

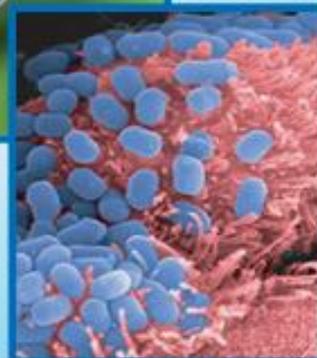
MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de magistère en Sciences Vétérinaires
Option : Hygiène et Sécurité Alimentaire

Thème

Recherche et caractérisation des souches d'*Escherichia coli*
O157 isolées à partir des carcasses ovines provenant de
deux abattoirs de la wilaya d'Alger et évaluation du niveau
d'hygiène

Présenté par : LILA FERHAT



Devant le jury :

- | | | |
|----|---|---------------|
| Dr | E. LEBRES : Maître de recherche en microbiologie, IPA | Président |
| Dr | M. ASSAMI : Maître de Conférences, INA, Alger | Promoteur |
| Dr | A. CHAHED : Chargé de Cours, ENV, Alger | Co-promotrice |
| Dr | B. BENDEDOUCHE : Maître de Conférences, ENV, Alger | Examineur |
| Dr | K. BOUKHORS : Maître de Conférences, ENV, Alger | Examineur |

Remerciements

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

Le Docteur E. Lebres, Directeur de l'Institut Pasteur d'Algérie, qui a bien voulu investir de son temps dans la lecture de mon mémoire ; je le remercie vivement d'avoir bien voulu présider le jury ;

Le Docteur B. Bendeddouche, Directeur des études et Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'El Harrach ;

Le Docteur K. Boukhors, Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'El Harrach ;

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

Mes remerciements les plus sincères vont également à ma Co-promotrice, le Docteur A. Chahed, qui est à la source de mon travail et de toute ma démarche ; je la remercie de m'avoir encadrée et d'avoir toujours apporté des réponses à mes questions et préoccupations, malgré son emploi du temps des plus chargé.

Je tiens à remercier fortement mon promoteur, le Docteur M. Assami, pour ces précieuses orientations.

J'exprime mes sincères remerciements au Docteur A. Bensalem (Laboratoire HTDS Algérie) pour m'avoir facilité toutes les démarches en vue de l'obtention des amorces ayant servi à la caractérisation des souches isolées lors de ce travail. Merci mille fois, Aziza.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements au Professeur K. Rahal, responsable du Laboratoire de microbiologie médicale, antibiothérapie et hygiène hospitalière (IPA), pour avoir bien voulu m'accueillir au sein de son service.

Je remercie chaleureusement Mademoiselle F. Assaous pour m'avoir accompagnée avec son professionnalisme, sa gentillesse et sa sympathie tout au long de la réalisation de la partie expérimentale à l'Institut Pasteur d'Algérie.

Enfin, je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Madame L. Sahraoui, à Madame S. Zenia et à Monsieur A. Saadi, pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie.

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste mémoire :

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 très chers frères Samir et Yacine, à qui je souhaite tout le bonheur du monde. Que Dieu vous bénisse ;

A mes beaux parents, que Dieu les protège ;

A ma belle sœur Dalal et à mes beaux-frères Ali et Djalel, qui sont très chers à mon cœur ;

A ma douce grand-mère paternelle, à qui je souhaite une très longue vie ;

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 ma défunte grand-mère maternelle ;

A la mémoire de mes défunts grands-pères et oncles ;

A tous mes condisciples de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'El Harrach.

Table des matières

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction	1
1. Histoire d' <i>E. coli</i> et <i>E. coli</i> O157	3
1.1 Histoire d' <i>E. coli</i>	3
1.2 Histoire d' <i>E. coli</i> O157:H7	5
1.3 Nomenclature	5
1.4 Origine du clone O157:H7	5
2. Classification et description des différents pathovars diarrhéogènes d' <i>E. coli</i>	8
2.1 Les <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes ou EPEC	8
2.2 Les <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatifs ou EAEC	9
2.3 Les <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques ou EHEC	9
2.4 Les <i>Escherichia coli</i> entérotoxino-gènes ou ETEC	10
2.5 Les <i>Escherichia coli</i> entéroinvasifs ou EIEC	11
3. Caractères phénotypiques et biochimiques des STEC	12
4 Antigènes et sérotypage.....	14
4.1 Les antigènes somatiques O.....	14
4.2 Les antigènes flagellaires H.....	14
4.3 Les antigènes d'enveloppe K.....	15
5 Caractères culturels de base des STEC	15
5.1 Température	16
5.2 pH	16
5.3 Activité de l'eau a_w	16
6 Facteurs de virulence et pouvoir pathogène des STEC	17
6.1 Les Shiga-toxines	17
6.1.1 Structure	17
6.1.2 Mode d'action	18
6.1.3 Les gènes <i>stx</i>	19

6.2	Le facteur d'attachement et d'effacement	20
6.3	L'adhésine SAA	22
6.4	L'adhésion fimbriaire	22
6.5	La production de l'entérohémolysine	22
6.6	La capacité à utiliser le fer	23
6.7	L'entérotoxine EAST1	23
7	Les infections liées aux STEC	24
7.1	La colite hémorragique (CH).....	24
7.2	Le syndrome hémolytique et urémique (SHU)	25
7.3	Le purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT)	27
7.4	Traitement	29
8	Epidémiologie des STEC	30
8.1	Epidémiologie des STEC chez l'homme.....	30
8.2	Epidémiologie des STEC chez les animaux	32
8.2.1	Chez les bovins.....	32
8.2.2	Chez les petits ruminants.....	33
8.2.3	Chez d'autres animaux	33
8.3	Mode de transmission.....	34
8.3.1	Transmission indirecte	34
8.3.2	Transmission directe	36
9	Effet des traitements physiques et chimiques sur les STEC	39
9.1	Chaleur	39
9.2	Réfrigération.....	40
9.3	Congélation	40
9.4	Acidité	40
9.5	Nitrites	40
9.6	Ionisation	41
10	Méthodes de détection des STEC dans les aliments.....	41
10.1	Méthodes microbiologiques	42
10.1.1	L'enrichissement	42
10.1.2	La détection	43
10.2	Méthodes immunologiques	44
10.2.1	Système ELISA (validé AOAC Official Method 996.10)	45

10.2.2	Système immuno-chromatographique (validé AOAC Official Method 996.09)	45
10.2.3	Système automatisé (validé AFNOR 12/08-07/00)	45
10.3	Méthodes génétiques	46
10.3.1	Hybridation ADN et sondes oligonucléotidiques	46
10.3.2	PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	47
11	Prévention et contrôle	48
11.1	Elaboration d'un vaccin humain contre <i>E. coli</i> O157:H7	49
11.2	Elaboration d'un vaccin pour les ruminants contre <i>E. coli</i> O157:H7	50
	Problématique	51
1	Matériel et méthodes	52
1.1	Echantillonnage	52
1.1.2	Période d'échantillonnage et nombre d'échantillons	52
1.1.3	Méthode d'échantillonnage	55
1.1.4	Lieux du traitement des échantillons	57
1.2	Matériel	57
1.2.1	Equipements :	57
1.2.2	Milieux de culture, réactifs:	58
1.3	Méthodes d'analyses	58
1.3.1	Recherche des souches de STEC du sérotype O157	58
1.3.2	Dénombrement des coliformes thermotolérants et d' <i>E. coli</i> à 44°C	70
2	Résultats	74
2.1	Résultat de la recherche des <i>E. coli</i> O157:H7	74
2.1.1	Aspect des colonies sur gélose d'isolement	76
2.1.2	Aspect des tests d'agglutination	77
2.1.3	Recherche de la virulence des souches d' <i>E. coli</i> O157:H7 par PCR	78
2.1.4	Test de sensibilité aux antibiotiques	81
2.1.5	Origine et lieux d'abattage des ovins contaminés par <i>E. coli</i> O157:H7	82
2.2	Résultats des Dénombrements des coliformes thermotolérants et d' <i>E. coli</i> à 44°C	84
2.3	Analyse statistique	89
2.3.1	Nombre des échantillons positifs au niveau des deux abattoirs	89
2.3.2	Relation entre l'origine des ovins abattus et les souches d' <i>E. coli</i> O157 isolées	89

2.3.3 Relation entre les souches d' <i>E. coli</i> O157 isolées et la période de recherche..	90
3 Discussion	91
3.1 Choix des lieux de prélèvements	91
3.2 Choix des zones d'échantillonnage	91
3.3 Méthode de prélèvement	92
3.4 Méthodes d'analyses et milieux de détection.....	94
3.5 Prévalence d' <i>E. coli</i> O157:H7	99
3.6 Sensibilité aux antibiotiques.....	102
3.7 Qualité bactériologique et hygiénique des carcasses	103
4. Conclusion	107
5. Recommandations	108
Références bibliographiques	110
Annexe 1	120
Annexe 2	124
Annexe 3	129

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents mécanismes de transfert d'ADN chez les bactéries.....	6
Figure 2: Modèle hypothétique de l'émergence de <i>E. coli</i> O157:H7.....	7
Figure 3: Etapes de l'interaction des EPEC avec la cellule eucaryote cible	9
Figure 4 : Etapes de l'interaction des EHEC avec la cellule eucaryote cible	10
Figure 5 : Etapes de l'interaction des ETEC avec la cellule eucaryote cible.....	10
Figure 6 : Etapes de l'interaction des EIEC avec la cellule eucaryote cible.....	11
Figure 7 : Evolutions cliniques de la colite hémorragique due à <i>E. coli</i> O157:H7.....	28
Figure 8 : Echantillonnage réalisé au niveau des deux abattoirs.....	53
Figure 9 : Lecture et interprétation de la galerie API 20 E.....	62
Figure 10: Protocole de recherche d' <i>E. coli</i> O157 :H7	69
Figure 11: Méthode NPP.....	72
Figure 12 : Résultats du dénombrement des coliformes thermotolérants et d' <i>E. coli</i> à 44°C .	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Température de croissance des STEC (Nauta et Dufrenne, 1999).....	16
Tableau 2 : Plages de pH permettant la croissance des STEC (Nauta et Dufrenne, 1999).....	16
Tableau 3 : a_w nécessaire a la croissance des STEC (Nauta et Dufrenne, 1999)	16
Tableau 4 : Description de quelques épidémies d'infection à EHEC	37
Tableau 5 : Origine des ovins abattus au niveau des deux abattoirs	54
Tableau 6 : Paires d'amorces utilisées dans cette étude.....	63
Tableau 7 : Nombre de carcasses contaminées et de souches d' <i>E. coli</i> O157:H7 isolées	74
Tableau 8 : Identification biochimique et sérologique des souches d' <i>E. coli</i> O157:H7	75
Tableau 9 : Caractère génotypique des souches d' <i>E. coli</i> O157:H7	78
Tableau 10 : Origine des carcasses ovines contaminées par <i>E. coli</i> O157:H7.....	82
Tableau 11 : Caractérisation et sensibilité aux antibiotiques des souches d' <i>E. coli</i> O157:H7	83
Tableau 12 : Dénombrements des coliformes thermotolérants à 44°C.....	85
Tableau 13 : Dénombrement des <i>E. coli</i> β -glucuronidase positives sur gélose REC2 à 44°C	86
Tableau 14 : Table de MAC CRADY (3tubes par dilution)	128

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Aspect d' <i>Escherichia coli</i> au microscope optique.....	12
Photo 2: Membre postéro-externe de la cuisse (zone A).....	55
Photo3 : Flanc (zone B).....	55
Photo 4: Gros bout de la poitrine (zone C).....	56
Photo 5: Face postérieure du membre antérieur (zone D).....	56
Photo 6: Dynal simple Mixer.....	59
Photo 7: Dynal MPC-M.....	59
Photo 8: Test d'agglutination au latex anti-O157.....	61
Photo 9: Migration des bandes d'ADN sur l'électrophorèse sur gel.....	66
Photo 10: Colonies d' <i>E. coli</i> O157 sorbitol négatives sur le milieu CT-SMAC.....	76
Photo 11: Colonies d' <i>E. coli</i> O157 sorbitol positives sur le milieu CT-SMAC.....	76
Photo 12: Colonie agglutinant le latex anti-O157.....	77
Photo 13: Colonie agglutinant l'antisérum H7.....	77
Photo 14 : Visualisation des gènes <i>eae</i> et <i>stx₂</i> des souches d' <i>E. coli</i> O157:H7.....	80
Photo 15 : Antibiogramme.....	81
Photo 16 : Evaluation de la CMI par le E test [®]	81
Photo 17: Colonies d' <i>E. coli</i> sur milieu REC2.....	84
Photo 18 : Développement des coliformes thermotolérants à 44°C.....	84
Photo 19: Transport des bovins et des ovins dans le même camion.....	129
Photo 20: Concentration des bovins et des ovins dans un même enclos.....	129
Photo 21: Risque de contamination des carcasses par les ovins.....	130
Photo 22: Souillure de la carcasse par les matières fécales.....	130

LISTE DES ABREVIATIONS

μ l : Microlitre
 μ M: micromole
A/E : Attachement /Effacement
ADEC : *Escherichia coli* à adhésion diffuse
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AFNOR : Association française de normalisation
AFSSA : Agence Française de Sécurité sanitaire des Aliments
AMP : Adénosine monophosphate.
ARNr : Acide Ribo Nucléique ribosomal
ATP : Adénosine triphosphate.
 a_w : Activité de l'eau
BCCDC: British Columbia Centre of Disease control
BCIG-SMAC: 5-bromo-4chloro 3-indoxyl-B-D-glucuronide- Sorbitol Mac Conkey
BLBVB :Boillon lactosé bilié au vert brillant
CDC: Centre of Disease Control and Prevention
CH : Colite hémorragique
CT-MAC : Cefixime Tellurite Mac Conkey
CT-SMAC : Cefixime Tellurite Sorbitol Mac Conkey
E- hlyA : EHEC Hemolysin A
E. coli : *Escherichia coli*
eae : *Escherichia coli* attaching and effacing
EAEC : Les *Escherichia coli* entéroadhérents ou aggrégant
EAST I: Enteroaggrégative *E. coli* heat stable enterotoxin
EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique
ehxA : Enterohemolysin A
EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasif
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorban Assay
EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène
EPT : Eau peptonée tamponée
ETEC: *Escherichia coli* entérotoxinogène
G+C: Guanine+ Cytosine
Gb3: galactose- α (1-4), galactose- β (1-4), glucosyl-céramide
GEI : Gastro-entérite infantile
HACCP :Hasard Analysis Critical Point
IMS : Séparation immuno-magnétique
ISO : Organisation Internationale de Normalisation.
Kb: Kilobases

kDa : Kilodalton
LB: Luria Broth
LEE : Locus d'effacement des entérocytes
LPS : Lipopolysaccharidique
LT: Thermolabile
mEC: Modified *Escherichia coli* medium
MH: Mueller Hinton
mM: milli-mole
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
NPP : Nombre Plus Probable
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH : Potentiel Hydrogène
PTT : Purpura thrombotique thrombocytopénique
SAA : STEC Autoagglutinating Adhesin
SHU : Syndrome hémolytique et urémique
SMAC : Sorbitol Mac Conkey
SMAC-MUG: 4- méthylumbellifery-B-glucuronide
ST: Thermostable
STEC: Shiga-toxin-Producing *Escherichia coli*
Stx1 : Shiga-toxines de type 1
Stx2 : Shiga-toxines de type 2
Tir : Translocated Intimin Receptor
TSB : Bouillon trypticase- soja
TSE : Eau tryptone sel
UV : Ultra-Violet
VTEC: Verotoxin-Producing *Escherichia coli*
vWF : Facteur von Willebrand

Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) est sans doute l'un des micro-organismes vivants le plus étudié à ce jour. En effet, l'ancienneté de sa découverte (1885) et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37°C dans un milieu riche) en font un bon outil d'études. De même *E. coli* est considéré comme « cheval de labour » dans les laboratoires de biologie moléculaire. La profusion de publications scientifiques qui le mentionnent en témoigne.

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.

Parmi ces pathovars, les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), en particulier ceux du sérotype O157:H7, sont considérés à l'heure actuelle comme des pathogènes émergents en santé publique. Depuis 1982, ils ont souvent été incriminés lors d'épidémies de colites hémorragiques et de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) (Caprioli et al., 2005).

Les EHEC possèdent un arsenal de facteurs de virulence dont la liste et le rôle exacts 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, d'autre part les Shiga-toxines, codées par les gènes *stx*₁ et ou *stx*₂ et capables de provoquer la mort des cellules intestinales, vasculaires et rénales. Les souches de *E. coli* capables de produire ces toxines sont dénommées STEC pour « Shiga-toxin producing *E. coli* » (Fegan et Desmarchelier., 1999).

Les épidémies recensées à ce jour sont liées en majorité à la consommation d'aliments d'origine bovine, mais l'ingestion d'autre denrées alimentaires et/ou d'eau, les contacts directs avec les animaux, la transmission interhumaine par voie fécalo-orale, sont également incriminés (Caprioli et al. 2005).

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.

Les ruminants, et plus particulièrement 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-infection alimentaire (Beutin et *al.*, 1993).

En Algérie on distingue trois types d'élevage : le bovin, l'ovin-caprin et l'avicole. Le cheptel ovin prédomine et représente 70% de l'effectif global avec plus de 12 millions de brebis. L'élevage caprin vient en seconde position (13%). L'effectif des bovins reste faible avec 1,65 million de têtes (6% de l'effectif global).

Le cheptel ovin est resté globalement stable depuis deux décennies, avec quelques variations annuelles selon les conditions climatiques. Les derniers chiffres communiqués parlent d'une population de dix-neuf millions de têtes. La contribution des ovins est de 51% pour l'ensemble des produits carnés (NEPAD, 2006).

En Afrique du Nord, plus particulièrement en Algérie, le portage des STEC par les ovins est méconnu. Ces germes n'étant pas systématiquement recherchés, leur implication en tant qu'agents pathogènes peut passer inaperçue.

Dans notre étude, nous avons eu pour objectif d'évaluer le niveau de contamination de la viande ovine produite dans deux abattoirs d'Alger par les *Escherichia coli* O157.

Pour ce faire, nous avons recherché dans un premier temps la présence de ces souches à la surface des carcasses ovines et tenté de confirmer, grâce à l'identification des gènes présents, leur virulence, ainsi que la sensibilité de ces mêmes souches aux antibiotiques. Ces étapes nous ont permis d'apprendre à utiliser la technique d'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction) pour ce type de pathogène. Dans un deuxième temps, nous avons choisi un des deux abattoirs pour tester la méthode d'échantillonnage qui permet d'évaluer le niveau d'hygiène de cette structure conformément à la nouvelle réglementation européenne (Décision européenne 2001/471/CE). A cet effet, un dénombrement des coliformes thermotolérants et d'*E. coli* (indicateurs de contamination fécale) à été réalisé.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Histoire d'*E. coli* et *E. coli* O157

Escherichia. coli est l'espèce type du genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille » 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).

1.1 Histoire d'*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 (Anonyme., 1985).

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

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). L'espèce 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 surfaces : 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).

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. 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).

1.2 Histoire d'*E. coli* O157:H7

C'est en 1982, qu'un nouveau tableau clinique caractérisé par une colite hémorragique, un syndrome hémolytique et urémique et / ou un purpura thrombotique thrombocytopenique, 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* qui est le O157:H7 (Riley et *al.*, 1983).

1.3 Nomenclature

Une étude menée sur les selles d'enfants atteints par un syndrome hémolytique et urémique mis en évidence la présence d'une toxine, cytotoxique pour les cultures cellulaires Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) d'où son nom « vérotoxine », dénommée également « Shiga-toxine » du fait de sa grande similitude avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (Strockbine et *al.*, 1988).

La dénomination VTEC (Verotoxin-producing *E. coli*), couramment utilisée jusqu'à présent, a été abandonnée au profit du terme STEC (Shiga-toxin-producing *E. coli*), 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-like toxines ou Shiga-toxines (Mainil et Daube., 2005).

Escherichia coli O157:H7 est le principal sérotype d'*E. coli* produisant une grande quantité de Shiga-toxines (Padhye et Doyle., 1992). Le terme EHEC (*E. coli* entérohémorragiques) décrit des souches de STEC qui sont pathogènes pour l'homme.

1.4 Origine du clone O157:H7

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.

Les souches pathogènes d'*E. coli* possèdent jusqu'à 20% d'information génétique supplémentaire, acquise vraisemblablement au cours de transferts horizontaux d'ADN (figure 1). 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, et le gène *ehxA* sur le plasmide pO157 (Mainil., 2003a).

D'après des études, les EHEC 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).

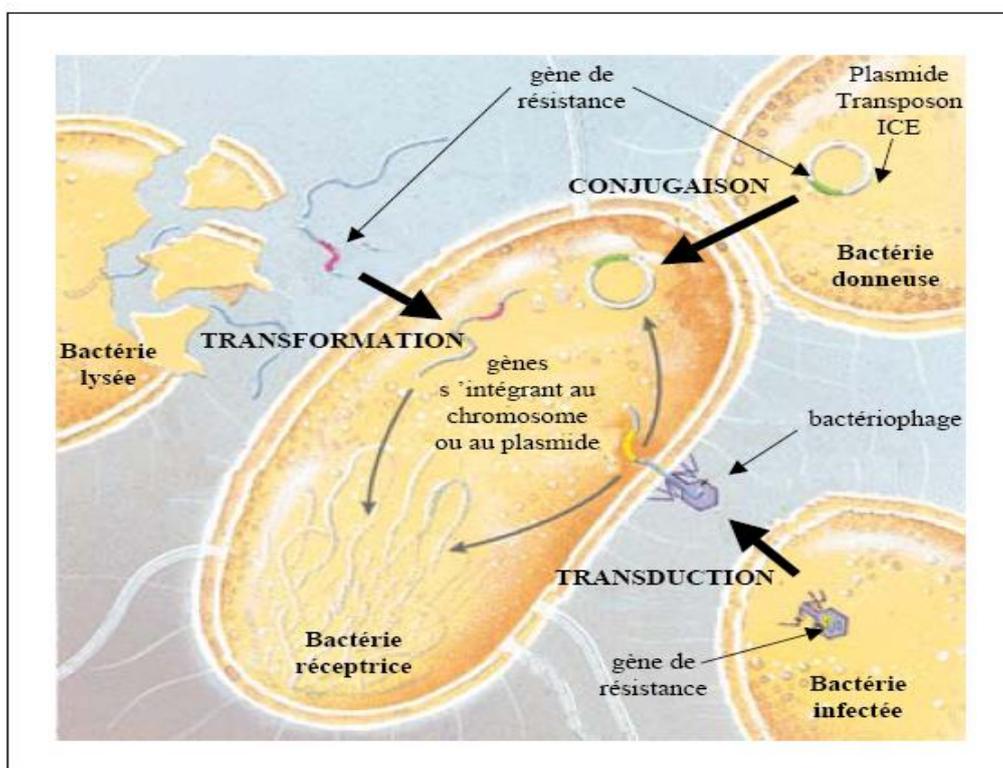


Figure 1 : Les différents mécanismes de transfert d'ADN chez les bactéries (Doublet, 2004).

