts de substances inhibitrices ;
- Papier aluminium ;
- Gants ;
- Sacs stomacher ;
- Enceinte réfrigérée.

2-Equipement de laboratoire

- Bec Bunsen
- Etuve bactérienne réglée à différentes températures : 35, 37 et 42°C
- Bain-marie réglé à 45°C
- Autoclave : 120°C
- Micro-ondes
- Stomacher
- Mélangeur de type vortex
- Centrifugeuse
- Dynal MPC- M (portoir muni d'une paroi à aimant concentrateur)
- Dynal simple Mixer (dispositif de rotation)
- Appareil PCR (thermocycleur)
- Electrophorèse sur gel
- Osiris

3-Consommables

- Eppendorfs
- Micropipettes (0,5 µl à 1 ml)
- Embouts, bleus, jaunes, blancs
- Pipettes Pasteur
- Anse de platine
- Boîtes de pétri carrées de 12 cm
- Boîtes de pétri de 9 cm
- Tubes pour PCR
- Ecouvillons stériles

→ **Disques d'antibiotiques (Oxoid)**

Penicillines Amoxicilline + acide clavulanique (AMC) (30µg) Amoxicilline (AML) (25 µg) Ampicilline (AMP) (10 µg) Ticarcilline (TIC) (75 µg) Piperacilline (PRL) (30µg)	Cephalosporines Cefazoline (KZ) (30 µg) Céfoxitine (FOX) (30µg) Ceftazidime (CAZ) (30µg) Céfotaxime (CTX) (30 µg) Ceftriaxone (CRO) (30 µg) Cefepime (FEP) (10 µg)	Carbapenemes Imipénème (IPM) (10 µg) Ertapénème (ETP) (10 µg) Méropénème (MEM) (10 µg)
Monobactams Aztréonam (ATM) (30 µg)	Fluoroquinolones Ciprofloxacine (CIP) (10 µg) Acide nalidixique (30 µg) Norfloxacine (NOR) (10 µg)	Aminoglycosides Amikacine (AK) (30 µg) Gentamicine (CN) (30µg) Netilmicine (NI) (30 µg) Tobramycine (TOB) (30µg) Kanamycine (K) (30 µg) Streptomycine(S) (25µg)
Sulfamides-Triméthoprim Sulfonamides (3S) (200 µg) Cotrimoxazole (SXT) (23, 75 / 1, 25)	Tetracyclines Tétracycline (TE) (30 UI)	Divers Chloramphénicol (C) (30 µg) Colistine (CT) (10 µg) Triméthoprim (W) (5 µg) Fosfomycine (FOS) (200 µg) Furanes (F) (300 µg)

→ Milieux de culture : (les formules figurent en annexe 2)

- Eau peptonée tamponnée (EPT) (Oxoid)
- Tryptone sel eau (TSE)
- Tampon phosphate salin (PBS+Tween)
- Tris EDTA (TE)
- Milieu de Rapid'*E. coli* (REC2) (BioRad)
- Mac Conkey Sorbitol+ Cefixime+ Tellurite de potassium (CT-SMAC) (Oxoid)
- CHROMagarTM STEC (CHROMagar, Paris, France)
- Mueller-Hinton Agar (MH) :
- Bouillon cœur cervelle (BHIB)
- Dynabeads anti- *E. coli* O157 (billes en polystyrène uniformes, paramagnétiques, liées de façon covalente à une combinaison d'anticorps purifiés par affinité spécifique à *E. coli* O157) (Invitrogen)
- Tampon Tris Acétate EDTA (TAE)

→ Tests de confirmation

- Galerie API 20^E (bioMérieux)
- DrySpot *E. coli* Serocheck et Seroscreen (O91, O111, O103, O145, O26 et O128) (Oxoid)
- DrySpot *E. coli* anti-O157(Oxoid)
- DrySpot *E. coli* anti-O26(Oxoid)
- Sérum anti- O157(Oxoid)
- Sérum anti- O45 et anti-O121 (Statens Serum Institut)

→ Réactifs pour tests biochimiques

- Réactif de Kovacs
- VPI et VPII
- TDA
- Huile de vaseline

→ **Réactifs pour la biologie moléculaire**

- Paires d'amorce (10 μ M) (Applied Biosystems)
- Paires d'amorce (10 μ M) (Invitrogen)
- Marqueur de taille moléculaire 100 Pb (Invitrogen)
- dNTP (2mM) (Amersham pharmacia biotech)
- dNTP (2mM) (Invitrogen)
- Tampon Flexi Buffer 5x pH : 8,5 (Promega)
- Tampon 5x pH : 8,5 (Invitrogen)
- MgCl₂ (25 mM) (Promega).
- MgCl₂ (25 mM) (Invitrogen)
- Taq polymerase (Go taq Flexi DNA polymerase) (Promega).
- Taq polymerase (Invitrogen)
- Bromure d'éthidium
- Tris, Borate, EDTA
- Agarose (Sigma)