En 1998, Feng proposa un modèle d'émergence du clone O157:H7 basé sur des 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 (AFSSA, 2003).

Etape 1 : acquisition du gène *stx*₂ par transduction avec des phages \Rightarrow **O55 : H7 *stx*₂ positif ;**

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

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

Etape 4 : acquisition du plasmide pO157 entraînant la perte de fermentation du sorbitol ;

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.

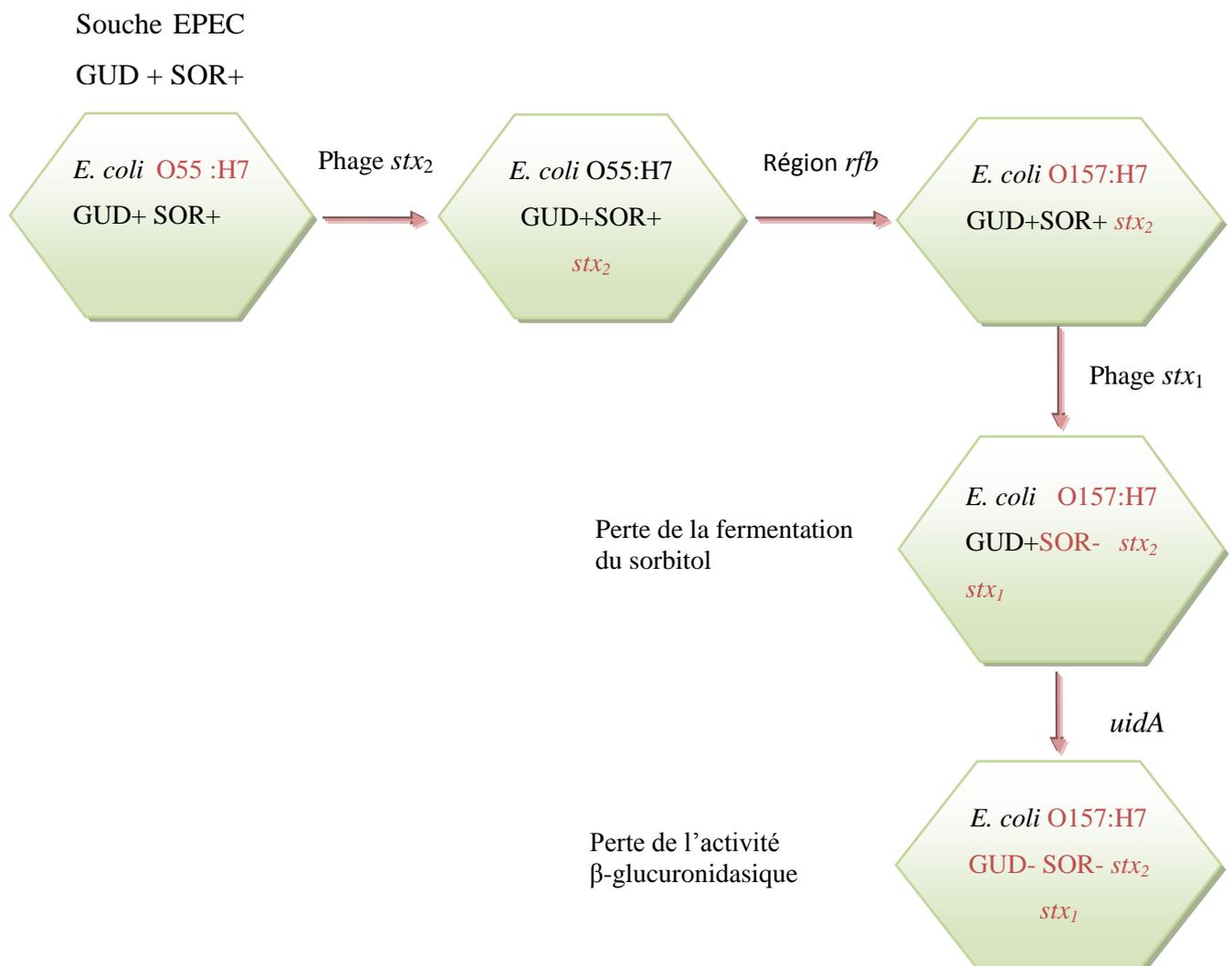


Figure 2: Modèle hypothétique de l'émergence de *E. coli* O157:H7 (AFSSA., 2003).

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

Les souches d'*E. coli*, agents de diarrhées, forment un groupe très hétérogène au regard des mécanismes en cause dans leur pathogénicité. Un pathovar est un taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et 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.

On peut classer ces pathovars en :

- *Escherichia coli* entéropathogènes « EPEC ».
- *Escherichia coli* entéroadhérents ou aggrégants « EAEC ».
- *Escherichia coli* entérohémorragiques « EHEC ».
- *Escherichia coli* entérotoxigènes « ETEC ».
- *Escherichia coli* entéroinvasifs « EIEC ».
- *Escherichia coli* à adhésion diffuse « ECAD ».

2.1 Les *Escherichia coli* entéropathogènes ou EPEC

Les EPEC ont été les premiers décrits comme responsables de diarrhées au début des années 1950. Dans les pays développés, les EPEC ont été responsables de gastro-entérites infantiles (GEI), causant la mort de nombreux nourrissons dans les crèches.

L'infection 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 ». Les bactéries sont reliées entre elles et à la cellule par des pili 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 d'une protéine membranaire, l'intimine, à causer des lésions d'attachement et d'effacement. Il existe deux classes d'EPEC, les EPEC de classe I ayant une adhérence localisée et les EPEC de classe II ayant une adhérence diffuse sur toute la paroi cellulaire des entérocytes (Milon., 1993).

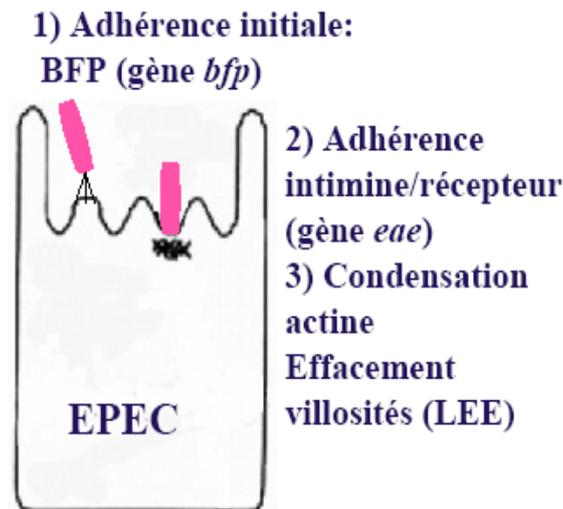


Figure 3: Etapes de l'interaction des EPEC avec la cellule eucaryote cible (Nataro et Kaper, 1998).

2.2 Les *Escherichia coli* entéroaggrégatifs ou EAEC

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 possèdent des propriétés aggrégatives (sous forme de briques empilées) dues à des fimbriae I, provoquant une nécrose des pôles apicaux des microvillosités, mais aussi possèdent la faculté de synthétiser une toxine thermostable EAST I (enteroaggrégative *E. coli* heat stable enterotoxin). EAST I a une homologie fonctionnelle partielle de 50% avec la toxine thermostable ST des ETEC, d'où leur similaire pathogénicité (Nataro et Kaper., 1998).

2.3 Les *Escherichia coli* entérohémorragiques ou EHEC

Les souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques sont connues comme étant les principaux agents infectieux responsables de diarrhées hémorragiques appelées colites hémorragiques. En cas de complication, ils peuvent entraîner un syndrome hémolytique et urémique (SHU).

Dans la majorité des cas les souches d'*E. coli*, responsables de SHU et isolées des selles de patients, appartiennent au sérotype O157:H7 ; cela n'empêche pas que d'autres sérogroupes sont à l'origine des colites hémorragiques tels que les : O111, O26, O103, O155, O128 (AFSSA, 2003 ; Milon, 1993).

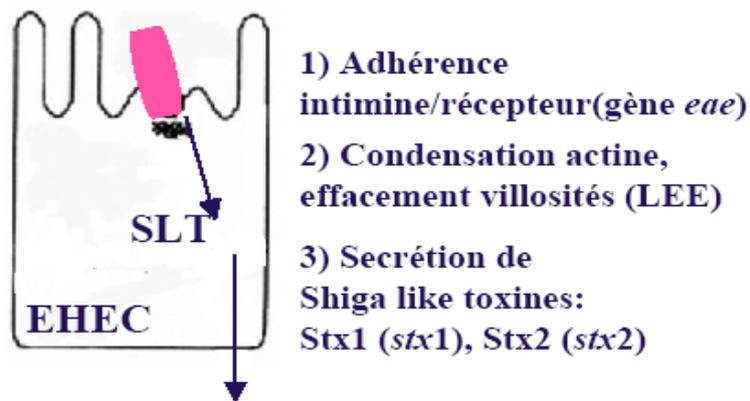


Figure 4 : Etapes de l'interaction des EHEC avec la cellule eucaryote cible (Nataro et Kaper, 1998).

2.4 Les *Escherichia coli* entérotoxinogènes ou ETEC

Le mode d'infection des ETEC s'effectue tout d'abord par la colonisation de l'intestin grêle nécessitant des facteurs d'adhésion sous forme de fimbriae, puis par la production d'entérotoxines thermostables ST et thermolabiles LT (Milon., 1993). 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.

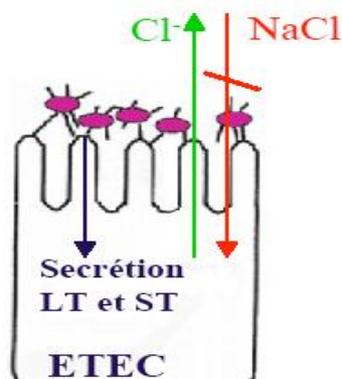


Figure 5 : Etapes de l'interaction des ETEC avec la cellule eucaryote cible (Nataro et Kaper, 1998).

2.5 Les *Escherichia coli* entéroinvasifs ou 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. La dysenterie engendrée est caractérisée par des crampes abdominales et par la présence d'un mucus sanglant dû à la destruction des cellules du colon (Milon A., 1993).

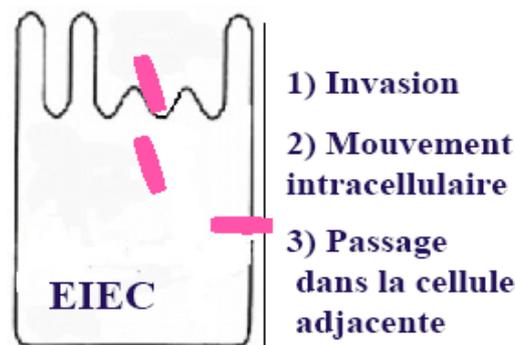


Figure 6 : Etapes de l'interaction des EIEC avec la cellule eucaryote cible (Nataro et Kaper, 1998).

3. Caractères phénotypiques et biochimiques des STEC

Les STEC appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, au sein de cette famille, on trouve de nombreux genre, parmi lesquels *Salmonella*, *Shigella*, et *Escherichia* qui compte cinq espèces : *E. coli*, *E. Blattae*, *E. hermanii* , *E. vulneris* et *E. fergusonii*.

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).

La température de croissance des STEC est en générale comprise entre 40 et 45,5°C, de ce faite la majorité des STEC peuvent être classées dans le groupe des coliformes thermotolérants capables de fermenter le lactose à 44,5°C.

La majorité des coliformes thermotolérants, et spécifiquement *E. coli*, sont des indicateurs d'une contamination d'origine fécale.

Leur dénombrement permet d'évaluer le niveau d'hygiène des abattoirs et autres unités de production des denrées alimentaires, ainsi que la qualité des eaux.

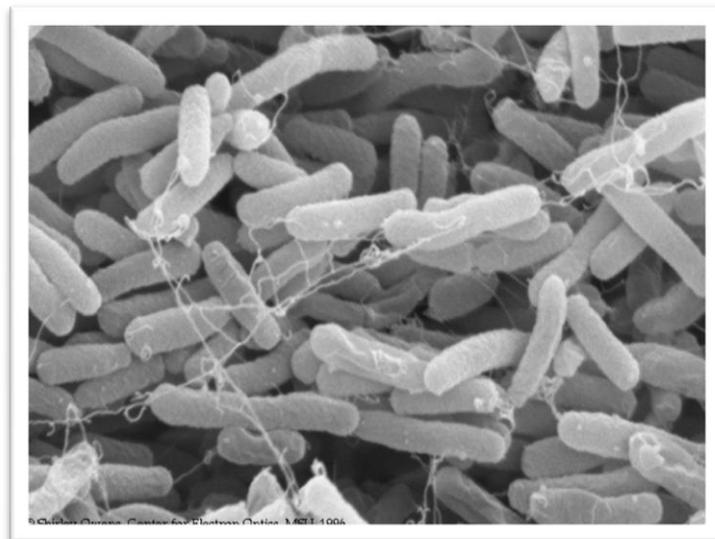


Photo 1 : Aspect d'*Escherichia coli* au microscope optique

E. coli est l'espèce type du genre *Escherichia*, et en partage les caractéristiques principales suivantes :

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1-Bâtonnet court | 7-Catalase positif. |
| 2-Gram négatif | 8-Oxydase négatif. |
| 3-Anaérobie facultatif | 9-Rouge méthyle positif. |
| 4-Généralement mobile | 10-Vosger-Prauskauer négatif. |
| 5-Non sporulé | 11-Ne se multiplie pas en milieu Simmons. |
| 6-Réduit le nitrate en nitrite | 12-Fermente le glucose. |

La plupart des souches produisent de l'indole et fermentent le lactose.

Le sérotype O157:H7 d'*E. coli* possède toutes les caractéristiques citées ci dessus, 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 le STEC du sérogroupe O157 est presque toujours résistant 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).

4 Antigènes et sérotypage

L'antigène somatique O, définissant le sérotype, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à gram négatif.

L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle permettant la mobilité de la bactérie.

4.1 Les antigènes somatiques O

Les antigènes somatiques sont composés de lipopolysaccharides complexes.

L'antigène O fait partie du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe de la bactérie à gram négatif. Il contient un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides de 3 à 6 sucres dont la combinaison détermine la diversité des antigènes O. 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).

Actuellement certains laboratoires d'analyses médicales utilisent l'agglutination avec des sérums pour déterminer le sérotype, mais cette technique est limitée par le nombre de plus en plus élevé de sérum à fabriquer, par la présence d'agglutination croisée entre les antigènes O d'*E. coli*, *Shigella* et ceux de *Salmonella*. C'est pour cette raison qu'une technique de sérotypage moléculaire a été développée.

4.2 Les antigènes flagellaires H

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-).

Une technique de sérotypage moléculaire a donc été également développée pour déterminer l'antigène H (Zhang et al., 2000).

L'antigène H est codé par le gène *flic*. Les parties N et C terminales de la flagelline sont très conservées et c'est la partie médiane, plus variable, qui donne la spécificité de l'antigène H.

Les *E. coli* immobiles possèdent également le gène *flic* mais sont incapables de synthétiser un flagelle fonctionnel.

4.3 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).

5 Caractères culturels de base des STEC

Les données de la littérature concernant la croissance des STEC sont éparpillées. Le sérotype O157:H7 a souvent fait l'objet d'études (Vernozy-Rozand et Montet, 2005).

E. coli O157 :H7 est une bactérie aéro-anaérobie facultative, elle 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'*Escherichia 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).

5.1 Température

La température de croissance des STEC est analogue à celle des *E. coli* en général, cependant la température d'incubation des *E. coli* O157:H7, après enrichissement préconisé par les normes AFNOR, est de 42°C, c'est à dire au-delà de la température de croissance des STEC en général (AFSSA, 2003).

Tableau 1 : Température de croissance des STEC (Nauta et Dufrenne, 1999)

Température minimale	Température optimale	Température maximale
6 à 7°C	40°C	45,5°C

5.2 pH

Tableau 2 : 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

5.3 Activité de l'eau a_w

Tableau 3 : a_w nécessaire a la croissance des STEC (Nauta et Dufrenne, 1999)

a_w minimale	a_w optimale
0,96	0,995

6 Facteurs de virulence et pouvoir pathogène des STEC

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. Parmi ces facteurs de virulence, nous décrirons :

6.1 Les Shiga-toxines

Les Shiga-toxines, Stx1 et Stx2, sont considérées comme les principaux facteurs de virulence d'*E. coli* O157. Toutefois, il existe d'autres facteurs de virulences qui peuvent eux aussi avoir un rôle dans la pathologie (Barkocy et *al.*, 2004).

6.1.1 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.

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).

Stx1 ainsi que Stx2 sont codées par des gènes phagiques (phages tempérés) organisés dans un opéron de 1 230 paires de bases. Elles ont chacune leur propre régulation et peuvent être produites indépendamment par une même bactérie (Joly et Reynaud., 2003).

6.1.2 Mode d'action

Les Shiga-toxines provoquent un détachement et une destruction irréversible qui a été observée, à l'origine, sur des cellules Véro en culture, et induisent une réponse sécrétoire et entéronécrosante dans l'intestin. L'activité sécrétoire est encore mal comprise, mais l'effet cytotoxique est aujourd'hui bien expliqué (Rousset et Dubreuil., 2000).

L'attachement du pentamère de la sous-unité B au glycolipide membranaire, le globotriosyl céramide Gb3 (glactose- α (1-4), galactose- β (1-4), glucosyl-céramide), induit l'entrée de la sous-unité A dans la cellule. Le récepteur Gb3 de la Shiga-toxine 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 mises à part les cellules Véro, seules les cellules humaines y sont sensibles.

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). Les entérocytes, les cellules endothéliales vasculaires humaines du colon, du parenchyme rénal et du système nerveux central, sont particulièrement riches en récepteurs Gb3.

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 (Galmiche et Bouquet., 2001). L'inhibition de la synthèse protéique aboutit à la mort de la cellule. 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.

6.1.3 Les 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. Plusieurs phages codant les toxines Stx ont été identifiés (Beutin et *al.*, 1997).

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*.

→ Les 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.

a. Les variants du gène *stx₁*

Quelques variant 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_{1OX3}*, a été retrouvé aussi chez des souches humaines (Koch et al., 2001). 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.

Le variant *stx_{1d}* a été mis en évidence chez une souche d'origine bovine (Burk et al., 2003). 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.

b. Les variants du gène *stx₂*

Les variants *stx₂* sont beaucoup plus nombreux. A ce jour, 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 récemment isolé à partir de viande ovine et de selles des patients atteints du SHU en France (Espié et Vaillant., 2002).

6.2 Le 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.

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 plus ou moins dépolymérisée 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.

Les gènes responsables de la formation de ces lésions sont :

- Le gène *eae* (pour *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 and Kaper, 1991).
- Le gène *tir* qui code le co-récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor).

Le gène *eae* et le gène *tir* sont portés par un îlot de pathogénicité particulier appelé « locus d'effacement des entérocytes (LEE) » situé sur le chromosome. Ces îlots de pathogénicité 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 réplication 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 locus d'effacement des entérocytes, 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).

6.3 L'adhésine SAA

Certains STEC ne possédant pas le LEE: *stx* +, *eae*- et *ehx* + 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 (Paton *et al.*, 2001), isolées fréquemment chez les petits ruminants sont également isolées en situation pathogène chez l'homme.

Ces souches possèdent une adhésine appelée SAA (pour 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*, et qui est présente chez des souches de STEC de sérotypes O113:H21, O48:H21, O91:H21 isolées de cas de SHU (Paton *et al.*, 2001).

6.4 L'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).

6.5 La 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 (présent chez des souches EHEC) 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 *E. coli* non O157 isolées 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)

6.6 La 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 fer aux cellules eucaryotes.

Les bactéries peuvent s'approvisionner en fer selon cinq stratégies différentes (Mainil, 2003b) :

- 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).

6.7 L'entérotoxine EAST1

Mise en évidence chez les *E. coli* entéroagrégatifs, elle agit sur les cellules intestinales au niveau des mécanismes de sécrétions (Nataro et Kaper, 1998). 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 diarrhée aqueuse observée lors des infections à EHEC.

7 Les 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 3 à 4 jours pouvant aller jusqu'à 10 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 (Griffin et Tauxe, 1991).

7.1 La 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).

7.2 Le syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Le syndrome hémolytique et urémique est caractérisé par la triade (Goodship., 2004) :

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

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).

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 repliement 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 *E. coli* O157:H7 est associé à une diarrhée prodromique à laquelle succède une insuffisance rénale aigue (Goodship., 2004).

Les facteurs prédictifs de la sévérité du SHU incluent (Goodship., 2004):

- Un âge inférieur à 2 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 μ mol si âge < 2 ans, ou > 70 μ mol si âge > 2 ans).

La persistance de l'anurie au-delà du dixième jour, la nécessité de dialyse à la phase aigue 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).

7.3 Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

Outre la triade anémie hémolytique microangiopathique, thrombopénie et insuffisance rénale aigue, 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.