→ **Matériel biologique :**

- Souche de référence : ATCC 25922

ANNEXE 2

Formules

Eau peptonée tamponnée (EPT)

Formule pour un litre d'eau distillée :

Peptone.....10 g
 NaCl..... 5 g
 Phosphate disodique ($\text{Na}_2 \text{PO}_3$).....3,5 g
 Phosphate dihydrogéné de potassium ($\text{KH}_2 \text{PO}_3$).....3,5 g
 pH= 7,26 $\pm$ 0,2 à 25°C

Tryptone sel eau (TSE)

Formule pour un litre d'eau distillée :

Tryptone..... 1 g
 NaCl.....8,5 g
 pH=7
 Autoclaver 20 minutes à 120°C

Milieu de Rapid'E. coli (REC2) :

Formule type pour un litre distillée

Peptone.....5,0 g
 Lactose.....2,5 g
 Extrait de levure.....3,0 g
 Chlorure de sodium.....5,0 g
 Rouge neutre.....0,03 g
 Hydrogénophosphate de disodium.....3,5 g
 Dihydrogénophosphate de potassium.....1,5 g
 Agar.....15 g
 Mélange chromogène.....20,3g
 pH= 6,8 $\pm$ 0,2

Tampon phosphate salin (PBS+Tween)

Solution de lavage des Dynabeads au cours de l'IMS afin de laver les billes après l'immuno-capture.

Formule : NaCl 0,15 M, tampon phosphate de Na 0,01 M, pH= 7,4 avec 0,05% de Tween 20.
Pour un litre d'eau distillée :

NaCl 8,75 g
Na₂ HPO₄..... 1,42 g
NaH₂ PO₄..... 1,38 g
Autoclaver 15 minutes à 121°C. Après ajouter 0, 5 ml de Tween 20 (Merck).
Ajuster le pH avec du NaOH 0,1M.

Mac Conkey Sorbitol (SMAC)

Mettre 51,5g de poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer jusqu'à dissolution complète.
Autoclaver 45 minutes à 121°C, couler en boîtes de pétri.

Formule type par litre :

Peptone..... 20 g
Sorbitol..... 10 g
Sel biliaires n°3..... 1,5 g
NaCl..... 5 g
Rouge neuter..... 0,03 g
Cristal violet..... 0,001 g
Agar..... 15 g
pH final = 7

Mac Conkey Sorbitol+ Cefixime+ Tellurite de potassium (CT-SMAC)

Verser 10µl de cefixime (0,05 mg/l) et 10µl de tellurite de potassium (2,5mg/l) dans le milieu de base Mac Conkey au sorbitol refroidi à environ 45°C.

Mueller-Hinton Agar (MH)

Infusion de viande de bœuf déshydraté..... 300 g
Hydrolysate de caséine..... 17, 5 g
Amidon de maïs..... 1, 5 g
Agar agar..... 13 g
Eau distillée..... 1000ml
pH final = 7,2 - 7,4

Bouillon cœur cervelle (BHIB)

Protéose-péptone.....	10	g
Infusion de cervelle de veau.....	12,5	g
Infusion de cœur de bœuf.....	5	g
Glucose.....	2	g
Chlorure de sodium.....	5	g
Hydrogénophosphate de sodium.....	5	g
pH= 7,4		

Dynabeads

Billes en polystyrène paramagnétiques, fournies en suspension dans du tampon PBS (pH= 7), 0,1% de sérum albumine humaine (HSA), 0,02% d'azide de sodium (Na N₃).

Tampon Tris Acétate EDTA (TAE)

Tris : pH= 8,5 ; ce qui rend l'ADN chargé négativement pour qu'il migre vers l'anode :

EDTA : est un chélateur des ions bivalents, ce qui évite les interférences ;

Formule :

TAE 50x

242g Tris hydroxyméthyl'aminométhane

57,1 ml d'acide acétique glacial

100 ml d'EDTA 0,5 M (pH= 8)

Ajuster à pH= 7,9 avec HCl

Prendre 20 ml de TAE 50x + 1 litre d'eau distillée

Tampons Tris-Borate-EDTA (TBE)

La solution (1X) se compose de 0,089 M de base tris, 0,089 M de borate et 0,002 M d'EDTA, du sel disodique, du dihydrate avec un pH final de 8,3.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES