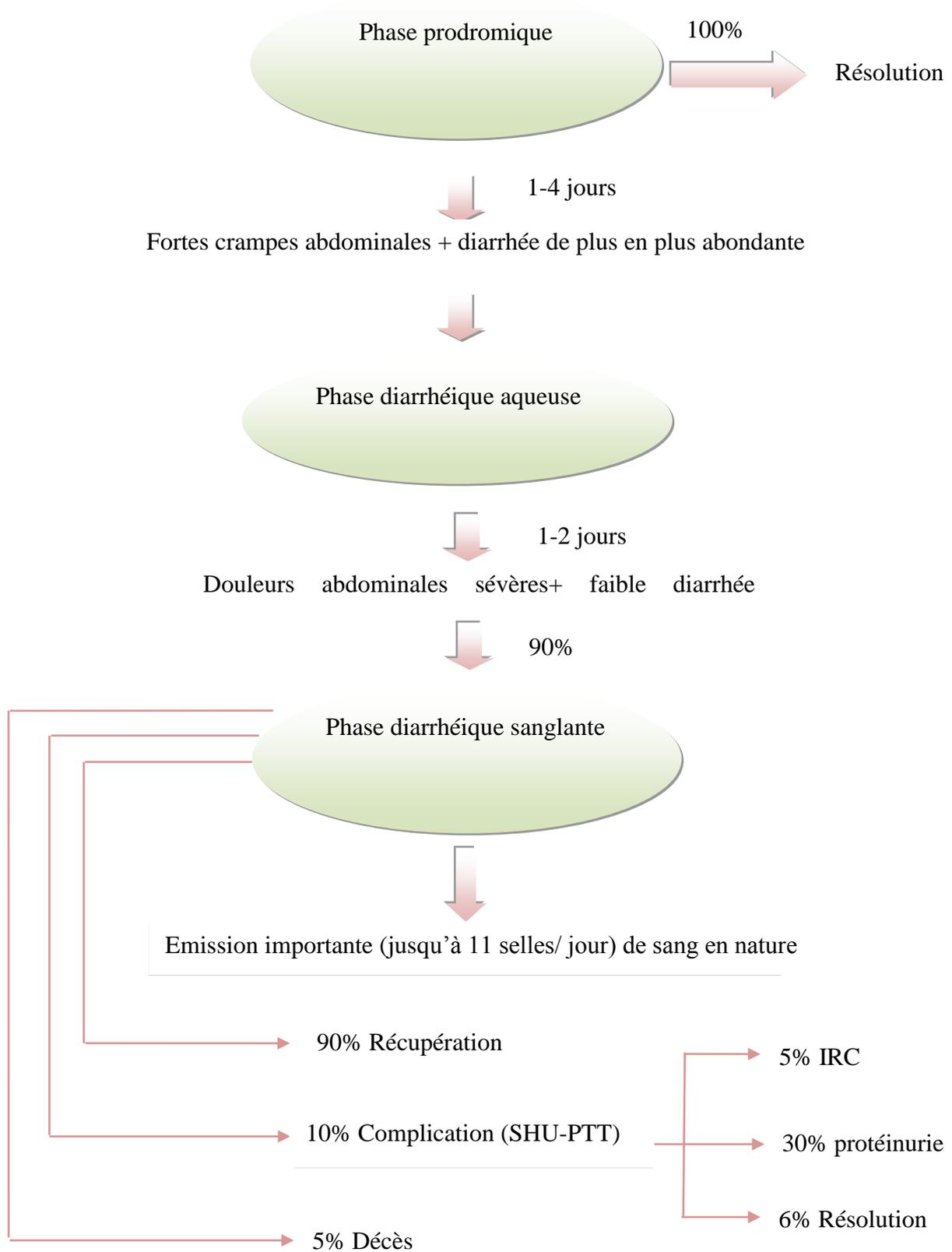


Figure 7 : Evolutions cliniques de la colite hémorragique due à *E. coli* O157:H7 (Sutra et al., 1998, AFSSA, 2003).

7.4 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 ces dernières années (Ruggenti et Remuzzi, 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'héparine et les agents antithrombotiques exposent à un risque accru de saignement et doivent être évités.

De nouveaux traitements destinés à prévenir l'exposition des organes cibles à la Shiga-toxine sont en cours d'évaluation : résines liant la toxine après administration orale, et immunisation active ou passive (Ruggenti et Remuzzi, 2000).

8 Epidémiologie des STEC

Les affections dues aux STEC sont essentiellement 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 (Sutra et *al.*, 1998).

8.1 Epidémiologie des STEC chez l'homme

Depuis que l'on a reconnu pour la première fois cet agent pathogène chez l'homme en 1982, *E. coli* entérohémorragique a acquis une notoriété croissante dans les secteurs sanitaires et secteurs agricoles des pays développés ainsi que chez le grand public.

La propension de ce groupe d'agents pathogènes à provoquer des épidémies importantes, parfois très étendues dans l'espace, et son association à des séquelles pouvant menacer la vie des sujets atteints, ont donné de l'élan au développement de la recherche dans les domaines de l'épidémiologie, de la pathogenèse et de la prévention, et elles ont également suscité une attention sans précédent de la plupart des médias.

Le recours à des épreuves diagnostiques décelant la Shiga-toxine a permis d'impliquer d'autres sérotypes de STEC, comme O26:H11, O111:NM, et O103:H2, dans la survenue de flambées épidémiques et de cas sporadiques de diarrhées sanglantes ainsi que du SHU (OMS., 1999).

Les STEC ont été détectés dans tous les pays où ils ont été recherchés. Cependant, la manifestation épidémiologique de ces nouveaux pathogènes n'est pas totalement maîtrisée. Ces infections sont plus fréquentes dans les pays industrialisés (ouest du Canada, Amérique du Nord) que dans les pays en développement (OMS., 1999). Elles sont apparues en Grande Bretagne, Italie, Allemagne, Australie, Argentine, Irlande, Belgique, Japon, Chine et Afrique du Sud (Griffin et Tauxe, 1991). Dans les pays industrialisés tous les moyens (méthodes, infrastructures) de détection et de surveillance sont mis en œuvre (Sutra et *al.*, 1998).

Les estimations de l'incidence dans les populations donnent une mesure du fardeau de la morbidité imputable à O157:H7. Ces données n'ont été systématiquement recueillies que dans relativement peu de pays et régions. Le criblage au laboratoire n'a pas été instauré uniformément et les mécanismes de surveillance ainsi que les méthodes de confirmation des

cas ont varié. En conséquence, elles sous-estiment probablement l'incidence réelle des affections imputables à ce sérotype et les comparaisons entre pays devraient être effectuées avec une certaine prudence (OMS., 1999).

Au Canada, l'incidence de l'infection due aux STEC a fluctué entre 4 et 5,9 cas par 100 000 habitants (1 183 et 1 672) entre 1990 et 1997. Presque toutes ces souches appartiennent au sérotype O157:H7. La plupart des cas sont sporadiques, mais des épidémies ont été documentées ; la plus importante étant survenue en 1991 avec 521 cas (Anonyme, 2000).

Les résultats de surveillance du SHU en France entre 1996 et 2004 ont rapporté 743 cas de SHU avec une incidence annuelle de 0,7/100 000. L'incidence maximale a été observée chez les enfants dont l'âge est inférieur ou égal à 2 ans avec une incidence de 3,4/100 000. Le pourcentage de décès était inférieur à 1% (Mailles et al., 2005).

Le CDC (Centre of Disease Control and Prevention) estime à 73 000 par an les cas d'infection par *E. coli* O157:H7 aux Etats-Unis. Chaque année, 2 100 américains sont hospitalisés et 61 personnes meurent des suites directes de complications dues à une infection par *E. coli* (CDC, 2006). Aux Etats-Unis, on estime que 5 à 10% des sujets souffrant d'infections à O157:H7 développent le syndrome hémolytique et urémique, ce qui en fait la cause principale des insuffisances rénales acquises.

En général, les enfants de moins de 5 ans sont ceux qui courent le risque le plus élevé de développer ce syndrome, avec une incidence estimée à environ 3 cas pour 100 000 habitants et par an dans ce groupe d'âge aux Etats-Unis (OMS., 1999).

Plusieurs études portant sur les enfants diarrhéiques dans les pays en développement ont établi que l'on y a isolé rarement des STEC. L'une des explications à la faible incidence des infections à STEC dans ces pays pourrait être que l'exposition fréquente à des *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) au début de la vie assurerait une protection contre les STEC par le biais de facteurs de virulence croisés et partagés, comme l'intimine (OMS., 1999).

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. En 2003, une étude, menée aux Etats-Unis, a estimé le coût annuel des infections par *E. coli*

O157:H7 à 405 millions de dollars. Les coûts estimés comprennent 370 millions de dollars pour les décès précoces, 30 millions pour les soins médicaux, et 5 millions pour la perte de productivité (Frenzen et *al.*, 2005).

8.2 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).

8.2.1 Chez les bovins

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).

Une étude Suisse a révélé que 14% des bœufs, 23,7% des veaux, 20,5% des broutards, 18,5% des taureaux, 9,5% des génisses et enfin 2,3% des vaches étaient positifs à l'égard des STEC (Zweifel et Stephan., 2005). Il est aussi apparu que les jeunes animaux éliminent plus de STEC que les animaux âgés (Hancock et *al.*, 2001). Ces différences de résultats entre les deux classes d'âge peuvent être dues au stade de développement du rumen et du système immunitaire, à la diète, au manque de colostrum ingéré ou à d'autres facteurs indéterminés.

Toujours en Suisse, sur 2 930 échantillons d'excréments de bovins analysés, 1,6% se sont révélés positifs à l'égard d'*E. coli* O157. Partant de ces échantillons positifs, 32 souches sorbitol-positives et 6 souches-sorbitol négatives ont été isolées. Les six souches sorbitol-négatives, dont trois isolées de veaux, deux de génisses et une d'une vache, étaient porteuses de gènes *stx* et appartenaient aux sérotypes O157 :H- et O157:H7 (Al-Saigh et *al.*, 2004).

La prévalence de STEC O157 en Suisse est de 0,2%. Néanmoins, toutes les souches STEC O157 isolées présentaient le profil de virulence typique des souches pathogènes pour l'être humain.

L'infection des cheptels par la bactérie *E. coli* O157:H7 est transitoire, avec un pic de prévalence en été et au début de l'automne (Hancock et *al.*, 2001).

8.2.2 Chez les petits ruminants

Comme les bovins, les ovins et les caprins peuvent être porteurs de STEC dont O157:H7. Ils sont considérés comme des réservoirs naturels de ces pathogènes (Rey *et al.*, 2006).

Les STEC ont été isolés de 66,6% des ovins et de 51,1% des chèvres (Beutin *et al.*, 1993). Les principaux sérotypes isolés à partir des ovins sont : O5 :H-, O16 :H-, O75 :H-, O75 :H8, O87 :H16, O91 :H-, O146 :H21, O172 :H- (Vettorato *et al.*, 2003).

Soixante souches ovines réparties en 19 sérotypes O :H différents ont été isolées de moutons de boucherie en Suisse, à l'occasion d'une étude portant sur les STEC non O 157 (Zweifel *et al.*, 2005). Parmi les souches STEC non O157 isolées, quatre souches ovines de sérotypes O103 :H2 et O121 :H10 ont présenté un profil de facteurs de virulence analogue aux souches capables de provoquer des pathologies graves.

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 (ensilage de mauvaise qualité), peuvent également favoriser la persistance d'*E. coli* O157 dans les aliments destinés aux animaux (Brisabois *et al.*, 2004).

8.2.3 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. Un portage de STEC ou de souches de O157 a été ainsi observé chez les porcs, les chiens, les chats, les chevaux et les oiseaux (Hancock, 2001)

Les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines ont été retrouvés dans 7,5% des fèces de porcs, dans 4,8% des fèces de chiens, dans 13, 8% des fèces de chats et dans 0,7% de fientes de volailles (Beutin *et al.*, 1993).

8.3 Mode de transmission

Il existe deux voies de transmission des STEC, la voie dite directe et la voie indirecte.

8.3.1 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, jus de fruit, mayonnaise,...).

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

a. Présence des STEC dans les filières de transformation des viandes

L'introduction à l'abattoir d'animaux porteurs d'*E. coli* O157:H7 entraîne un risque élevé de contamination des carcasses, y compris de celles provenant d'animaux détectés non excréteurs par contamination croisée.

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.

Concernant les produits de viandes transformées d'origine bovine, en France, pendant l'année 2005, 69 cas d'infections à *E. coli* O157:H7 ont été enregistrés avec 17 cas de SHU, 33 cas de diarrhée sanglante et 19 cas de diarrhée simple. Les victimes de la toxi-infection ont mangé des steaks hachés surgelés contaminés par des *E. coli* O157:H7 (Mailles et *al.*, 2005).

Des produits à base de viandes de volaille (sandwichs avec de la viande de dinde) ont déjà été suspectés dans des épidémies à *E. coli* O157:H7 (Griffin et Tauxe, 1991).

b. 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 (Brisabois et al., 2004). 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% était contaminé par des *E. coli* O157:H7 (Rey et al., 2006).

c. Présence des STEC dans les végétaux

La consommation de végétaux crus a été décrite comme un des modes de contamination chez l'homme par les STEC et 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 pourrait également se faire par l'intermédiaire de l'eau. Il existe un lien entre l'utilisation de produits d'origine animale contaminés pour fertiliser les champs, (fumiers, fientes de volailles,...) et la contamination des végétaux qui y sont cultivés (OMS., 2005).

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).

d. 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 *E. coli*. L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignade dans un lac ou autre étendue d'eau ou dans une piscine a elle aussi été incriminée.

Au début des années 90, une épidémie d'origine hydrique (243 personnes affectées, dont 32 hospitalisations et 4 décès) mettant en cause la souche O157:H7, s'est produite dans une petite municipalité du Missouri (3 000 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 jéjuni* à la suite de la contamination de l'un des puits municipaux par des déjections de bovins. Plus de 2 300 personnes auraient été affectées parmi lesquelles 1 346 ont manifesté des signes cliniques et six sont décédées (Bgoshu., 2000).

8.3.2 Transmission directe

a. 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 53 enfants infectés par *E. coli* O157:H7 qui ont développé une CH ou un SHU, a montré, comme chez les bovins, qu'il y avait une excrétion intermittente d'*E. coli* O157:H7.

b. 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).

En 2003, deux unités de santé publique ont signalé au British Columbia Centre for Disease Control (BCCDC) cinq cas confirmés au laboratoire et deux cas cliniques d'infection à *E. coli* O157:H7, associés à des sorties éducatives d'écoliers et d'enfants en garderie dans une ferme au Canada (Anonyme, 2004). Le zoo pour enfant abritait des chèvres, des moutons, des canards et des lapins. L'analyse des excréments provenant d'une chèvre a mis en évidence *E. coli* O157:H7 présentant le même profil électrophorétique que les cas humains confirmés en laboratoire.

Tableau 4 : Description de quelques épidémies d'infection à EHEC

ou cas de SHU rapportés dans le monde de 1996 à 2006. (Ammon., 1997 ; promedmail., 2006).

Année	Pays	Nb d'infections	Nb SHU	Nb de décès	Sérotype	Mode de transmission
1992	Austria	9	0	0	O157	alimentation
1992	England/Wales	37	5	0	O157	de personne à personne
1992	Germany	41	3	1	O157: H7	de personne à personne
1992	Italy	7	9	1	O111	inconnu
1992	Scotland	5	1	0	O157	eau
1992	France	n.a	4	1	O119:B14	fromage au lait cru
1992/93	England/Wales	7	3	0	O157	lait
1993	England/Wales	9	2	0	O157	alimentation, de personne à personne
1993	England/Wales	7	3	1	O157	hamburger
1993	England/Wales	17	3	0	O157	alimentation
1993	Italy	14	15	1		de personne à personne
1993	Scotland	5	3	0	O157	contact animal (bovins)
1994	England/Wales	2	0	0	O157	contact animal (bovins, chèvre)
1994	England/Wales	7	4	0	O157	alimentation, de personne à personne
1994	England/Wales	12	2	0	O157	fromage de chèvre au lait cru
1994	France	n.a	4	0	O103	hamburger
1994	Scotland	100	9	0	O157	lait
1994	Scotland	8	3	0	O157	hamburger
1994	Scotland	16	n.a	n.a	O157	contact animal
1994	Scotland	4	1	0	O157	fromage
1994	Scotland	22	1	0	O157	alimentation

Année	Pays	Nb d'infections	Nb SHU	Nb de décès	Sérotype	Mode de transmission
2000	USA	55	4	/	O157:H7	viande hachée de bœuf
2000	USA	29	/	/	O157:H7	eau de surface
2000	USA	56	16	/	O157:H7	ferme pédagogique
2001	Autriche	2	1	/	O157 : H-	lait de chèvre cru
2001	Japon	264	/	/	O157	viande
2002	USA	18	2	/	O157:H7	viande de bœuf
2002	USA	29	/	/	O157:H7	laitue
2002	USA	28	5	/	O157:H7	viande hachée de bœuf
2003	France	2	/	/	O157	concombre
2003-2004	Danemark	25	0	0	O157 : H-	lait
2004	Japon	3	/	/	O157:H7	viande hachée de bœuf
2002	Royaume-Uni	7	/	/	O157	eau de baignade
2002	USA	108	15	/	O157	zoo
2005	Pays-bas	21	/	/	O157	steak tartare
2005	Suède	110	7	/	O157	laitue
2005	Suisse	7	2	/	O157	eau de distribution
2005	USA	18	/	/	O157	poisson
2005	USA	63	7	/	O157:H7	zoo
2005	USA	2	/	/	O157:H7	zoo
2006	Norvège	7	/	/	O103	viande hachée
2006	Royaume-Uni	13	4	/	O157	garderie
2006	Royaume-Uni	5	3	/	O157	pataugeoire
2006	USA	192	30	1	O157:H7	épinards

n.a : non disponible

9 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).

9.1 Chaleur

E. coli O157:H7 n'est pas classé 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, à savoir (Leyral et Vierling, 1997) :

- $D_{T^{\circ}C}$ = durée d'application nécessaire d'une température donnée pour détruire 90% de germes initialement présents ;
- Z = différence en degrés Celsius séparant deux températures pour lesquelles les valeurs de D sont dans un rapport de 1 à 10.

Les principaux résultats, obtenus, à partir des différentes denrées testées, concernant la thermorésistance d'*E. coli* O157:H7 et quelques autres sérotypes de 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 :

- 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 2 minutes (AFSSA, 2003).

9.2 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).

9.3 Congélation

On ne connaît actuellement 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).

9.4 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.

9.5 Nitrites

Le nitrite de sodium (E250) 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).

9.6 Ionisation

L'irradiation des denrées alimentaires consiste, dans le but d'accroître leur durée de conservation et/ou d'améliorer leurs qualités hygiéniques, à les exposer à l'action directe de rayonnements de haute énergie : photon de courte longueur d'onde, électrons accélérés (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).

10 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.

En outre, elles sont destinées à la détection des seules souches de sérotype O157, et de ce fait de nombreuses souches non O157, potentiellement dangereuses pour l'homme, ne sont pas encore détectables en routine (Sutra et al., 1998).

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 Vernozy-Rozand, 2000). Ceci explique que la mise au point de méthodes de détection se heurtent souvent à des problèmes de sensibilité. 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 O157 ;
- Méthodes génétiques détectant les gènes codant les Shiga-toxines ou des marqueurs associés au sérotype O157:H7.

10.1 Méthodes microbiologiques

La détection d'*E. coli* O157:H7 dans les aliments peut être réalisée soit par la méthode classique de culture, soit par des méthodes dites alternatives. Toutes les méthodes actuellement disponibles ont été mises au point ou testées avec *E. coli* O157:H7. Les combinaisons entre les méthodes de bactériologie classiques et les méthodes alternatives sont nombreuses. Néanmoins, quelle que soit la combinaison retenue, le diagnostic de contamination d'un aliment par *E. coli* O157:H7 nécessite trois phases dont une indispensable, la phase d'enrichissement (Sutra et al., 1998).

10.1.1 L'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. L'enrichissement non sélectif

Les bouillons fréquemment utilisés sont le bouillon nutritif trypticase- soja (TSB) et l'eau peptonée tamponnée (EPT). La période de revivification est comprise entre 6 et 7 heures à 37°C. Une durée plus longue n'est pas souhaitable puisqu'elle permet un envahissement par la flore compétitive (De Zutter et Uradzinki, 1997).

b. L'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, telles que *Aeromonas* et *Proteus spp* (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 24 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). 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).

10.1.2 La détection

a. Isolement par culture bactériologique sur milieu sélectif

Environ 93% d'*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 cefixime 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-4-chloro 3-indoxyl-B-D-glucuronide) et du milieu SMAC-MUG (4-méthylumbellifery- β -glucuronide). Cette activité se traduit par l'apparition d'une coloration bleu-verte des colonies ou d'une fluorescence sous lampe à UV (Thompson et al., 1990).
- Chapman et al., (1991) ont incorporé le rhamnose dans la gélose SMAC contenant la cefixime qui inhibe la croissance de *Proteus spp* (CR-SMAC), car la fermentation de ce sucre permet de différencier plusieurs souches d'*E. coli* non O157 sorbitol négatives et rhamnose positives des souches d'*E. coli* O157 sorbitol négatives et rhamnose négatives.

b. Confirmation des colonies suspectes

Actuellement, il existe plusieurs techniques de confirmation, dont :

- La séro-agglutination qui est un test d'agglutination au latex O157 réalisé directement sur la colonie suspecte pour la présence de l'antigène somatique O157 (Latex anti-O157, Oxoid).
- Les tests biochimiques (Gram, oxydase, galerie API 20 E).
- La production de Stx (effet cytotoxique sur cultures de cellules Véro).
- La recherche des Shiga-toxines par ELISA
- La recherche des gènes *stx* par PCR.

10.2 Méthodes immunologiques

Tout comme la méthode microbiologique, les tests immunologiques de détection d'*E. coli* O157:H7 doivent être précédés par la 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.

10.2.1 Système ELISA (validé AOAC Official Method 996.10)

Le test ELISA permet de donner les résultats en 2 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).

10.2.2 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).

10.2.3 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 24 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).

10.3 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).

10.3.1 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 *stx*₁ et *stx*₂ 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, 1989, ont utilisé quatre oligonucléotides correspondant à quatre régions différentes du gène *stx*₁ et un oligonucléotide (41 bases) dérivé du gène *stx*₂ 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).

10.3.2 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

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 chacun 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 avec des amorces « dégénérées », c'est à dire un mélange de plusieurs amorces permettant d'amplifier les gènes *stx₁* et *stx₂* (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000). 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 *stx₁* et *stx₂*.

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 *stx₁*, *stx₂* et *stx_{2e}*.

Les gènes *uidA* codant la β -glucuronidase, *eae* codant l'intimine responsable de l'attachement de la bactérie aux entérocytes et le gène *flic* codant la flagelline, protéine constitutive du flagelle, peuvent être détectés seuls ou en combinaison avec les gènes *stx* (PCR multiplex).

11 Prévention et contrôle

La prévention des infections humaines à STEC présente de multiples facettes. Elle est cependant surtout orientée vers les filières animales par le fait que les animaux sont les réservoirs les plus importants. Pour les viandes et les produits carnés, les procédures HACCP, 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 (Legrand, 1997).

Afin de prévenir la contamination du lait cru dans les élevages, de grandes précautions doivent être prises lors de la traite des animaux laitiers (OMS, 2005).

L'introduction de phases de nettoyage et/ou de pasteurisation dans le processus de transformation des produits végétaux constitue par ailleurs un élément clé de la prévention des infections humaines (Legrand, 1997).

Un certain nombre d'infections à EHEC ont été associées à des baignades. Il est donc important de protéger ces zones aquatiques ainsi que les sources d'eau de boisson des déjections animales (OMS, 2005).

Enfin, le développement de dispositifs d'épidémiologie-surveillance des infections à STEC pourrait permettre de prévenir la transmission des maladies, mais aussi de mieux connaître l'origine et les moyens de transmission des germes.

11.1 Elaboration d'un vaccin humain contre *E. coli* O157:H7

Trois facteurs prédominants doivent être pris en compte dans la conception d'un vaccin efficace ;

- L'agent pathogène ;
- La population ciblée ;
- Le but de l'intervention.

Plusieurs voies d'élaboration du vaccin sont poursuivies, à savoir :

- Les vaccins vivants atténués ;
- Les vaccins à cellules entières tuées ;
- Les conjugués polysaccharide-protéine ;
- Les vaccins à sous-unité de l'anatoxine Stx.

Les chercheurs de l'institut national pour la santé infantile et le développement humain aux Etats-Unis ont produit plusieurs vaccins candidats conjugués avec le polysaccharide O157 en faisant appel à l'exotoxine A (rEPA) de *Pseudomonas aeruginosa* produite par recombinaison génétique et la sous-unité B de Stx1 comme supports protéiques (OMS, 1999). Cette approche repose sur la découverte que les vaccins efficaces contre *Vibrio cholerae* et *Shigella sonnei* entraînent la production d'IgG sériques anti-LPS en corrélation avec la protection. L'évaluation en phase 1 chez des volontaires adultes a été réalisée pour 3 vaccins comportant un LPS O157 détoxifié lié par covalence à la rEPA. Chacun d'entre eux a établi son innocuité et a induit la production d'anticorps spécifiques anti-O157 chez tous les vaccinés.

Des recherches sont en cours de réalisation actuellement pour mettre au point des vaccins candidats conjugués comportant le LPS O157 et le LPS O111 détoxifiés liés par covalence à des supports consistants en holotoxines mutantes Stx1 et Stx2. Il reste à évaluer si ces candidats se révéleront efficaces pour réduire la colonisation du bétail ou protéger l'homme de la maladie (OMS, 1999).

Un chercheur japonais s'est efforcé à développer un vaccin à base de cellules entières d'*E. coli* O157:H7 irradiées au cobalt. Les bactéries exposées au cobalt-60 sont tuées mais restent mobiles et adhèrent aux cellules *in vitro*. L'évaluation d'un vaccin candidat chez

l'animal à base de cellules entières d'*E. coli* O157:H7 irradiées au ⁶⁰Co n'est pas encore effectuée (OMS, 1999).

11.2 Elaboration d'un vaccin pour les ruminants contre *E. coli* O157:H7

Plusieurs groupes de chercheurs travaillent, sur la vaccination du bétail contre *E. coli* O157:H7 (Hancock et *al.*, 2001).

L'administration à des bovins en parc d'engraissement d'un vaccin mis en point au Canada contre *E. coli* O157:H7 a diminué l'excrétion de la bactérie dans leur fumier, selon les résultats d'un essai clinique effectué par des chercheurs de l'université du Nebraska au cours de l'été 2002.

Chez les 384 bovins inclus à l'essai qui s'est étendu de mai à septembre 2002, la prévalence prétraitement d'*E. coli* O157:H7 était de 31% en moyenne. Au cours de l'essai, le pourcentage moyen de bovins ayant éliminé la bactérie après l'administration du vaccin a été de 8,8%. Le vaccin stimule la production d'anticorps pour empêcher *E. coli* O157:H7 de se fixer à la paroi intestinale des bovins. Les anticorps limitent la colonisation par les bactéries, enrayant leur réplication, et réduisent le nombre des bactéries chez les animaux ainsi que leur élimination dans l'environnement. Des études et essais cliniques en champ se poursuivent au Canada et aux Etats-Unis afin de déterminer l'efficacité du vaccin contre *E. coli* O157:H7 (Anonyme, 2003).

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Problématique

Les *E. coli* pathogènes, et particulièrement *E. coli* O157:H7, ont été mis en évidence dans tous les pays où ils ont été recherchés.

Une étude réalisée en 2001 en Algérie sur la contamination des carcasses bovines par ce sérotype a révélé une prévalence de 7,8% (Chahed et al., 2006). Ceci prouve que le cheptel bovin algérien est porteur de STEC.

Qu'en est-il pour le cheptel ovin, exploité majoritairement pour la production de viande, et qui fournit annuellement une moyenne de 150 000 tonnes avec une consommation de 4,6Kg/habitant/an ? (NEPAD, 2006). C'est cet aspect de l'épidémiologie des STEC peu étudié qui nous a incités à entreprendre ce modeste travail.

Au cours de la réalisation de cette étude, nous nous sommes également intéressés à l'évaluation du niveau d'hygiène de l'un des deux abattoirs où nous avons effectué les prélèvements, par le dénombrement des germes indicateurs de la contamination fécale, conformément aux réglementations européennes (Décision européenne 2001/471/CE). Les résultats nous ont permis d'analyser les pratiques d'abattage en usage et qui sont considérées comme l'un des points critiques de la contamination des carcasses par les différents germes.

1 Matériel et méthodes

1.1 Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé au sein de deux abattoirs de la wilaya d'Alger, l'abattoir de Rouiba et celui d'El Harrach.

1.1.2 Période d'échantillonnage et nombre d'échantillons

L'échantillonnage a été réalisé en deux périodes :

- Une première période s'étendant de décembre 2005 à juin 2006, exceptés les mois de janvier et avril.
- Une deuxième période allant de janvier 2007 à mars 2007.

Cinq à dix carcasses ont été écouvillonnées une fois par semaine de manière aléatoire, généralement en milieu de journée. 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 181.

151 échantillons ont été analysés pour la recherche des *E. coli* O157:H7. Parmi eux 20 auxquels nous avons ajouté 30 échantillons supplémentaires ont été exploités pour le dénombrement des coliformes thermotolérants et d'*E. coli* à 44°C (figure 8). Ceci aux fins de l'estimation des pratiques d'hygiène lors des opérations d'abattage.

100 échantillons ont été prélevés au niveau de l'abattoir d'El Harrach, soit 66,2% du nombre total (151) des prélèvements destinés à la recherche d'*E. coli* O157:H7 :

- 20 échantillons ont été prélevés en mars 2006 soit, 20%.
- 30 échantillons ont été prélevés en mai 2006 soit, 30%.
- 30 échantillons ont été prélevés en juin 2006 soit, 30%.
- 10 échantillons ont été prélevés en février 2007 soit, 10%
- 10 échantillons ont été prélevés en mars 2007 soit, 10%.

51 échantillons ont été prélevés au niveau de l'abattoir de Rouiba, soit 33,8 % du nombre total (151) des prélèvements destinés à la recherche d'*E. coli* O157:H7 :

- 18 échantillons ont été prélevés en décembre 2005, soit, 35,3%.
- 27 échantillons ont été prélevés en février 2006, soit 52,94%
- 06 échantillons ont été prélevés en mars 2006, soit 11,76%.

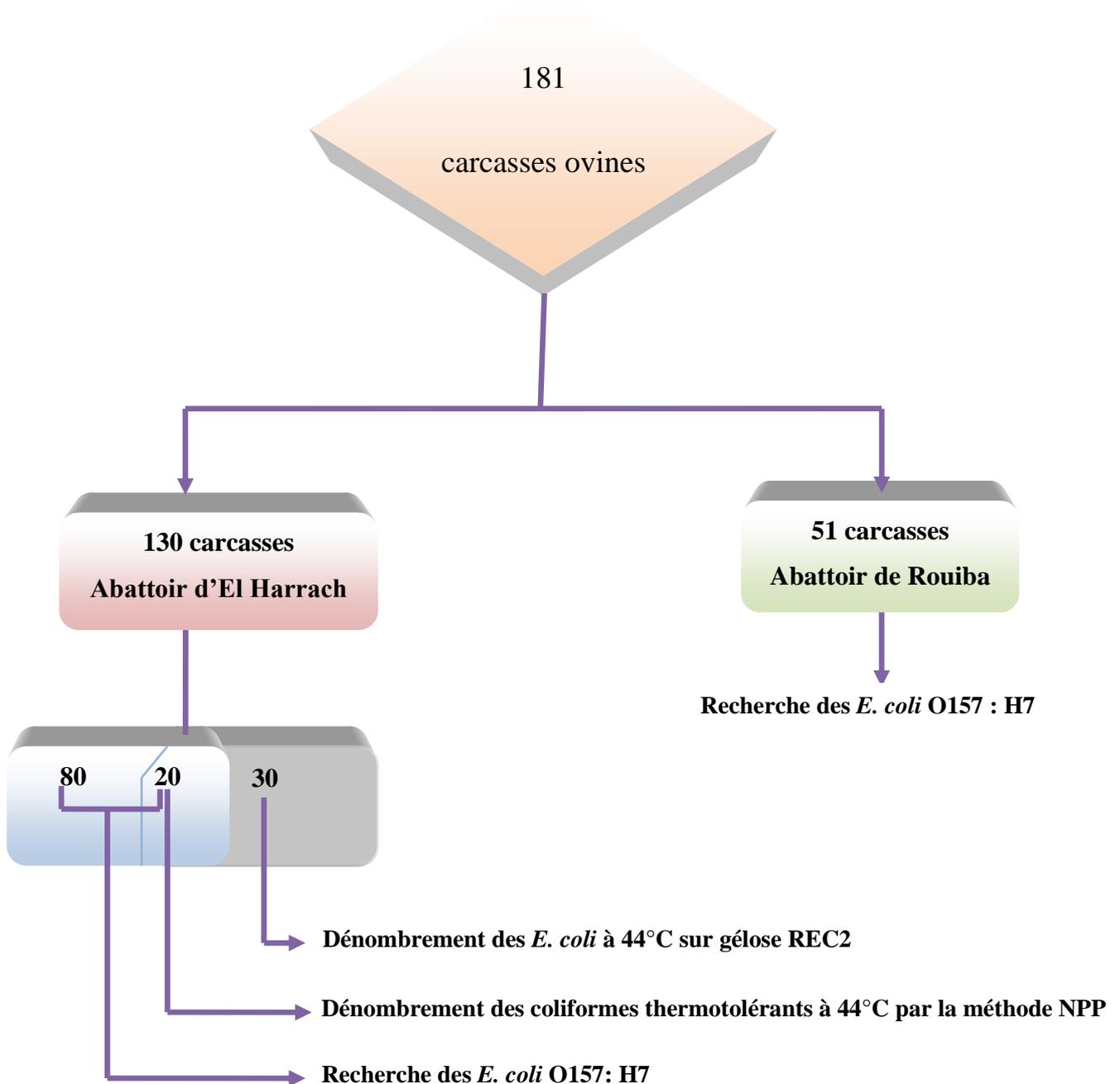


Figure 8 : Echantillonnage réalisé au niveau des deux abattoirs.

L'origine des ovins abattus par abattoir est rapportée dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Origine des ovins abattus au niveau des deux abattoirs

Date	Nb de carcasses	Sexe	Origine des ovins	Abattoir
Décembre 2005	8	mâle	Saïda	Rouiba
Décembre 2005	6	mâle	Djelfa	Rouiba
Décembre 2005	4	mâle	Ksar El Boukhari	Rouiba
Février 2006	10	mâle	EL Bayadh	Rouiba
Février 2006	3	mâle	Djelfa	Rouiba
Février 2006	2	mâle	Méchrria	Rouiba
Février 2006	2	mâle	Saïda	Rouiba
Février 2006	6	mâle	Marché de bétail	Rouiba
Février 2006	4	mâle	Méchrria	Rouiba
Mars 2006	2	mâle	Marché de bétail	Rouiba
Mars 2006	4	mâle	Saïda	El Harrach
Mars 2006	2	mâle	Bouira	El Harrach
Mars 2006	8	mâle	Bouira	El Harrach
Mars 2006	2	mâle	Saïda	El Harrach
Mars 2006	10	mâle	Bouira	El Harrach
Mai 2006	8	mâle	Saïda	El Harrach
Mai 2006	4	mâle	Ksar el Boukhari	El Harrach
Mai 2006	6	mâle	Aïn Defla	El Harrach
Mai 2006	4	mâle	Saïda	El Harrach
Mai 2006	6	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Juin 2006	2	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Juin 2006	8	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Juin 2006	2	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Juin 2006	8	mâle	Ksar El Boukhari	El Harrach
Juin 2006	5	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Juin 2006	5	mâle	Saïda	El Harrach
Février 2007	5	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Février 2007	5	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Mars 2007	5	mâle	Marché de bétail	El Harrach
Mars 2007	5	mâle	Marché de bétail	El Harrach

1.1.3 Méthode d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé selon une méthode non destructive reposant sur le double écouvillonnage des surfaces des carcasses, définie par la Décision européenne 2001/471/CE (J.O. L165/48 du 21.6.2001), et décrite dans la norme ISO 17604.

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.

Les photos suivantes montrent les zones qui ont été écouvillonnées après les étapes d'habillage, d'éviscération et de fente thoracique.



Photo personnelle 2: Membre postéro-externe de la cuisse (zone A)



Photo personnelle 3 : Flanc (zone B)



Photo personnelle 4: Gros bout de la poitrine (zone C)



Photo personnelle 5: Face postérieure du membre antérieur (zone D)

- **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 cotons 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 est réalisée selon la procédure suivante :

1 - Pour chaque site, prendre un coton stérile et l'imbiber avec une solution stérile de TSE (eau tryptone sel, pH : 7);

2 - frotter en exerçant une pression aussi forte que possible avec le coton humidifié la zone de la carcasse délimitée (100 cm²) d'abord verticalement puis horizontalement et enfin en diagonale, et ce pendant 20 secondes ;

3 - Refaire la même opération sur le même site, mais cette fois-ci avec un coton sec ;

- 4 - Placer les huit cotons utilisés pour les 4 sites dans un sac stomacher et le fermer de façon étanche ;
- 5 - Mentionner sur chaque sac les informations relatives aux carcasses écouvillonnées (date, heure, numéro, origine, Abattoir) ;
- 6 - Acheminer les échantillons vers le laboratoire dans une glacière, puis les conserver à +4°C jusqu'à l'analyse qui doit être effectuée dans les 24 heures qui suivent.

1.1.4 Lieux du traitement des échantillons

Pour la recherche des *E. coli* O157 et le dénombrement des coliformes thermotolérants et des *E. coli* à 44°C, le traitement des échantillons a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'El Harrach.

La confirmation de la virulence des souches isolées a été obtenue par amplification génique des gènes qui codent pour les facteurs de virulence, à savoir l'intimine, les Shiga-toxines de type 1 et de type 2 et l'entérohémolysine.

Une partie des souches isolées a été confirmée au niveau du laboratoire national de référence en microbiologie des denrées alimentaires de l'Université de Liège pour les gènes *stx*₁, *stx*₂, *eae* et *ehxA*.

L'autre partie des souches isolées a été confirmée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour deux gènes *eae* et *stx*₂.

La sensibilité des souches d'*E. coli* O157:H7 aux antibiotiques a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie médicale, antibiothérapie et hygiène hospitalière de l'Institut Pasteur d'Algérie.

1.2 Matériel

1.2.1 Equipements :

(Voir la liste en annexe)

1.2.2 Milieux de culture, réactifs:

(Voir liste et formule en annexe)

1.3 Méthodes d'analyses

Les analyses effectuées lors de cette présente étude ont compris :

- La recherche des souches de STEC du sérotype O157 par la technique de séparation immuno-magnétique ;
- La confirmation des souches isolées ainsi que la détection des gènes codant pour les facteurs de virulence par amplification génique (PCR) ;
- La sensibilité des souches d'*E. coli* O157:H7 aux antibiotiques ;
- Le dénombrement des coliformes thermotolérants à 44°C par la méthode NPP ;
- Le dénombrement des *E. coli* à 44°C sur milieu chromogène.

1.3.1 Recherche des souches de STEC du sérotype 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 21).

1.3.1.1 Enrichissement non sélectif

- **Mode opératoire**

- 1 - 100 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) ont été ajoutés dans chaque sac stomacher contenant les écouvillons ;
- 2 - L'échantillon a été homogénéisé au moyen du stomacher péristaltique à 250 cycles pendant deux minutes ;
- 3 - L'échantillon homogénéisé a été incubé à l'étuve à une température de 37°C pendant 7 heures.

1.3.1.2 Immuno-concentration par la technique de séparation immuno-magnétique (IMS)

L'IMS est une phase d'immuno-concentration qui permet d'extraire et/ou de concentrer la bactérie cible du bouillon d'enrichissement (figure 10). La technique de séparation immuno-magnétique utilisant le test Dynabeads anti *E. coli* O157 est validée AFNOR 16/2-0696 et ISO EN 16654.

Les photos suivantes montrent le dispositif de rotation (DynaL simple Mixer) et le portoir muni d'une paroi à aimant concentrateur chargé d'éppendorfs (DynaL MPC- M) utilisés dans l'épreuve de l'IMS.



Photo personnelle 6: Dynal simple Mixer



Photo personnelle 7: Dynal MPC- M

- **Mode opératoire**

- 1 - Charger le Dynal MPC –M d'éppendorfs (maximum 10) ;
- 2 - Numéroté les eppendorfs en fonction du nombre d'échantillons à traiter ;
- 3 - Transférer stérilement 15 µl de Dynabeads anti-*E. coli* O157 dans chaque eppendorf ;
- 4 - Ajouter 1 ml de la suspension mère pré-enrichie à 37°C dans chaque eppendorf, puis mélanger à l'aide du vortex ;
- 5 - Placer les eppendorfs dans le mixer Dynal et laisser tourner pendant 30 minutes pour une bonne homogénéisation ;
- 6 - Placer à nouveau les eppendorfs dans le Dynal MPC- M et remuer pendant 2 à 3 minutes jusqu'à ce qu'une tache brune (concentration des bactéries) se forme sur la paroi des eppendorfs ;

- 7 - Vider aseptiquement le contenu des eppendorfs sans léser la tache formée, puis ajouter 1 ml du tampon de lavage PBS-Tween ; bien mélanger au vortex ;
- 8 - Remuer à nouveau le Dynal MPC- M pendant 2 à 3 minutes, jusqu'à nouvelle concentration des bactéries, puis éliminer le contenu ;
- 9 - Refaire la même opération (étapes 6 à 8) avec le tampon de lavage;
- 10 - Débarrasser le Dynal MPC- M de la paroi à aimant et rajouter dans chaque eppendorf 100 µl de PBS-Tween, puis bien mélanger au vortex.

1.3.1.3 Isolement des *E. coli* O157

- **Mode opératoire**

- 1 - Prélever stérilement les 100µl du complexe billes-bactéries et les étaler sur la gélose Mac Conkey au sorbitol additionnée de tellurite et cefixime (CT-SMAC) ;
- 2 - Incuber les boîtes à l'étuve à 42°C pendant 18 heures.

- **Lecture des boîtes**

Après incubation, on peut obtenir deux types de colonies: des colonies rouges indiquant la fermentation du sorbitol et des colonies blanches laiteuses sorbitol négatives.

Sachant que 93% des *E. coli* O157 sont sorbitol -, 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.

1.3.1.4 Confirmation des colonies suspectes

→ 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 (latex anti-O157) (photo 8).

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 avec une anse de platine stérile on prélève une partie de la colonie suspecte et on la mélange avec 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.

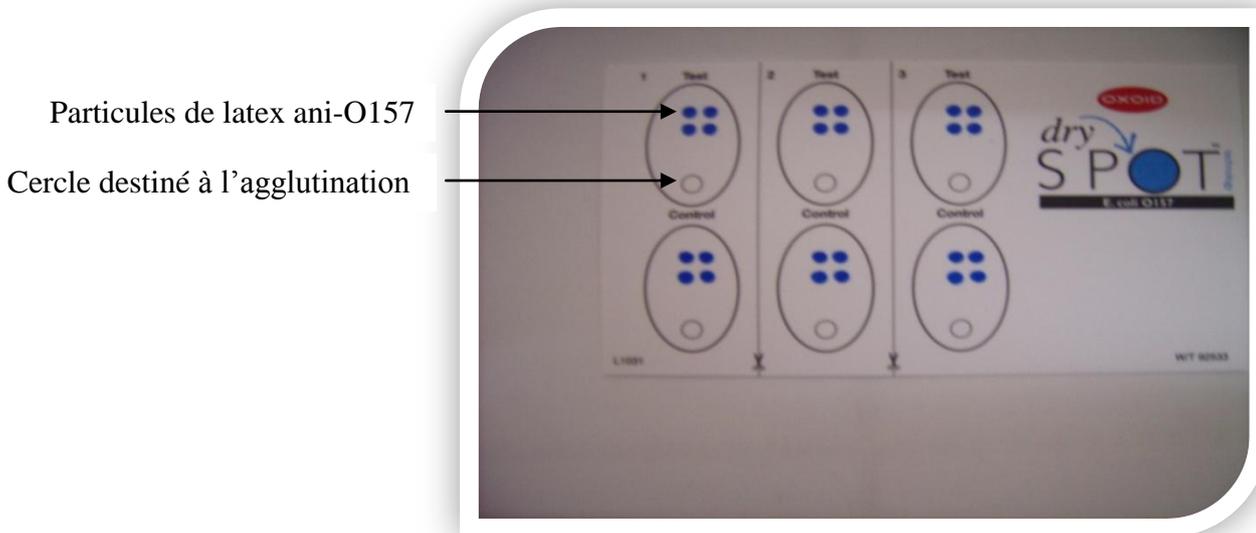


Photo personnelle 8: Test d'agglutination au latex anti-O157

→ Test d'agglutination à l'antisérum H7

Sur une lame en verre, on dépose une goutte de l'antisérum H7, puis on la mélange avec la colonie à tester. Une agglutination en moins d'une minute signe un résultat positif.

→ Caractérisation biochimique

La confirmation de l'appartenance des souches isolées à l'espèce *E. coli* par leur caractérisation biochimique a été réalisée grâce à la galerie API 20 E. C'est une galerie composée de 20 micro-tubes prêts à l'emploi contenant le milieu déshydraté permettant de réaliser 21 tests biochimiques afin d'identifier les bacilles Gram- appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

- **Mode opératoire**

- 1 - Prendre une seule colonie de la souche O157 pure ayant donné un résultat positif avec le test d'agglutination et la transférer dans 5 ml d'eau distillée stérile ;
- 2 - Introduire cette suspension bactérienne dans chaque micro-tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur les côtés pour éviter la formation de

bulles. Pour certains caractères, il faut recouvrir d'huile de paraffine les micro-tubes après inoculation de la suspension pour assurer l'anaérobiose ;

3 - Après incubation à 37°C pendant 24 heures, rajouter les additifs nécessaires, puis se référer à la grille de lecture pour interpréter les résultats obtenus (figure. 9).

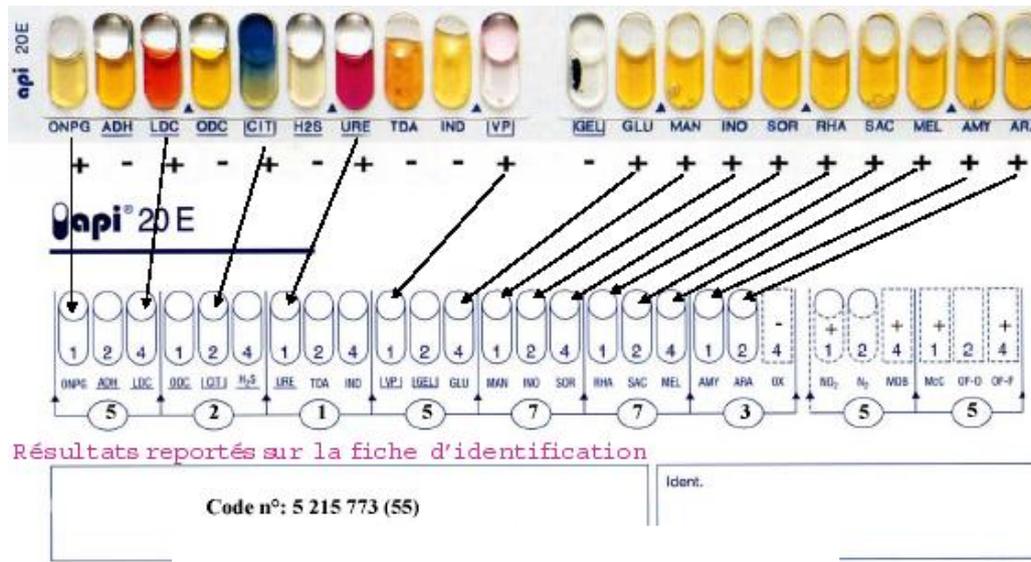


Figure 9 : Lecture et interprétation de la galerie API 20 E

1.3.1.5 Recherche de la présence des gènes codant pour les facteurs de virulence des *STEC O157:H7* par amplification génique (PCR)

Une partie des souches isolées a été confirmée au niveau du laboratoire national de référence en microbiologie des denrées alimentaires de l'Université de Liège pour les gènes *stx*₁, *stx*₂, *eae* et *ehxA*. L'autre partie des souches isolées a été confirmée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour deux gènes *eae* et *stx*₂ en présence de deux souches témoins (une positive et une négative).

→ Extraction de l'ADN

- **Mode opératoire**

- 1 - Prendre une colonie purifiée de chaque souche d'*E. coli* à tester et la faire pousser dans du BHIB (bouillon cœur-cerveau) sous agitation à 37°C pendant toute une nuit.
- 2 - Répartir 300 µl du bouillon dans des eppendorfs, puis réaliser une centrifugation à 4 500 tours/minute.

- 3 - Récupérer le culot, ajouter 50 µl d'eau distillée stérile, puis chauffer à 100°C pendant 10 minutes.
- 4 - Centrifuger une seconde fois dans une mini-centrifugeuse pendant 30 secondes, puis récupérer le surnageant contenant l'ADN et le transférer dans des tubes pour PCR.

→ 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 suivant :

Tableau 6 : Paires d'amorces utilisées dans cette étude

Gène	Amorce et séquence (China et al., 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>stx₂</i>	B56, TGGGTTTTTCTTCGGTATC B57, GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	53,4

eae : gène codant l'intimine

stx₂ : gène codant la Shiga-toxine de type 2

pb : paire de base.

→ Préparation du mix 1 pour la détection du gène *eae*

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

Ajouter :

- 2 µl de MgCl₂ (25 mM) ;
- 2,5 µl de dNTP (2 mM) ;
- 5 µl 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 polymerase (Go taq Flexi DNA polymerase) (5U/ µl) ;

- 30 µl d'eau distillée stérile.

→ Préparation du mix 2 pour la détection du gène *stx₂*

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

Ajouter :

- 2 µl de MgCl₂ (25 mM) ;
- 2,5 de dNTP (2 mM) ;
- 5 µl 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 polymerase (Go taq Flexi DNA polymerase) (5U/ µl) ;
- 30 µl d'eau distillée stérile.

→ Conditions d'amplification des gènes *eae* et *stx₂* par PCR

Placer les tubes pour PCR dans le thermocycleur réglé pour les temps suivants :

Dénaturation à 94°C pendant 5 minutes;	} 30 cycles
Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes ;	
Hybridation à 50°C pendant 30 secondes ;	
Elongation à 72°C pendant 30 secondes.	

→ Détection des produits d'amplification

La détection du produit d'amplification se fait par migration en électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (figure 9).

• Mode opératoire

- 1 - Dissoudre 2 g d'agarose dans 100 ml de TAE à pH 8,8 puis chauffer au micro-ondes.
Après refroidissement ajouter 7 µl de BET (10 mg/ml) ;
- 2 - Obturer les deux extrémités du moule avec du ruban adhésif ;

- 3 - Disposer dans les encoches prévues à cet effet le peigne nécessaire à la réalisation des puits dans le gel ;
- 4 - Verser lentement le gel préparé dans le moule ;
- 5 - Enlever délicatement le peigne après solidification du gel ;
- 6 - Démouler le gel et le placer dans la cuve, la remplir de tampon TAE jusqu'au niveau supérieur du gel ;
- 7 - Placer les puits du côté de la cathode ;
- 8 - Déposer 5 μ l des produits d'amplification respectivement, les souches à tester plus les souches témoins dans chaque puits. L'un des puits est réservé au marqueur de taille moléculaire 100 Pb ;
- 9 - Les fragments d'ADN, placés dans un champ électrique et chargés négativement, vont se déplacer vers l'anode dès la mise en marche de l'appareil ;
- 10 - La séparation se fait sur la base des poids moléculaires des fragments, chaque bande correspondra à un fragment de taille précise ;
- 11 - Visualisation des bandes par transillumination ultra-violette (302 nm) ;
- 12 - Photographie, comparaison des profils obtenus par rapport aux souches témoins. Une souche ayant le même profil que celui de la souche témoin est considérée comme porteuse du gène recherché.

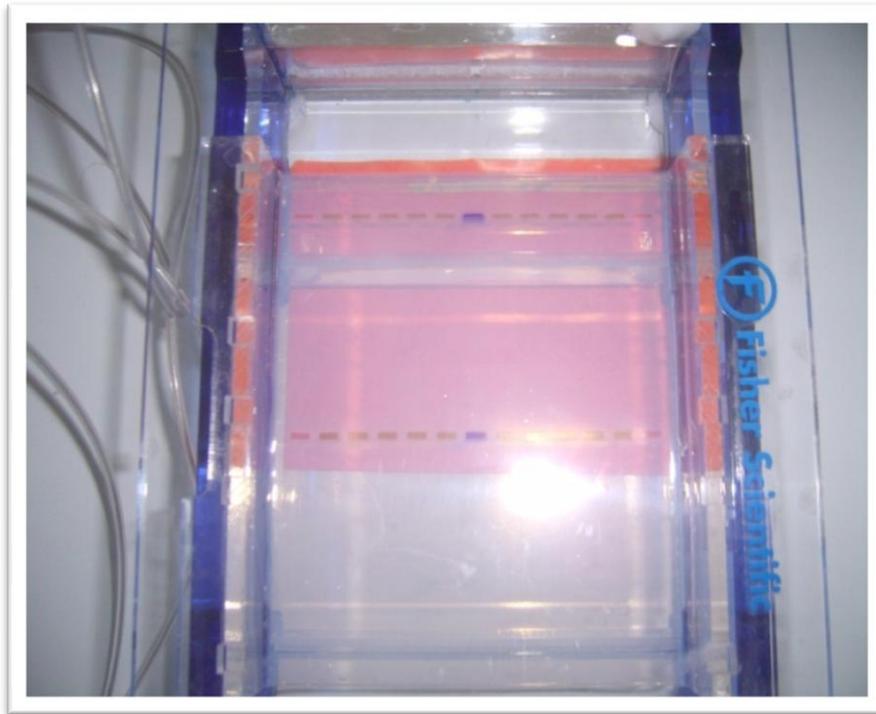


Photo personnelle 9: Migration des bandes d'ADN sur l'électrophorèse sur gel

1.3.1.6 Test de sensibilité aux antibiotiques

Nous avons testé la sensibilité des souches d'*E. coli* O157:H7 isolées à 31 antibiotiques appartenant aux différentes classes (voir la liste en annexe), selon les normes NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) recommandées par l'OMS.

- **Mode opératoire**

- 1 - A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette Pasteur stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ;
- 2 - Décharger la pipette dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% ;
- 3 - Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ;
- 4 - Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ;
- 5 - Presser l'écouvillon contre la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum ;
- 6 - Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, en tournant la boîte (12 cm) à chaque fois ;

- 7 - Placer les disques d'antibiotiques sur la gélose ensemencée à l'aide d'un applicateur spécifique ;
- 8 - Incuber les boîtes à 35°C pendant 18 heures couvercle en bas ;
- 9 - Le contrôle de qualité est réalisé par la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à l'ensemble des antibiotiques testés) pour valider les résultats.

- **Lecture des boîtes**

La lecture des boîtes est 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.

→ Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI est faite pour toutes les souches ayant présenté une antibiorésistance. Le E test[®] permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester.

- **Mode opératoire**

- 1 - A l'aide d'une pipette Pasteur, racler les colonies résistantes et les dissoudre dans 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une opacité équivalente à 0,5 Mc Farland ;
- 2 - Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ;
- 3 - Presser l'écouvillon contre la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum ;
- 4 - Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, en tournant la boîte (9 cm) 3 fois de 60°;
- 5 - A l'aide d'une pince stérile, déposer la bandelette de E test[®] sur la surface de la gélose ;
- 6 - Incuber les boîtes à 35°C pendant 18 heures.
- 7 - Le contrôle de qualité est réalisé par la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 pour valider les résultats.

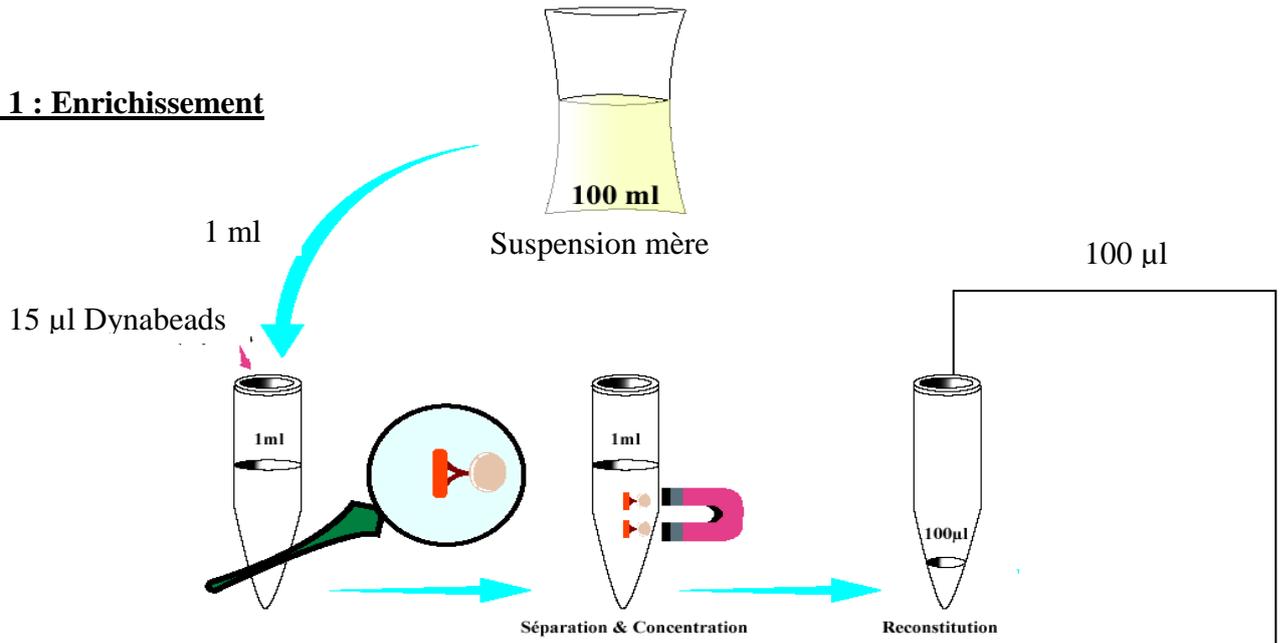
- **Lecture des boîtes**

L'inhibition de la croissance des bactéries se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. L'échelle de lecture imprimée sur la bandelette permet une interprétation rapide. Il faut lire la valeur de la CMI correspondant à

l'intersection de deux ellipses, puis la comparer aux valeurs critiques des CMI pour *entérobactéries*.

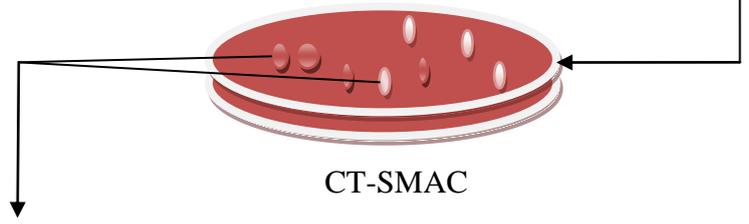
Les différentes étapes de recherche d'*E. coli* O157:H7 sont schématisées dans la figure suivante.

Etape 1 : Enrichissement



Séparation et concentration des bactéries par la technique de séparation immuno-magnétique (IMS)

Etape 2 : Etalement



Agglutination des colonies suspectes avec le latex anti-O157 et l'antisérum H7

E. coli O157 : H7 présumptif

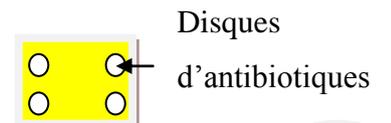
Etape 3 : Confirmation

Caractérisation biochimique (galerie API 20E)

Recherche des gènes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* par PCR

Etape 4 : Tests de sensibilité aux antibiotiques

Antibiogramme



Détermination de la CMI (E test[®])

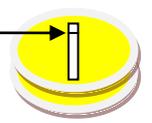


Figure 10: Protocole de recherche d'*E. coli* O157 :H7

1.3.2 Dénombrement des coliformes thermotolérants et d'*E. coli* à 44°C

La majorité des coliformes thermotolérants, et spécifiquement *E. coli*, sont des indicateurs d'une contamination d'origine fécale.

Leur dénombrement permet d'évaluer le niveau d'hygiène des abattoirs et autres unités de production des denrées alimentaires, ainsi que la qualité des eaux. Dans cette étude, nous avons choisi l'abattoir d'El Harrach, plus important en nombre d'abattages, afin d'estimer la contamination fécale des carcasses. Pour cela 50 échantillons ont été testés.

20 échantillons ont servi aux dénombrements des coliformes thermotolérants à 44°C, représentés de 80 à 90% par des *E. coli*. Les dénombrements ont été faits par la méthode de numération en milieu liquide qui est la méthode du NPP (nombre le plus probable).

30 échantillons ont été analysés pour le dénombrement des *E. coli* β -glucuronidase positives à 44°C par la méthode de numération en milieu solide.

1.3.2.1 Dénombrement des coliformes thermotolérants à 44°C par la méthode NPP

Ce dénombrement est réalisé par la méthode du NPP en utilisant le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) (figure 22). C'est un milieu liquide surmonté d'une cloche de Durham qui sert à évaluer la production de gaz par les bactéries.

- **Mode opératoire**

- 1 - Devant le bec Bunsen, verser 100 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) dans chaque sac stomacher contenant les écouvillons ;
- 2 - L'échantillon est homogénéisé au moyen du stomacher péristaltique à 250 cycles pendant deux minutes ;
- 3 - Procéder à la préparation des différentes dilutions décimales, à savoir la 10^{-1} , la 10^{-2} et la 10^{-3} .

Pour obtenir la dilution 10^{-1} , on prélève stérilement 1 ml de la suspension mère homogénéisée et on la transfère dans 9 ml de TSE stérile.

La dilution 10^{-2} est obtenue en transférant 1 ml de la dilution 10^{-1} dans 9 ml de TSE stérile. En transférant 1 ml de la dilution 10^{-2} dans 9 ml de TSE stérile on obtient la dilution 10^{-3} .

- 4 - Pour chaque échantillon à analyser, préparer 9 tubes du bouillon lactosé bilié au vert brillant, etensemencer les 3 premiers avec la dilution 10^{-1} , les 3 suivants avec la dilution 10^{-2} et les 3 derniers avec la dilution 10^{-3} ;
- 5 - Incuber les tubes de BLBVB ensemencés pendant 24 heures à 44°C ;
- 6 - Pour chaque tube, le résultat est considéré comme positif s'il y'a changement de la couleur du vert brillant au vert pâle, voire au jaune, et si le 1/10 de la cloche est rempli de gaz, ce qui indique la fermentation du lactose ;
- 7 - La lecture va donner un nombre composé de trois chiffres ;
- 8 - Se référer à la table de Mac Crady dans laquelle chaque nombre obtenu correspond au nombre de germes présents par ml.

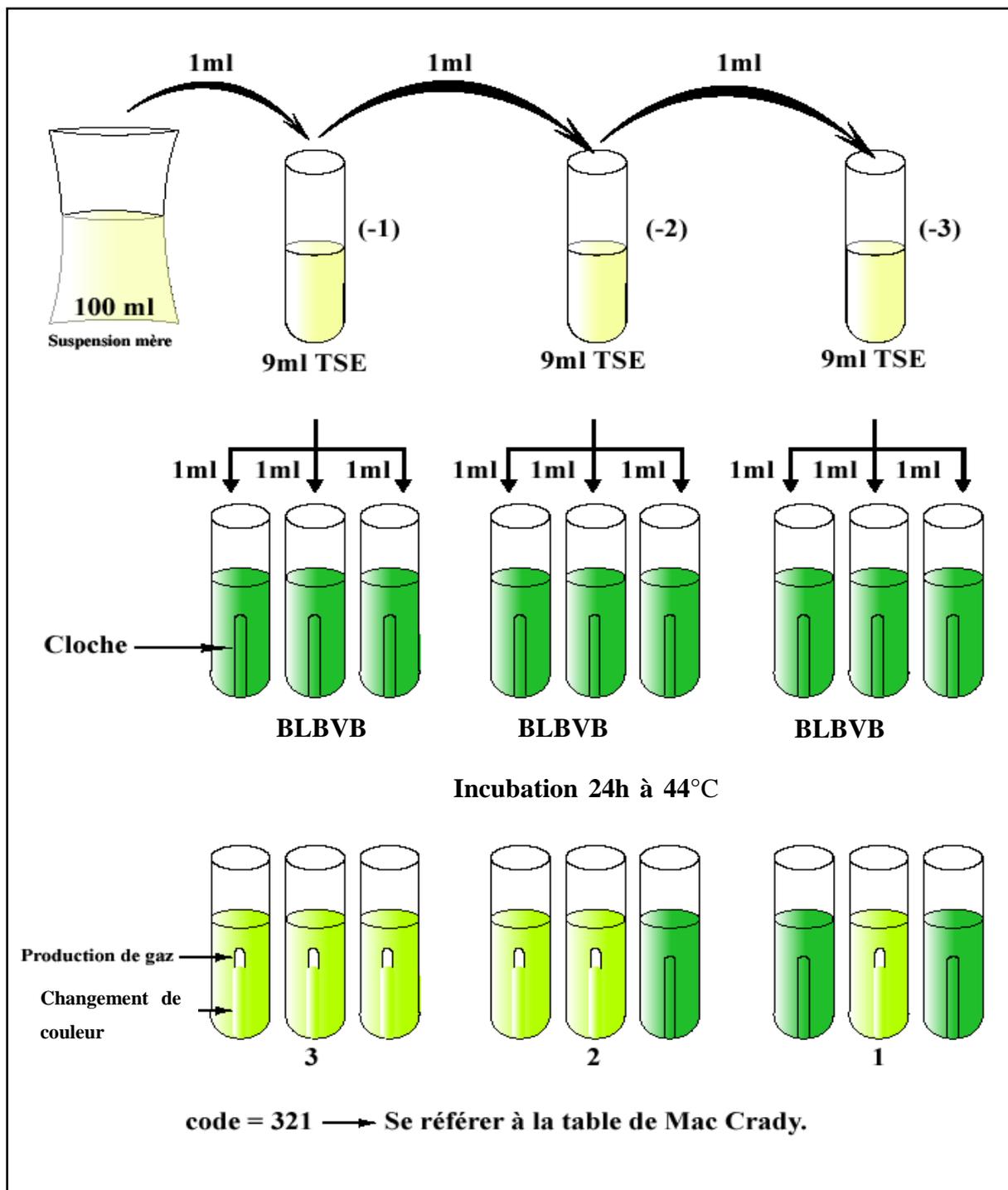


Figure 11: Méthode NPP

1.3.2.2 Dénombrement des *E. coli* β -glucuronidase positives à 44°C

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 d'*E. coli* celle β -D-glucuronidasique (GLUC), par la présence d'un substrat chromogénique spécifique à l'enzyme.

- **Mode opératoire**

- 1 - A partir de la suspension mère homogénéisée, préparer deux dilutions décimales, 10^{-1} et 10^{-2} ;
- 2 - Procéder à un ensemencement en profondeur par le transfert de 1 ml de la dilution 10^{-1} dans une boîte de pétri qu'on recouvre de 15 ml de gélose Rapid *E. coli* 2. Laisser se solidifier et recouvrir une seconde fois d'une mince couche du même milieu. La même opération est répétée pour la dilution 10^{-2} ;
- 3 - Incuber les boîtes ensemencées pendant 24 heures à 44°C ;
- 4 - A la lecture des boîtes, on va observer des colonies violettes et des colonies bleues. Seules les colonies violettes correspondent à *E. coli* et sont retenues pour le dénombrement.

L'estimation du nombre des bactéries en ufc/ml se fait selon la règle suivante :

$$N = \frac{\sum C_n}{(n_1 \times v_1)d_1 + (n_2 \times v_2)d_2 + \dots + (n_n \times v_n)d_n}$$

C_n = nombre de colonies comptées sur les boîtes retenues.

n_n = nombre de boîtes retenues de la nième dilution.

v_n = volume de l'inoculum de la nième dilution.

d_n = valeur de la nième dilution.

2 Résultats

La présence et la résistance des souches d'*E. coli* O157:H7 à certains antibiotiques, ainsi qu'un taux élevé de contamination des carcasses ovines par les germes d'origine fécale, ont été montrés lors de cette étude.

2.1 Résultat de la recherche des *E. coli* O157:H7

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 des souches isolées sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Nombre de carcasses contaminées et de souches d'*E. coli* O157:H7 isolées

Abattoir	Rouiba	El Harrach	Total
Nombre de carcasses contaminées par <i>E. coli</i> O157:H7	2	9	11
Nombre de souches d' <i>E. coli</i> O157:H7 isolées	4	9	13

Les épreuves de séparation immuno-magnétique et les tests d'agglutination au latex anti-O157 et 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 7,26%.

A partir de ces onze carcasses positives, treize souches d'*E. coli* O157:H7 ont été isolées.

Quatre souches ont été isolées à partir de deux carcasses au niveau de l'abattoir de Rouiba, et neuf souches à partir de neuf carcasses issues de l'abattoir d'El Harrach.

L'identification biochimique et sérologique des souches isolées est rapportée dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Identification biochimique et sérologique des souches d'*E. coli* O157:H7 isolées à partir des carcasses ovines au niveau de deux abattoirs d'Alger

Numéro des échantillons positifs	Bactériologie				Sérologie		Identification biochimique	
	Milieu	Souche	Sorbitol	β -glucuronidase	Latex anti-O157	Antisérum H7	Code	Identification
1	CT -SMAC	1	négatif	négatif	positif	positif	5144172	<i>E. coli</i> biotype1
		2	négatif	négatif	positif	positif	5144152	<i>E. coli</i> biotype1
2	CT -SMAC	3	négatif	négatif	positif	positif	6344172	<i>E. coli</i> biotype1
		4	négatif	négatif	positif	positif	6344172	<i>E. coli</i> biotype1
3	CT -SMAC	5	négatif	négatif	positif	positif	5144152	<i>E. coli</i> biotype1
4	CT -SMAC	6	négatif	négatif	positif	positif	5144152	<i>E. coli</i> biotype1
5	CT -SMAC	7	négatif	négatif	positif	positif	7044552	<i>E. coli</i> biotype1
6	CT -SMAC	8	négatif	négatif	positif	positif	7144572	<i>E. coli</i> biotype1
7	CT -SMAC	9	négatif	négatif	positif	positif	5144502	<i>E. coli</i> biotype1
8	CT -SMAC	10	négatif	négatif	positif	positif	5144142	<i>E. coli</i> biotype3
9	CT -SMAC	11	positif	positif	positif	positif	7144572	<i>E. coli</i> biotype1
10	CT -SMAC	12	positif	positif	positif	positif	5144572	<i>E. coli</i> biotype1
11	CT -SMAC	13	positif	positif	positif	positif	5144572	<i>E. coli</i> biotype1

Des treize souches d'*E. coli* O157:H7 isolées, dix souches (souches 1 à 10) sont sorbitol et β -glucuronidase négatives tandis que trois souches (souches 11 à 13) sont sorbitol et β -glucuronidase positives.

2.1.1 Aspect des colonies sur gélose d'isolement

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

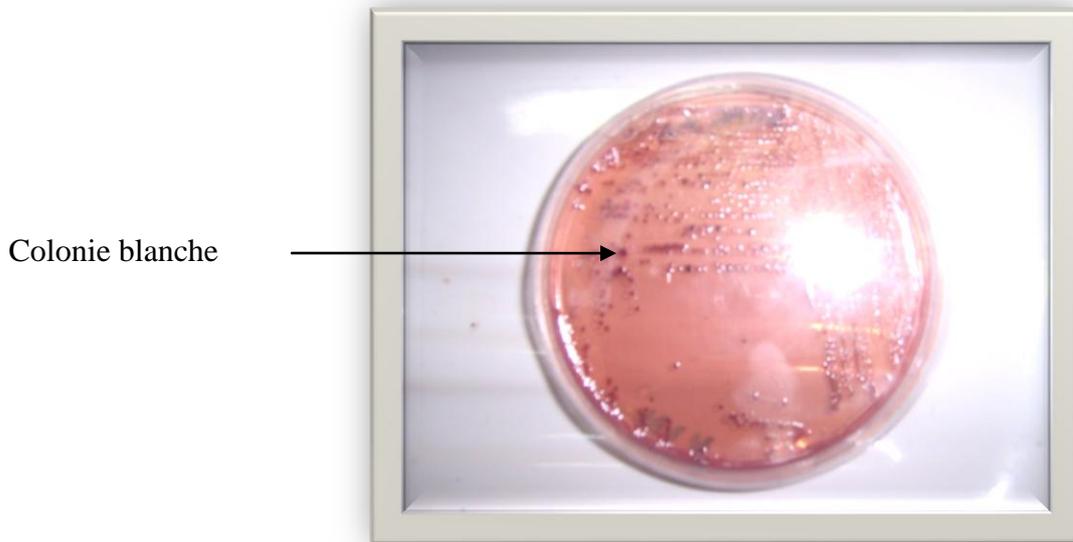


Photo personnelle 10: Colonies d'*E. coli* O157 sorbitol négatives sur le milieu CT-SMAC

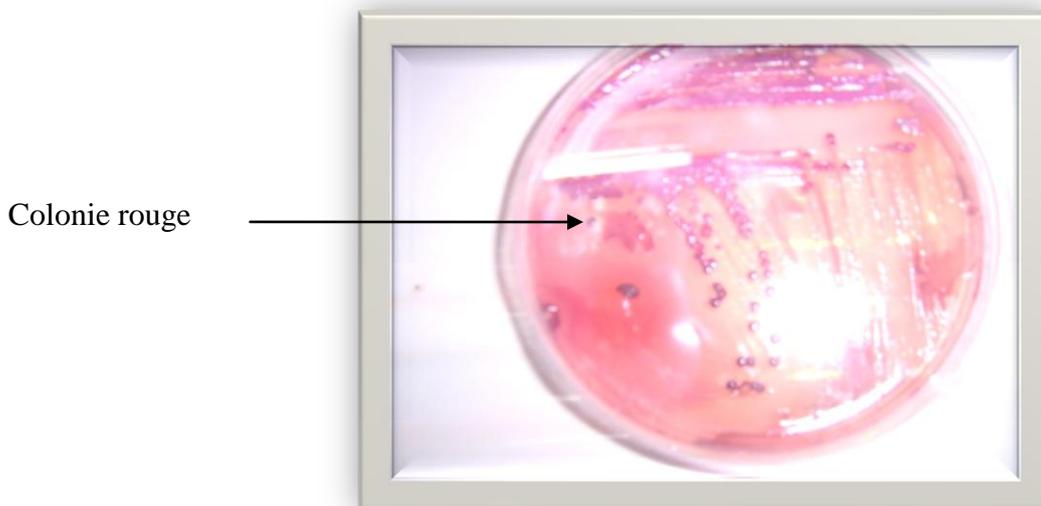


Photo personnelle 11: Colonies d'*E. coli* O157 sorbitol positives sur le milieu CT-SMAC

2.1.2 Aspect des tests d'agglutination

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



Photo personnelle 12: Colonie agglutinant le latex anti-O157

A gauche : réaction d'agglutination négative.

A droite : réaction d'agglutination positive.

La photo suivante montre les agglutinats formés sur la lame en présence de l'antisérum H7 témoignant la présence de l'antigène flagellaire H7.

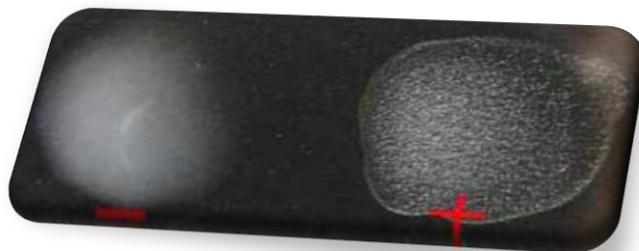


Photo personnelle 13: Colonie agglutinant l'antisérum H7

2.1.3 Recherche de la virulence des souches d'*E. coli* O157:H7 par PCR

Les caractères génotypiques des souches d'*E. coli* O157:H7 isolées sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Caractère génotypique des souches d'*E. coli* O157:H7

N° carcasse ovine	Souche	Pathotype	Laboratoire de confirmation
1	1	<i>eae stx₂ ehxA</i>	Faculté de Liège
	2	<i>eae stx₁ ehxA</i>	Faculté de Liège
2	3	<i>eae stx₂ ehxA</i>	Faculté de Liège
	4	<i>eae ehxA</i>	Faculté de Liège
3	5	<i>eae stx₂ ehxA</i>	Faculté de Liège
4	6	<i>eae stx₂ ehxA</i>	Faculté de Liège
5	7	<i>eae stx₂*</i>	Institut Pasteur d'Algérie
6	8	<i>stx₂*</i>	Institut Pasteur d'Algérie
7	9	<i>eae stx₂*</i>	Institut Pasteur d'Algérie
8	10	<i>eae stx₂*</i>	Institut Pasteur d'Algérie
9	11	<i>stx₂*</i>	Institut Pasteur d'Algérie
10	12	<i>stx₂*</i>	Institut Pasteur d'Algérie
11	13	—*	Institut Pasteur d'Algérie

*gènes *stx₁* et *ehxA* non recherchés.

Treize souches ont été isolées à partir des onze carcasses ovines contaminées par *E. coli* O157:H7.

Six souches ont été confirmées au niveau de la Faculté de Liège pour les gènes *eae*, *stx₁*, *stx₂* et *ehxA* codant respectivement les facteurs de virulence intimine, Shiga-toxine de type 1, Shiga-toxine de type 2 et entérohémolysine.

Parmi ces souches de STEC O157 confirmées, deux ont été isolées à partir d'une même carcasse et présentaient un profil pathotypique différent, *eae stx₂ ehxA* pour la première (souche 1) et *eae stx₁ ehxA* pour la deuxième (souche 2). Les deux autres souches 3 et 4 provenaient elles aussi d'une même autre carcasse et présentaient un profil pathotypique différent : *eae stx₂ ehxA* pour la première et *eae ehxA* pour la seconde. Quant aux deux souches restantes 5 et 6, elles ont été isolées à partir de deux carcasses différentes avec le même pathotype *eae stx₂ ehxA* ;

Sept souches ont été confirmées au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie pour les gènes *eae* et *stx₂*.

Les souches 7, 9 et 10 possédaient le gène *eae* et *stx₂*, les souches 8, 11 et 12 uniquement le gène *stx₂*. La souche 13 quant à elle ne possédait aucun gène codant pour les facteurs de virulence.

La photo suivante montre les différentes bandes d'ADN correspondant chacune à la taille du gène recherché.

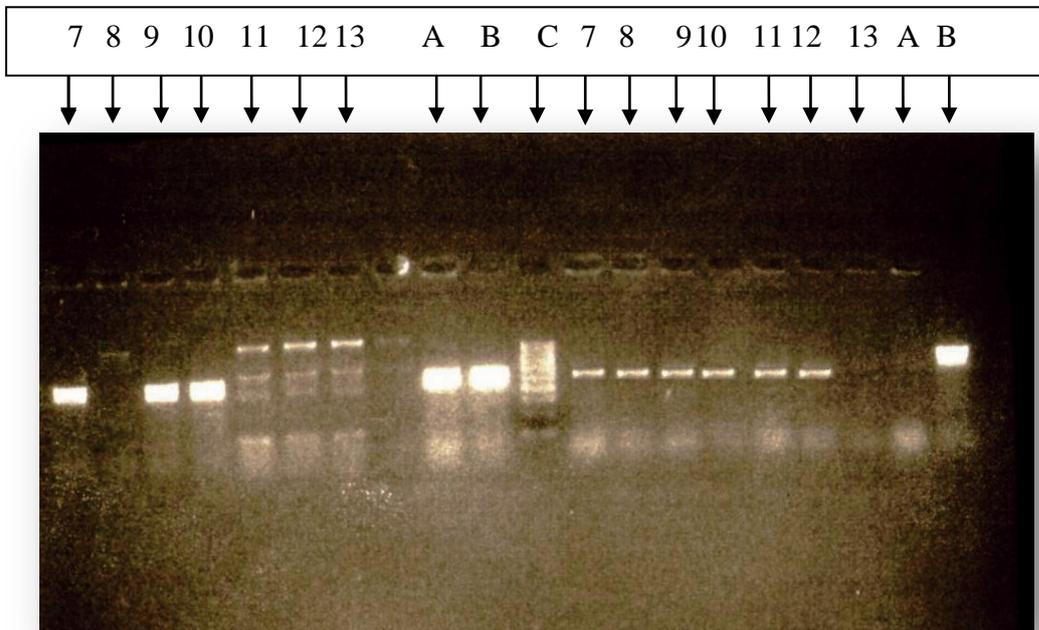


Photo personnelle 14 : Visualisation des gènes *eae* et *stx₂* des souches d'*E. coli* O157:H7 après PCR par transillumination

Les numéros (7 à 13) correspondent aux numéros des souches confirmées au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Puits A à gauche : souche témoin positive portant le gène *eae* ($eae^+ stx_2^- ehxA^+$)

Puits B à gauche : souche témoin positive portant le gène *eae* ($eae^+ stx_2^+ ehxA^+$)

Puits C : marqueur de taille (100 pb)

Puits A à droite : souche témoin négative ne portant pas le gène *stx₂* ($eae^+ stx_2^- ehxA^+$)

Puits B à droite : souche témoin positive portant le gène *stx₂* ($eae^+ stx_2^+ ehxA^+$)

2.1.4 Test de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme montrent que :

- ⇒ La souche 2 est résistante aux tétracyclines (CMI=6 µg/l)
- ⇒ La souche 4 est résistante à la tétracycline (CMI=6 µg/l)
- ⇒ La souche 7 est résistante aux furanes (CMI=64 µg/l)
- ⇒ La souche 8 est résistante à la tétracycline (CMI=8 µg/l)
- ⇒ La souche 9 est résistante aux furanes (CMI=64 µg/l) et à la tétracycline (CMI=6 µg/l)

Sur la photo 15 on peut observer les zones d'inhibitions de la croissance bactérienne due à la diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Mueller Hinton.

Sur la photo 16 on peut de même observer la formation de deux ellipses autour de la bandelette du E test[®], dont l'intersection détermine la valeur de la CMI.



Photo personnelle 15 : Antibiogramme



Photo personnelle 16 : Evaluation de la CMI par le E test[®]

2.1.5 Origine et lieux d'abattage des ovins contaminés par *E. coli* O157:H7

L'origine des carcasses ovines contaminées par *E. coli* O157:H7 est rapportée dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Origine des carcasses ovines contaminées par *E. coli* O157:H7

Numéro d'échantillon	Origine	Mois	Abattoir
1	Djelfa	Février 2006	Rouiba
2	Méchnria	Février 2006	Rouiba
3	Saïda	Mai 2006	El Harrach
4	Bouira	Mai 2006	El Harrach
5	Marché de bétail	Février 2007	El Harrach
6	Marché de bétail	Février 2007	El Harrach
7	Marché de bétail	Février 2007	El Harrach
8	Marché de bétail	Mars 2007	El Harrach
9	Marché de bétail	Mars 2007	El Harrach
10	Marché de bétail	Mars 2007	El Harrach
11	Marché de bétail	Mars 2007	El Harrach

Parmi les onze carcasses ovines contaminées par *E. coli* O157:H7, deux ont été écouvillonnées au niveau de l'abattoir de Rouiba et neuf l'ont été au niveau de l'abattoir d'El Harrach. Quatre carcasses provenaient d'ovins de chacune des villes de Djelfa, Méchnria, Saïda et Bouira, et sept carcasses ont été issues d'ovins vendus au marché de bétail d'Alger.

La caractérisation des souches d'*E. coli* O157 : H7 ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques sont rapportées dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Caractérisation et sensibilité aux antibiotiques des souches d'*E. coli* O157:H7 isolées

Souche	Sérotype	Sorbitol et β -glucuronidase	Pathotype	Antibiorésistance	Origine des ovins	Mois	Abattoir
1	O157:H7	–	<i>eae stx₂ ehxA</i>	S	Djelfa	Février	Rouiba
2	O157:H7	–	<i>eae stx₁ ehxA</i>	R tétracycline			
3	O157:H7	–	<i>eae stx₂ ehxA</i>	S	Méchria	Février	Rouïba
4	O157:H7	–	<i>eae ehxA</i>	R tétracycline			
5	O157:H7	–	<i>eae stx₂ ehxA</i>	S	Saïda	Mai	El Harrach
6	O157:H7	–	<i>eae stx₂ ehxA</i>	S	Bouira	Mai	El Harrach
7	O157:H7	–	<i>eae stx₂</i>	R furane	Marché de bétail	Février	El Harrach
8	O157:H7	–	<i>stx₂</i>	R tétracycline	Marché de bétail	Février	El Harrach
9	O157:H7	–	<i>eae stx₂</i>	R tétracycline R furane	Marché de bétail	Février	El Harrach
10	O157:H7	–	<i>eae stx₂</i>	S	Marché de bétail	Mars	El Harrach
11	O157:H7	+	<i>stx₂</i>	S	Marché de bétail	Mars	El Harrach
12	O157:H7	+	<i>stx₂</i>	S	Marché de bétail	Mars	El Harrach
13	O157:H7	+	–	S	Marché de bétail	Mars	El Harrach

R : résistante

S : sensible

2.2 Résultats des Dénombrements des coliformes thermotolérants et d'*E. coli* à 44°C

Cette photo montre l'aspect des colonies β -glucuronidase positives sur gélose Rapid *E. coli* 2.

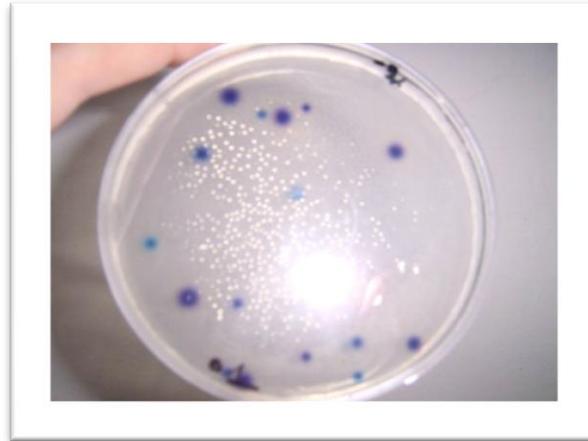


Photo personnelle 17: Colonies d'*E. coli* sur milieu REC2

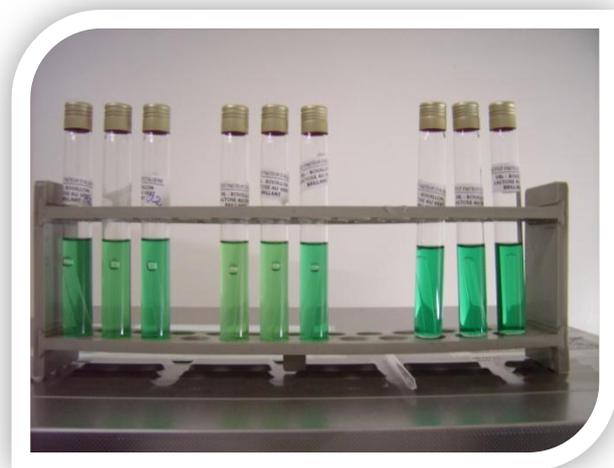
Colonies violettes : *E. coli* β -glucuronidase positives.

Colonies bleus : Coliformes

Les photos suivantes montrent l'aspect du développement des coliformes thermotolérants à 44°C sur milieu BLBVB.



Réaction négative



Réaction positive

Photo personnelle 18 : Développement des coliformes thermotolérants à 44°C par la méthode NPP

Tableau 12 : Dénombrements des coliformes thermotolérants à 44°C

N° échantillon	Semaine	Coliformes thermotolérants ufc/cm²
1	1	2 375
2	1	6 250
3	1	27 500
4	1	2 375
5	1	6 250
6	2	2 375
7	2	100
8	2	35 000
9	2	2 375
10	2	225
11	3	6 250
12	3	625
13	3	1 875
14	3	6 250
15	3	100
16	4	375
17	4	625
18	4	750
19	4	500
20	4	35 000

Tableau 13 : Dénombrement des *E. coli* β -glucuronidase positives sur gélose REC2 à 44°C

N° échantillon	Semaine	<i>E. coli</i> ufc/cm ²
21	5	22,7
22	5	9,1
23	5	90,9
24	5	6,8
25	5	<10
26	6	138,9
27	6	77,3
28	6	77,3
29	6	6,8
30	6	2,3
31	7	325
32	7	40
33	7	11,4
34	7	61,4
35	7	2,3
36	8	<10
37	8	22,5
38	8	77,3
39	8	4,55
40	8	9,2
41	9	20,45
42	9	<10
43	9	<10
44	9	2,3
45	9	<10
46	10	<10
47	10	43,2
48	10	4,5
49	10	<10
50	10	11,4

Les résultats du dénombrement des coliformes thermotolérants et d'*E. coli* à 44°C ont permis de tracer une carte de contrôle sur laquelle on peut observer la distribution des différentes valeurs obtenues.

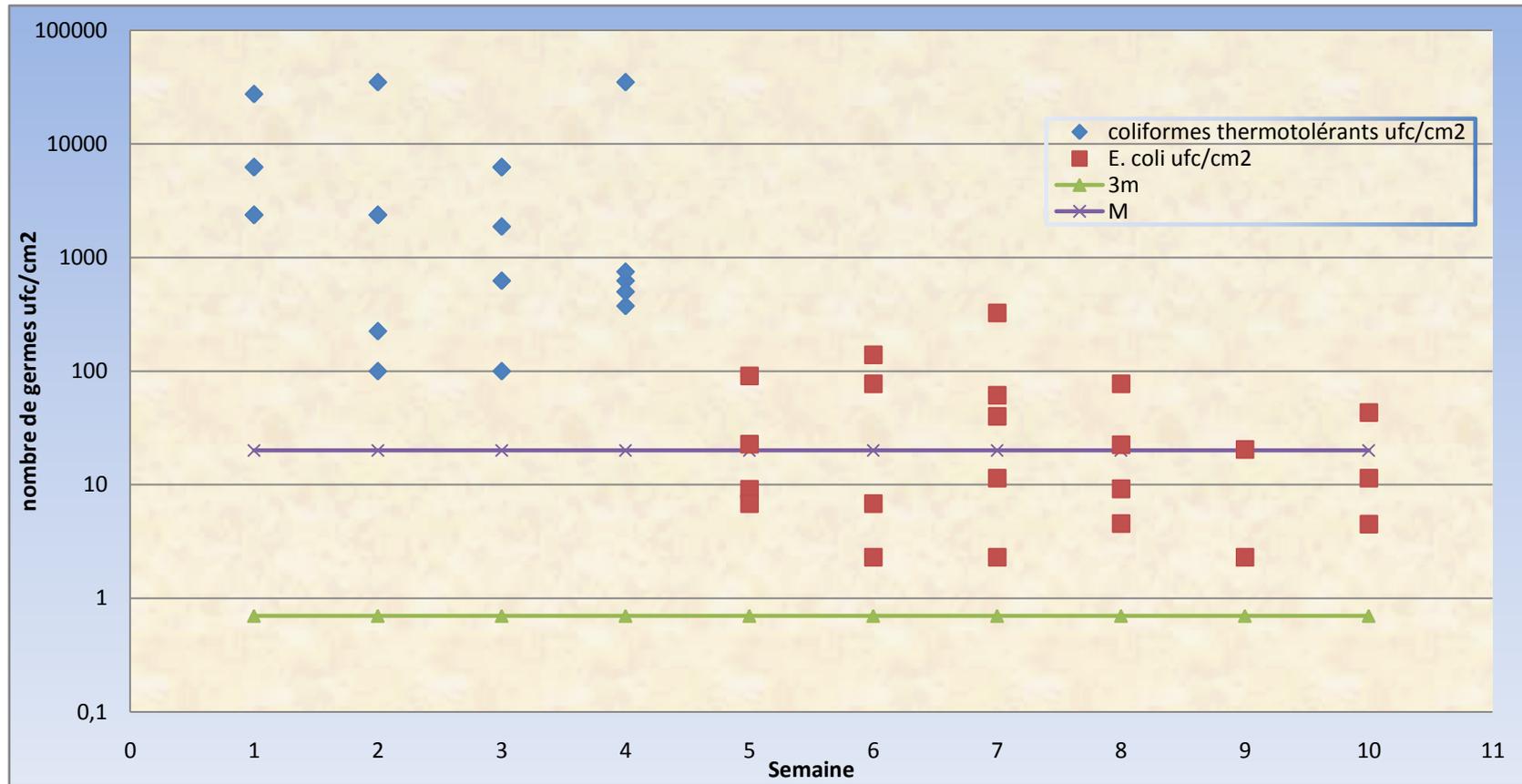


Figure 12 : Résultats du dénombrement des coliformes thermotolérants et d'*E. coli* à 44°C

Pour pouvoir interpréter ces résultats, deux limites ont été définies :

M= seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats sont considérés comme inacceptables. $M= 20 \text{ ufc/cm}^2$.

3m= limite marginale, c'est-à-dire seuil en dessous duquel tous les résultats sont considérés comme acceptables. $3m= 7.10^{-1} \text{ ufc/cm}^2$.

Les critères d'interprétation se basent sur :

- Les deux limites 3 m et M ;
- n, nombre d'unités composant l'échantillon sur la base duquel l'interprétation a lieu, $n=15$.
- c, nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre 3m et M, $c=3$.

Ces limites sont décrites dans l'Arrêté Royal Belge du 28 Août 2002, relatif aux conditions générales et spéciales d'exploitation des abattoirs et d'autres établissements, et que nous avons pris comme référence.

Les résultats obtenus doivent être qualifiés soit d'acceptables, de marginaux ou bien d'inacceptables.

La catégorie acceptable se situe au niveau de la zone du graphe inférieure à la limite 3 m, la catégorie marginale comprend les valeurs du dénombrement situées entre la limite 3m et la limite M, et enfin la catégorie inacceptable est représentée par toutes les valeurs se trouvant au dessus de la limite M.

Pour l'interprétation, on se base sur les 15 derniers résultats ($n=15$) desquels on exclut tous les résultats supérieurs à la limite M, et où on n'accepte au maximum que 3 résultats compris entre les limites 3m et M ($c = 3$).

En étudiant la distribution des résultats du dénombrement sur la courbe, on constate qu'il y a 4 valeurs au dessus de la limite M et 5 valeurs comprises entre les limites 3m et M. Les résultats des dénombrements dépassent donc les critères définis dans l'Arrêté Royal Belge du 28 Août 2002 et indiquent ainsi de mauvaises pratiques d'abattage dans cet abattoir.

2.3 Analyse statistique

Le test appliqué dans la présente étude en vue de l'analyse statistique est le « test Chi 2 ». Ce test consiste à mesurer l'écart entre une situation observée et une situation théorique et d'en déduire l'existence et l'intensité d'une liaison mathématique.

Ce test a été choisi pour vérifier s'il existe une liaison entre deux variables qualitatives, comme par exemple la relation entre le nombre de bactéries isolées et la période de recherche.

2.3.1 Nombre des échantillons positifs au niveau des deux abattoirs

Parmi les onze carcasses ovines contaminées par *E. coli* O157:H7, neuf ont été écouvillonnées au niveau de l'abattoir d'El Harrach et deux l'ont été au niveau de celui de Rouiba.

L'analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus montre qu'il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre le nombre de carcasses contaminées au niveau de ces deux abattoirs.

Ces résultats indiquent que les ovins abattus au niveau des deux abattoirs sont porteurs d'*E. coli* O157:H7. Ceci est dû au fait que les bonnes pratiques d'hygiène d'abattage ne sont pas respectées dans aucun des deux abattoirs. Il y a contamination fécale des carcasses et par conséquent présence de ce pathogène sur leurs surfaces.

2.3.2 Relation entre l'origine des ovins abattus et les souches d'*E. coli* O157 isolées

E. coli O157:H7 a été isolé d'une carcasse issue d'un ovin de la région de Saïda (ouest du pays), d'une carcasse issue d'un ovin de la région de Méchria (sud-ouest du pays), d'une carcasse issue de la région de Djelfa (sud du pays), d'une carcasse issue d'un ovin de la région de Bouira (centre du pays), et de quatre carcasses issues d'ovins provenant du marché de bétail, où les animaux vendus proviennent de différentes régions (centre, est, ouest et sud du pays), ceci pour pouvoir couvrir la demande du marché de la viande au niveau de la capitale et de la région centre où la grande majorité de la population est concentrée.

L'analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus, montre qu'il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre les souches isolées et l'origine des animaux ; cela laisse supposer que le cheptel ovin algérien peut être porteur de STEC.

2.3.3 Relation entre les souches d'*E. coli* O157 isolées et la période de recherche

18,2% des souches d'*E. coli* O157 ont été isolés en février 2006, 18,2% en mai 2006, 27,3% en février 2007 et 36,3% en mars 2007.

L'analyse statistique effectuée montre qu'il n'y'a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre les souches d'*E. coli* O157 isolées et la période de recherche. Cela est du aux mauvaises conditions d'abattage qui sont restés les mêmes durant toute la période de recherche, permettant ainsi la contamination des carcasses lorsque le pathogène est présent (animal porteur ou contamination croisée).

3 Discussion

Le sérotype le plus connu dans le groupe des STEC est le O157:H7. Une grande partie des connaissances de la pathogénie et de l'épidémiologie des STEC repose sur le travail effectué sur ce sérotype, pour lequel on dispose de méthodes simples de criblage et dont l'importance comme agent causal de diarrhées sanglantes et de SHU est bien documentée.

En Algérie, l'absence d'études concernant la présence de STEC O157 au niveau de la viande ovine a suscité notre intérêt pour la réalisation de cette recherche qui est la première dans le pays.

Dans ce contexte, nous avons choisi deux abattoirs d'Alger pour rechercher ce pathogène à la surface des carcasses ovines, d'essayer de confirmer sa virulence en détectant par amplification génique les gènes qui codent pour ces facteurs, et aussi de tester sa sensibilité aux antibiotiques.

Notre objectif à travers cette étude a été également d'évaluer les pratiques d'abattage au niveau de l'un de ces abattoirs, afin d'essayer d'inculquer au personnel de cette structure les bonnes pratiques d'hygiène pour diminuer les risques de contaminations.

3.1 Choix des lieux de prélèvements

Les abattoirs choisis sont l'abattoir de Rouiba et celui d'El Harrach. Dans ces deux abattoirs une moyenne respective de 27 000 et 48 000 ovins sont abattus chaque année. Ils approvisionnent une partie de la population du centre du pays en viande fraîche ovine (données des deux abattoirs, 2007).

3.2 Choix des zones d'écouvillonnage

Parce qu'elles sont considérées comme les plus représentatives de la contamination fécales des carcasses, les zones suivantes ont été écouvillonnées :

- La zone postéro-externe de la cuisse. Le choix de cette zone repose sur le risque de contamination de cette partie de la carcasse lors des opérations d'habillage (enlèvement de la peau) ;

- Le flanc, cette zone risquant d'être contaminée lors de l'habillage et l'éviscération de la carcasse.
- Le gros bout de la poitrine. La contamination de cette zone peut survenir lors de l'habillage, de la fente ou l'éviscération de la carcasse.
- La face postérieure des membres antérieurs ; l'habillage de la carcasse ainsi que les différentes manipulations peuvent être à l'origine de la contamination

3.3 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).

La méthode non destructive comprend la méthode du double écouvillonnage (humide/sec) réalisée à l'aide de cotons d'ouate 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 au tampon de gaze 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 d'ouate stériles qui a été utilisée de la manière décrite dans la norme ISO 17604.

Plusieurs chercheurs ont comparé les différentes méthodes de prélèvements, à savoir les méthodes non destructives et les méthodes destructives.

La récupération de bactéries (nombre total de germes) selon la méthode de l'excision et celle de l'écouvillonnage (successivement un écouvillon humide et sec) pour des carcasses de bovins et de porcs a été étudiée par Miraglia et al, (2005) qui ont toujours obtenus des nombres significativement plus élevés avec la méthode par excision. Toutefois, les auteurs signalent 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, car les deux méthodes présentent une grande variabilité.

Hutchison et al, (2005) ont essayé de quantifier la relation entre les résultats de l'excision et de la technique par écouvillonnage (ouate ; successivement écouvillon humide et sec) 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 des carcasses successives.

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 des sites d'échantillonnage identiques sur des carcasses successives.

La différence de dénombrement entre la méthode d'excision et 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.

Avec la technique par écouvillonnage, la récupération des bactéries est favorisée si le matériel utilisé est de nature plus abrasive. Avec les écouvillons d'ouate (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 dans notre présente étude.

Avec la méthode de l'écouvillonnage il y'a peu ou pas de dommages à la surface de la carcasse, mais les résultats sont médiocres et variables concernant les dénombrements car seules les bactéries adhérant moins bien à la surface sont récupérées. Dans notre étude cette méthode n'a pas posé problème, car nous avons obtenus des résultats de dénombrements élevés à cause de la forte contamination des carcasses dans les abattoirs concernés.

Par contre cette méthode convient pour la détection des bactéries présentes seulement en faible nombre et réparties de façon inégale sur la carcasse. C'est le cas pour notre étude portant sur la recherche d'*E. coli* O157:H7.

La méthode d'excision donne des 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. Seulement, 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. En plus de cela, l'excision détériore la carcasse entraînant une baisse de sa valeur commerciale, ce qui est inacceptable. Enfin, c'est une méthode exigeante en temps, qui requiert de l'habileté, et donc ne convient guère pour les tests de routine.

En conclusion les deux méthodes ont des avantages et des inconvénients. Toutes deux entrent en considération pour l'échantillonnage de carcasses dans le cadre du contrôle des critères d'hygiène des procédés (Règlement (CE) n° 2073/2005).

3.4 Méthodes d'analyses et milieux de détection

Compte tenu de la faible quantité d'*E. coli* O157:H7 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.

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 du mEC+ novobiocine (mEC + n) que dans du mTSB + acriflavine (mTSB+ a).

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 (6 heures) dans un milieu non sélectif EPT. 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'eau péptonée tamponnée (EPT) pendant une durée de 7 heures et, comme pour De Zutter et Uradzinski, des résultats satisfaisants ont été obtenus.

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 100 fois, pour une détection limite d'environ 2 organismes par gramme de bœuf.

Dans cette étude, nous avons obtenu de bons résultats en complétant l'étape d'enrichissement par cette technique de séparation-concentration qui est l'IMS.

Pour l'isolement des STEC O157, plusieurs milieux ont été utilisés. *E. coli* O157 ne fermente pas le sorbitol à l'opposé des autres *E. coli*. 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 MUG comme indicateur hydrolysé en un composé fluorescent par l'enzyme β -glucuronidase.

Dans notre 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, met en doute l'efficacité de la méthode de détection basée uniquement sur ces caractères.

Effectivement, pour la présente étude, nous avons testé par agglutination au latex anti-O157 des souches sorbitol négatives ainsi que quelques souches sorbitol positives isolées sur gélose CT-SMAC, ce qui nous a permis de détecter trois souches d'*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 la 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 sa présence obligatoire dans l'aliment.

En effet, 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 d'*Hafnia alvei*, de *Citrobacter freundii*. C'est pour cela 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 souches 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.

L'amplification génique (PCR) et l'hybridation ADN-ADN sur colonies sont deux méthodes hautement sensibles et spécifiques qui révèlent la présence des gènes codant pour les facteurs de virulence.

De très nombreux systèmes PCR ont été décrits pour détecter ou caractériser les STEC. Les cibles génétiques principales sont les gènes *stx*₁ et *stx*₂, le gène *eae* ainsi que le gène *ehxA*. Certains systèmes sont spécifiques des *Escherichia coli* O157:H7. Les gènes ciblés sont le gène *rfbE* codant pour l'antigène O157, le gène *fliCH7* codant pour l'antigène H7 ou le gène

uidA codant pour la β -glucuronidase et dont la séquence (mutation du gène à +93) est spécifique de ces souches (Yoshitoni, 2006).

Les gènes de virulence *stx* (*stx*₁, *stx*₂ et variants) 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*.

Bastian et al, (1998) ont pu identifier les sous types des Shiga-toxines après restriction des produits amplifiés, restriction par l'enzyme *HincII*.

Pour détecter tous les types de STEC isolés chez l'animal ou les aliments, Read et al., (1992) ont développé une PCR avec une paire d'amorce ayant pour cible une séquence conservée des gènes *stx*₁, *stx*₂ et *stx*_{2e}. Plusieurs matrices (viandes de bœuf, lait de chèvres, fèces de bœuf) contenant différentes souches de STEC (223 souches), d'*E. coli* non producteurs de Shiga-toxine (72 souches) et d'autres bactéries (76 souches) ont été testées.

Toutes les souches de STEC, appartenant à 50 sérotypes différents, ont pu être détectées avec cette méthode. *Shigella dysenteriae* de type 1 était la seule autre bactérie détectée. La sensibilité de cette méthode était de 1pg d'ADN ou 17 ufc.

Tous les protocoles de PCR appliqués directement sur les aliments se sont heurtés au problème des inhibiteurs de la polymérase. Pour éviter cela, il était alors nécessaire d'isoler les bactéries ou d'extraire leur ADN (Chen et al., 1998). Cependant, récemment, plusieurs protocoles ont été mis au point directement à partir des aliments. Begum et Jackson (1995), ont dilué mille fois les échantillons de viandes de bœuf afin de réduire la concentration des composés inhibant la polymérase. Avec cette technique, même si un enrichissement de 6 heures était indispensable, il était alors possible de détecter 30 STEC/ml de bouillon de culture.

Dans cette 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 souches ont été identifiées 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 souches ont été détectés séparément par PCR uniplex.

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).

L'évaluation du niveau d'hygiène de l'abattoir d'El Harrach a été effectuée par le dénombrement des coliformes thermotolérants et des *Escherichia coli* β -glucuronidase positives à 44°C.

Les coliformes thermotolérants, sont capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Entérobacter* et *Klebsiella* (Edberg et al., 2000). C'est ce qui a justifié l'utilisation du bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) à 44°C pour une partie de nos échantillons destinés aux dénombrements des coliformes thermotolérants représentés majoritairement par *E. coli* (80 à 90%) (Edberg et al., 2000).

L'autre partie des échantillons a été analysée en mettant en valeur l'activité de la β -glucuronidase des *E. coli* : en utilisant le milieu REC2 qui inhibe totalement la croissance des bactéries Gram positives et pratiquement celles de toutes les bactéries Gram négatives autres que les Entérobactéries (Joly et Reynaud, 2003). *E. coli* est aussi une des seules espèces d'Entérobactéries à posséder une β -glucuronidase active, ce qui a aussi justifié l'utilisation de ce milieu.

Les résultats du dénombrement trouvé par la méthode du NPP se sont révélés plus élevés que ceux trouvés par le dénombrement sur le milieu solide REC2. Ceci est dû à la sélectivité du REC2 qui permet de dénombrer uniquement les *E. coli* β -glucuronidase positives, alors qu'avec le BLBVB à 44°C on a non seulement la poussée des *E. coli*, mais aussi d'autres coliformes qui nous renseignent eux aussi sur la contamination fécale, et par conséquent sur le niveau d'hygiène.

3.5 Prévalence d'*E. coli* O157:H7

Sur les 151 carcasses ovines analysées, 11 (7,26%) étaient contaminées par la bactérie pathogène *E. coli* O157:H7.

Parmi les treize souches d'*E. coli* O157:H7 isolées, dix 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). Donc les souches isolées lors de cette étude sont potentiellement pathogènes et sont susceptibles de provoquer des épidémies.

Une des treize souches isolées possède uniquement les gènes *eae* et *ehxA*. Le même pathotype a été isolé par Zweifel à partir de selles de moutons (Zweifel et al., 2006).

Dans cette même étude, nous avons pu isoler deux souches d'*E. coli* O157:H7 sorbitol et β -glucuronidase positives portant le gène *stx*₂.

Ces nouveaux caractères phénotypiques sont dus d'après Armstrong soit à une mutation, soit à une appartenance de ce variant phénotypique peu fréquent à un clone primitif qui existait depuis longtemps (Armstrong et al., 1996).

Ou encore, d'après Karch, 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 *stx*₂ par conversion phagique (Karch, 1999).

En ce qui concerne ces souches de STEC O157:H7 sorbitol β -glucuronidase positives isolées lors de cette étude, bien qu'elles soient dépourvues du gène *eae* codant l'intimine, elles sont considérées comme potentiellement pathogènes. Le même pathotype 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, y compris 28 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, ainsi que par d'autres STEC, et ont montré des taux de prévalences d'*E. coli* O157:H7 pour des carcasses de mouton de l'ordre de 2% à 4% selon les pays, avec des taux d'isolement de STEC plus élevés (Brisabois et al., 2004)

En Australie, 1 117 carcasses ovines ainsi que 560 échantillons de viande ovine désossée et congelée ont été analysés en vue de la recherche d'*E. coli* O157:H7. Six (0,54%) carcasses de mouton ainsi qu'un échantillon (0,18%) de viande ovine congelée désossée étaient positives à l'égard du sérotype O157:H7 (Phillips et al., 2006). La prévalence de ce pathogène en Algérie (7,26%) dépasse donc celle trouvée en Australie de treize fois.

En Suisse, l'étude réalisée sur 580 carcasses ovines par Zweifel et al. (2003), dans le cadre du contrôle de l'abattage de mouton au niveau de trois abattoirs, a révélé que 36,6% des échantillons étaient positifs pour les gènes *stx* par PCR, sans préciser le sérotype.

En Allemagne, des études ont rapportées des taux d'isolement d'*E. coli* producteurs de Shiga-toxines de 2,56% dans de la viande d'agneau et de 72, 4% sur des carcasses de mouton (Beutin et al., 1995).

Chapman et Ashton, (2003) ont rapporté que 0,7% des carcasses ovines étaient contaminées par *E. coli* O157:H7.

D'après toutes ces études, l'on constate que le portage d'*E. coli* O157:H7 ainsi que d'autres sérotypes de STEC par les ovins semble important et présente un danger certain.

Effectivement, comme les bovins, les ovins sont des réservoirs importants de STEC (Kudva et al., 1996). Aussi, le portage fécal en élevage de mouton peut varier de 4,1% à 66,6% selon les études (Heuvelink et al., 1998 ; Beutin et al., 1993).

Les sérotypes les plus fréquemment retrouvés sont : O91 : H- (Kudva et al., 1996 ; Blanco et al., 2003 ; Vettorato et al., 2003), O128 : H2 (Kudva et al., 1996 ; Beutin et al., 1997 ; Koch et al., 2001 ; Blanco et al., 2003), O146 : H21 (Koch et al., 2001 ; Vettorato et al., 2003).

D'après une étude en Suisse, 30% des excréments de moutons de boucherie analysés étaient positifs aux STEC (Zweifel et al., 2005).

En 2001, une étude portant sur 1 623 fèces d'ovins a révélé la présence de STEC porteurs de facteurs de virulence sur 85% des agneaux et 95% des moutons testés (Djordjevic et al, 2001). Parmi les souches isolées, 47,5% des STEC comportaient les gènes *stx*₁, *stx*₂ et *ehxA*.

EN Suisse, entre octobre 2004 et juin 2005, 630 échantillons de selles de moutons ont été examinés dans le but de rechercher la présence du sérotype O157:H7. Sept échantillons (1,1%), répartis sur l'ensemble de la période de recherche, se sont révélés positifs. Les souches d'*E. coli* O157 isolées par hybridation des colonies fermentaient toutes le sorbitol et étaient de 4 types (H7, H12, H38, H48). Aucune ne produisait toutefois de Shiga-toxine. Chez l'une des souches O157:H7, le gène *eae* combiné avec le gène *ehxA* a été mis en évidence (Zweifel et al, 2006).

Donc ce portage constitue une réelle menace, car ces agents pathogènes peuvent contaminer les carcasses ainsi que les produits finis lors de mauvais procédés d'abattage et de transformation de cette denrée, et constituer par conséquent un véritable danger pour le consommateur. Notamment pour les groupes d'âge les plus vulnérables qui sont les enfants de moins de cinq ans et les personnes âgées de plus de soixante ans.

En effet, des épidémies d'infections à *E. coli* O157:H7 liées à des contacts avec des ovins ou à la consommation de la viande de mouton ont déjà été décrites (Chapman et al., 2000).

En juillet 2002, 11 cas de gastro-entérites dont 2 cas compliqués de SHU, ont été identifiés en France chez des personnes ayant mangé de la viande de mouton en méchoui lors d'un mariage (Espié et Vaillant, 2002).

La souche de STEC isolée à partir des selles du cas de SHU et les 3 souches de STEC isolées à partir de la viande cuite et des abats crus de mouton appartenaient au sérotype O148:H8 et portaient tous deux le gène *stx*_{2c} codant pour la Shiga-toxine de type 2c.

Les résultats de notre étude montrent que les STEC, et plus précisément les *E. coli* O157:H7, sont portés par les ovins en Algérie qui peuvent être considérés comme des réservoirs de ces pathogènes et pour lesquels des mesures de prévention et de contrôle adaptés doivent être mises en œuvre, tout comme pour les autres espèces de ruminants.

3.6 Sensibilité aux antibiotiques

Au cours de la présente étude, parmi les treize souches de STEC O157 isolées, trois souches (23,1%) se sont avérées résistantes à la tétracycline, une souche (7,7%) résistante au furane et enfin une souche (7,7%) résistante à la tétracycline et au furane. Les huit souches (61,5%) restantes 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 au furane montrée dans cette étude indique que ces substances sont probablement utilisées dans notre pays.

Peu de travaux ont été réalisés sur la résistance des *E. coli* O157 aux antibiotiques. Néanmoins, 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, ampicilline-sulbactame céphalosporines (cefazoline, cefuroxime), aztreonam, sulphonamides, co-trimoxazole, aminoglycosides, tétracycline et chloramphénicol. (Novotna et al, 2005).

La résistance des STEC aux antibiotiques a été aussi observée en Palestine, où 49% de STEC isolés de selles humaines et 55% isolés de viande bovine présentaient une résistance à trois antibiotiques ou plus (Adwan et Adwan, 2004).

Une autre étude française a été réalisée par l'Afssa-Lyon sur 94 souches d'*E. coli* O157 provenant de prélèvements d'environnement d'abattoir et d'origine bovine. Les résultats ont montré globalement une bonne sensibilité des souches productrices, ou non de Shiga-toxines, à l'ensemble des molécules suivantes : ampicilline, association amoxicilline / acide-clavulanique céfalotine, céfoperazone, cefuroxime, streptomycine, kanamycine, gentamicine, colistine, association trimetoprim-sulfaméthoxazole, acide nalidique, marbofloxacin, ciprofloxacine, chloramphénicol et florfenicol. Seulement deux souches ont présenté un haut niveau de résistance à la fois à la tétracycline (même résultat trouvé dans notre étude), et au trimetoprim-sulfaméthoxazole (AFSSA, 2006).

Aux Etats-Unis, la sensibilité à différents antibiotiques a été étudiée pour 361 souches d'*E. coli* O157 isolées, entre 1985 et 2000, à partir de sources diverses. 99 souches (27 %) étaient résistantes à la tétracycline (Schroeder et al, 2002).

D'après ces résultats, l'on constate que la résistance d'*E. coli* O157 à la tétracycline a été retrouvée dans toutes les études, de même que dans la notre. Ceci est du probablement à l'utilisation irrationnelle de cette substance, et cela ne peut avoir que des répercussions néfastes sur la santé publique.

Effectivement, les tétracyclines ont été utilisées de façon désordonnée dans les aliments du bétail dans de nombreux pays, ce qui a entraîné l'apparition de résistances chez les travailleurs (fermiers, abatteurs d'animaux) et les consommateurs (de viandes, de lait...). Ceci a poussé certains pays, comme le Royaume Uni, à interdire l'utilisation de cet antibiotique dans l'alimentation du bétail (Helali, 2002).

3.7 Qualité bactériologique et hygiénique des carcasses

Le dénombrement des coliformes thermotolérants et d'*E. coli* permet d'estimer la contamination fécale des carcasses, et de ce fait d'évaluer le niveau des pratiques d'hygiène au cours du processus d'abattage au niveau des abattoirs. Et qui dit contamination fécale dit non seulement risque de contamination des carcasses par des *E. coli*, mais également par d'autres germes pathogènes fécaux, présents éventuellement au niveau de la microflore digestive.

Dans la présente étude cette estimation a été établie par le dénombrement des coliformes thermotolérants et des *E. coli* β -glucuronidase positives sur les surfaces des carcasses ovines au niveau de l'abattoir d'El Harrach.

Les résultats des dénombrements ont révélé un taux élevé de contamination des carcasses ovines par les germes d'origine fécale. Ainsi 100% des résultats des dénombrements des coliformes thermotolérants et 40% de ceux des *E. coli* étaient supérieurs à la limite M, c'est-à-dire au niveau de la zone inacceptable.

Le taux élevé de contamination des carcasses dans notre pays peut être expliqué par les différentes anomalies rencontrées lors des différentes étapes de l'abattage, à s'avoir la saignée, l'habillage et l'éviscération. Ces étapes sont considérées comme des points critiques pour lesquels des mesures correctives doivent être envisagées.

Les principales anomalies enregistrées dans cet abattoir sont décrites ci-dessous :

- Au moment de la saignée, on remarque non seulement l'écoulement du sang, mais aussi du reflux œsophagien (riche en coliformes) ; cela engendre une souillure du cou et de la robe de l'animal. Cette souillure va se répandre sur l'ensemble de la carcasse par la suite. Ce phénomène est le témoin du non respect de la diète hydrique qui est en principe obligatoire.
- L'habillage des carcasses est réalisé avec le même couteau qui a servi à la saignée, donc souillé par le sang qui est un véritable milieu de culture pour les bactéries, mais aussi par le reflux alimentaire, d'où le risque de contamination des carcasses par ce couteau qui devient alors un véritable outil d'ensemencement.
- La désarticulation des extrémités de l'animal, généralement très souillées, est réalisée avec toujours le même couteau, ce qui accroît encore plus le risque de contamination des carcasses.
- A l'enlèvement du rectum, on observe souvent la contamination du membre postérieur de la carcasse par les selles (figure en annexe).
- A l'éviscération, il y a souvent perforation du rumen, donc contamination de l'intérieur et l'extérieur de la carcasse.
- L'essuyage des carcasses est réalisé à l'aide de lambeaux de laine. Cette opération ne va évidemment pas rendre la carcasse propre comme croit l'ouvrier, bien au contraire, cela ne fait qu'entraîner la dissémination des germes.
- Le non respect de la marche en avant et la présence des animaux non encore abattus à proximité des carcasses suspendues entraînent un risque de contamination de ces dernières par la peau des animaux qui est généralement très souillée (figure en annexe).

Ces différentes étapes d'abattage sont des points critiques et déterminants pour le bon déroulement du processus à l'abattoir et doivent être maîtrisées. Des actions correctives doivent être mises en place pour faire face aux non-conformités constatées.

Il existe un certain nombre d'études réalisées de par le monde ayant pour but d'estimer l'hygiène des carcasses ovines au niveau des abattoirs.

Aux Etats-Unis, Duffy et al, (2001) ont analysé 5 042 carcasses d'agneaux et ont trouvé une prédominance globale d'*E. coli* de 66,2%.

En Australie, entre 1993 et 1994, l'industrie australienne de viande a commissionné sa première étude pour estimer la qualité microbiologique de la viande de mouton (Vanderlinde et al., 1999). L'analyse a été effectuée sur des pièces de viande excisées à partir des carcasses (méthode destructive), le dénombrement d'*E. coli* a été réalisé par la méthode du NNP. Le pourcentage d'*E. coli* détecté a été de 75%. En 1998, une seconde étude a été entreprise, mais cette fois-ci après l'instauration du plan HACCP, et cela pour évaluer l'efficacité des nouvelles mesures d'hygiène appliquées au niveau des abattoirs après la première étude réalisée. *E. coli* a été détecté au niveau de 24% des carcasses ovines (Phillips et al., 2001). En Australie toujours, 1 117 échantillons de carcasses ovines ont été rassemblés de février-avril 2004 à juillet-octobre 2004 au niveau de 20 abattoirs. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une éponge en polyuréthane (méthode non destructive). Le dénombrement d'*E. coli* a été réalisé grâce à des pétrifilms. *E. coli* a été détecté sur 43% des échantillons et le log 10 moyen était de 0,03 ufc/cm² (Phillips et al, 2006), alors que dans notre présente étude 100% (n= 30) des carcasses étaient positives à l'égard d'*E. coli*, avec un log 10 moyen de 1,2 ufc/cm².

D'après le règlement (CE) N° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005, concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, et d'après le comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique (CSVSP), un avis sur *E. coli* vérotoxino-gènes dans les denrées alimentaire a été émis dans lequel le comité est parvenu à la conclusion que l'application d'une norme microbiologique pour les STEC O157 dans le produit final n'entraînerait probablement pas de réduction sensible du risque connexe pour les consommateurs. Cependant, des orientations microbiologiques destinées à réduire la contamination fécale dans la chaîne alimentaire peuvent contribuer à réduire les risques pour la santé publique.

Sur cette base, cet avis insiste sur l'intérêt du respect des bonnes pratiques d'hygiène et de la mise en place du système HACCP tout au long de la chaîne alimentaire pour réduire le risque de transmission au consommateur. Il précise que toute détection de ce pathogène dans un aliment doit déboucher sur la mise en place de mesures appropriées, et que la mise en place d'analyses peut apporter une certaine efficacité lorsqu'il y a des éléments comme une contamination fécale apportant une forte suspicion de contamination. La mise en place de critères indicateurs d'hygiène associés à la mise en œuvre d'actions correctives concernant la contamination de surface des carcasses par les entérobactéries, est recommandée.

Parmi les coliformes fécaux, *E. coli* est le seul qui soit sans équivoque toujours d'origine fécale et, à ce titre, il est de plus en plus considéré comme l'organisme indicateur spécifique d'une contamination fécale (Edberg et al., 2000). Sa détection dans une denrée doit être donc considérée comme reflétant la présence possible de micro-organismes pathogènes. De ce fait, le contrôle de la contamination fécale des carcasses est le premier maillon de la chaîne de sécurité qu'il faut maîtriser pour prévenir la présence des germes fécaux sur cette denrée, qu'ils soient pathogènes ou non.

Afin de voir le taux de contamination des carcasses diminuer en Algérie, plusieurs mesures correctives doivent être prises au sein de nos abattoirs avec l'application de consignes strictes tout au long du processus d'abattage, le tout suivi d'un plan de surveillance pour pallier les insuffisances constatées et améliorer les mesures d'hygiène au niveau des différents points critiques.

4. Conclusion

La présence des souches d'*E. coli* O157:H7 sur la surface des carcasses ovines, ainsi que leur résistance à certains antibiotiques, ont été montrées lors de cette étude. D'après ces résultats l'on constate que le risque des toxi-infections alimentaires dues aux STEC, et plus précisément au sérotype O157:H7, existe réellement en Algérie où la viande ovine est très prisée.

Afin de prévenir l'apparition de flambées épidémiques dont l'acteur principal serait cet agent pathogène extrêmement virulent, comme ce fût le cas dans les années 1980 dans les pays anglo-saxons, des mesures préventives doivent être envisagées pour éviter la survenue d'une catastrophe où les premières victimes seraient les enfants et les personnes âgées.

En effet, le système moderne de contrôle des denrées alimentaires a recentré les stratégies de sécurité sanitaire des aliments sur la prévention plutôt que, comme auparavant, sur la riposte et le redressement de la situation après qu'une denrée contaminée ait été mise sur le marché.

Actuellement *E. coli* O157:H7 est le seul STEC pour lequel les données disponibles sur ses caractéristiques bactériologiques et épidémiologiques permettent d'envisager un contrôle.

Les actions à développer sont d'une part les mesures préventives générales s'intégrant dans une démarche de type assurance-sécurité (bonnes pratiques d'hygiène), d'autre part des actions plus spécifiques à sa maîtrise, par l'analyse des risques (système HACCP).

Pour cela, une bonne connaissance de l'épidémiologie des STEC en Algérie et une bonne application des règles générales d'hygiène sur toute la chaîne, depuis l'élevage jusqu'à la distribution, doivent conduire à diminuer la pression de contamination.

5. Recommandations

Au cours de notre étude, nous avons relevé quelques anomalies au niveau de nos abattoirs, avant et après l'abattage des animaux. Ces quelques suggestions seront peut être utiles et contribueront à la diminution de la contamination des carcasses. Ces mesures concerneront aussi bien l'éleveur, le personnel d'abattoir, que 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, ainsi que le changement régulier d'eau d'abreuvement, du lisier aussi bien dans la ferme qu'à l'abattoir, sont indispensables pour éviter la contamination de l'environnement qui devient alors le relais nécessaire à l'entretien du cycle épidémiologique de ce pathogène ;
- Les animaux (ovins, bovins) doivent être acheminés séparément vers l'abattoir dans de bonnes conditions de transport. En effet les animaux affaiblis et stressés excrètent 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 l'infection d'un animal à l'autre ; la peau des animaux issus de troupeaux non porteurs peuvent se retrouver contaminés par les déjections d'animaux porteurs ;
- Le nettoyage et la désinfection des camions entre deux chargement doit être obligatoire ;
- 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 microbiologique ;
- Une bonne maîtrise de l'hygiène de l'habillement, la face extérieure de la peau ne devant pas entrer en contact avec la viande. Toute incision de la peau doit se faire avec un couteau dédié ;
- Une bonne maîtrise de l'hygiène de l'éviscération, l'éviscération ne devant pas engendrer de souillure sur la carcasse. La désinfection des couteaux entre chaque carcasse 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 risquent de contaminer directement ou indirectement (par voie aérienne) la surface des carcasses ;

- Des prélèvements doivent être réalisés périodiquement sur les carcasses par les services compétents, afin d'y rechercher des contaminants bactériens. Cette démarche permet d'évaluer le niveau des pratiques d'hygiène, d'apporter les corrections nécessaires et de contrôler l'efficacité des mesures entreprises.

Hormis le sérotype O157, il existe d'autres STEC potentiellement pathogènes pour l'homme, tels que le O91 : H-, O128 : H2 et O146 : H21 (Koch et *al.*, 2001). Il serait donc intéressant de les rechercher dans des études ultérieures afin d'avoir une meilleure appréciation de la situation réelle des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en Algérie.

Pour cela, l'instauration des techniques de biologie moléculaire au niveau des laboratoires serait la bienvenue, afin de pouvoir non seulement rechercher les STEC dans la viande mais aussi de procéder à leur dépistage au niveau des fermes, cela pour réduire le risque de contamination à la source.

Il faut souligner que ce travail n'est qu'une modeste contribution à l'étude des STEC au niveau de la viande ovine qui peut être élargi et complété par d'autres recherches tant au niveau des abattoirs qu'au niveau d'autres structures de production. Mais également en milieu hospitalier, où ce pathogène ne figure pas dans la liste des bactéries systématiquement recherchées lors de diarrhées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

ADWAN. M.A., ADWAN. K.M. Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, **97**, 81-84.

AFSSA. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments: Nancy, 2003, 220 p.

AFSSA. Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquence pour la santé humaine. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments : Nancy, 2006, 214p.

AI-SAIGH. Fecal shedding of *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Campylobacter* in Swiss cattle at slaughter. *J. Food Prot.* 2004, **67**, 679-684

AMMON. A. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infection and haemolytic and uraemic syndrome (HUS) in Europe, *Euro Surveillance*, 1997, 2(12).

AMMON. A, PETERSEN. L.R, KARCH. H. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157. *Journal of Infectious Diseases*, 1999, **179**, 1274-1277.

ANNONYME. Présentation des résultats de deux études sur un vaccin canadien contre l'*E. coli* au symposium international VTEC à Edimbourg, *Bioniche Life Sciences INC*, 2003.

ANONYME. Special feature : *Escherichia coli*, 1985. In: **MAINIL J (a).** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Les adhésines et facteurs de colonisations, 2003, *Ann. Méd. Vét*, **147** : 105-126

ANONYME, 2002, ARRETE ROYALE DU 28 AOUT 2002 modifiant l'A.R. du 4 juillet 1996 relatif aux conditions générales et spéciales des abattoirs et d'autres établissements. *Moniteur belge*, 14 septembre 2002, 40882-40894.

ANONYME, 2002, DECISION DE LA COMMISSION EUROPEENNE 2001/471/CE du 8 juin 2001 établissant les règles applicables au contrôle régulier de l'hygiène générale effectué par les exploitants dans les établissements conformément à la directive 64/433/CEE relative aux conditions de production et de mise sur le marché de viandes fraîches et à la directive 71/188/CEE relatives à des problèmes sanitaires en matière d'échanges de viandes fraîches de volaille. *Journal officiel de l'union européenne*, 21 juin 2001, L **165**, 48-53.

ANONYME. Ecllosion cause par *Escherichia coli* O157:H7 entraînant le rappel de bœuf haché vendu dans un établissement de détail, *Canada Communicable Disease Report*, 2000, **26** : 109-111.

ANONYME. Ecllosion d'infection à *E. coli* O157:H7 associée à un cidre de pomme artisanal non pasteurisé- ONTARIO, *Canada Communicable Disease Report*, 1999, 25-13.

ANONYME. *Escherichia coli* O157:H7 associé à un zoo d'enfant_ Transmission secondaire, infection asymptomatique et excrétion de la bactérie en classe, *Canada Communicable Disease Report*, 2004, **30** : 173-179.

- ARMSTRONG. G.L, HOLLINGSWORTH. J et MORRIS. J.G.** 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*; 1996; **18**: 29-51.
- BARCOCY-GALLGHER. G.A, ARTHUR. T.M, RIVERA-BETANCOURT. M, NOU X., SHACKELFORD.. S.D, WHEELER., and KOOHMARAIE. M.** Characterization of O157:H7 and other *Escherichia coli* isolates recovered from cattle hides, feces, and carcasses, *J. Food. Protect*, 2004, **67**: 993-998.
- BASTIAN. S.N., CARLE. I. and GRIMONT. F.** Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 1998, **149**: 457-472.
- BEGUM. D. et JACKSON. M.P.** Direct detection of Shiga-like toxinproducing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction, 1995. In: **BOUVET. J et VERNOZY-ROZAND. C.** Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxique (VTEC) et des *Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments, *Revue Méd. Vét.*, 2000, **151** : 907-914.
- BENNETT. A.R, MAC PHEE. S et BETTS. R.P.** Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef. *Lett. Appl. Microbiol*, 1995, **20**: 375-379.
- BERTIN. Y., BOUKHORS K., PRADEL N., LIVRELLI V. and MARTIN. C.** 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* 2001, **39**: 3060-3065
- BEUTIN. L.** *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 285-298.
- BEUTIN. L., GEIER. D., STEINRUCK. H., ZIMMERMANN. S and SCHEUTZ. F.** Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993;**31** (9):2483-2488.
- BEUTIN. L., GEIER. D., ZIMMERMANN. S, ALEKSIC. S., GILLESPIE. H. A, et WHITTAM. T. S.** 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*, 1997, **63**: 2175-2180.
- BEUTIN. L., GEIER. D., ZIMMERMANN. S., KARCH. H.** Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J Clin Microbiol* 1995; **33**:631-5.
- BEUTIN. L., MONTENEGRO. M. A., ORSKOV. I., ORSKOV. F., PRADA. J., ZIMMERMANN. S., and STEPHAN. R.** Close association of verotoxin (Shiga-Like Toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*, *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 2559-2564.

BGOSHU. The investigation report of the Walkerton outbreak of waterborne gastroenteritis. Bruce-Grey-Oewn Sound Health Unit, Ontario, 2000.

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. 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*, 2003, **228**:345-351.

BOUVET. J et VERNOZY-ROZAND. C. Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxique (VTEC) et des *Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments, *Revue Méd. Vét.*, 2000, **151** : 907-914.

BRISABOIS. A., GAUCHARD. F., ANDRAL. B., BRUGERE. H., ESPIE. E., ROZE. S., VERNOZY-ROZAND C. Epidémiologie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine, *Bulletin épidémiologique*, 2004, 12.

BURK C., DIETRICH R., AÇAR G., MORAVEK M., BÜLTE M. and MÄRTLBAUER E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**: 2106-2012.

CALDERWOOD. S.B., AKESON. D.W.K., KEUSCH. G.T., BARRETT. T.J. and GRIFFIN P.M. 1996. In: **BERARDIN M.** Caractérisation de souches de *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) isolés de fromages au lait cru français et génotypage des variants stx d'une collection de *Escherichia coli* O157:H7, 2005.

CAPRIOLI A., MORABITO S., BRUGERE H., OSWALD E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 2005, **36**:289-311.

Centre of Disease Control and Prevention (CDC) In: *bionic he life science, INC*, 2006.

CHAHED. A., CHINA. B., MAINIL. J., DAUBE. G. Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria. *J. Appl Microbiol.*, 2006, **101**: 361-368

CHAPMAN P.A., SIDDONS C.A., ZADIK P.M et JEWES L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol*, 1991, **35**: 107-110.

CHAPMAN. P.A Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *Escherichia coli* O157. *Food control*; 1995, **6**: 187-193.

CHAPMAN. P.A, ASHTON. R. An evaluation of rapid methods for detecting *Escherichia coli* O157 on beef carcasses, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **87**: 279-285.

CHAPMAN. P.A., CORNELL. J., GREEN. C. Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. *Epidemiol Infec* 2000; **125**:531-6.

- CHART. H., KENKINS. C., SMITH. H.R, HEDGES. D et ROWE. B.** Haemolysin production by strains of verocytotoxin-production *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*; 1998, **141**: 103-107.
- CHEN S., XU R., YEE A., WU K.Y., WANG C.N., READ S. et DE GRANDIS S.A.** An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4210-4216.
- CHINA. B.** Attaching and effacing *Escherichia coli*. *Recent. Res. Devel Microbiol*; 2000, **4**: 1-30.
- CHINA. B., GHAFIRI., DAUBE. G.** Estimation qualitative et quantitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **147**, 99-109.
- CHINA. B., PRISON. V., MAINIL. J.** Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, **62**, 3462-3465.
- COIMBRA R.S., GRIMONT. F. et al.** Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res. Microbiol.*, 2000, **151**:639-654.
- DE RYCKE. J.** Les colibacilles producteurs de cytotoxines : importance en médecine vétérinaire et en santé publique, 1991, *ANN Rech Vét*, **22** : 105-126 ;
- DE ZUTTER et URADZINSKI. J.** 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*;1997, **54** (1), 48.
- DJORDJEVIC. S.P., HORNITZK.Y M.A., BAILEY. G., GILL. P., VANSELOW. B., WALKER. K. and BETTELHEIM. K.A.** Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *J Clin Microbiol* , 2001,**39**: 2017-2021.
- DOUBLET. B.** 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*, 2004, 249p.
- DOYLE., M.P., and SCHOENI. J.L.** Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol.*,1984, **48**: 855-856.
- DUFFY. E., BELEK. K., SOFOS. J., LEVALLEY. S., KAIN. M., TATUM. J., et al.,** Microbial contamination occurring on lamb carcasses processed in the United States. *Journal of Food Protection*, 2001, **61**, 329-333.
- EDBERG., S.C, RICE. E.W., KARLIN. R.J et ALLEN. M.G.** *Escherichia coli* the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**: 106-116.

- ESCHERICH. T.** Die Darmbacterien des Neugeborenen un Saglins, 1885. In: **POHL. P.** Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 325-333.
- ESPIE. E et VAILLANT. V.** Toxi-infection alimentaire collective à *Escherichia coli* O148 :H8 producteur de shigatoxines ; *Rapport d'investigation ; Institut De Vaille Sanitaire*, Gironde, Juin 2002.
- FEGAN and DESMARCHELIER.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in Eastern Australia, 1999. In: **VETTORATO. M.P., LEOMIL. L., GUTH. B. E. C., IRINO. K and PESTANA DE CASTRO. A.F.** Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of Sao Paulo, Brazil, *veterinary Microbiology*, 2003, **95**: 103-109.
- FRENZEN. P. D., DRAKE. A. et al.** Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *J. Food Prot*, 2005, **68**: 2623-263 in *bioniche life science, INC*, 2006.
- GALMICHE. A et BOUQUET.** Toxines bactériennes : facteurs de virulence et outils de biologie cellulaire, *Médecine Sciences*, 2001, **17** : 691-700.
- GOODSHIP T. HJ.** Génétique et physiopathologie du syndrome hémolytique et urémique (SHU) et du purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT). *Flammarion Médecine-Sciences_ Actualités néphrologiques*, 2004, 58- 65.
- GRIFFIN. P.M et TAUXE. R.V.** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev*; 1991, **13**: 60-92.
- HANCOCK. D., BESSER. T., LEJEUNE. J, DAVIS. M., RICE. D.** The control of VTEC in the animal reservoir, *International Journal of Food Microbiology*, 2001, **66**: 71-78.
- HELALI. A.** Pharmacologie fondamentale et Clinique à l'usage des étudiants en médecine, *Santé Collection*, ENAG/ éditions, 2002, 183p.
- HEUVELINK, A.E., Van DEN BIGGELAAR, F.L., de BOER, E., HERBES, R.G., MELCHERS, W.J., HUIS in 't VELD, J.H., MONNENS, L.A.** Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J. Clin. Microbiol*, 1998, **36**, 878-882.
- HUTCHISON M.L., WALTERS L.D., REID C.A., AVERY S.M., WILSON D., HOWELL M., JOHNSTON A., BUNCIC S.** 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*, 2005, **68 (10)**: 2155-2162.
- ISO.** Microbiologie des aliments- prélèvements d'échantillons sur des carcasses en vue de leur analyse microbiologique TSO 17604, ISO, 2003, Suisse.

JERSE. A.E. and KAPER. J.B. 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*, 1991, **59**: 4302-4309.

JOHNSON. J.L., ROSE. B.E., SHARAR. A.K., RANSON. G.M., LATTUADA. C.P et MCNAMARA A.M. Methods used for detections and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a foodborne disease outbreak. *J. Food. Protect*, 1995, **58**: 597-603.

JOLY. B. ET REYNAUD. Entérobactéries, systématique et méthodes de diagnostic. Monographie de microbiologie, 2^{ème} édition. TEC&DOC, 2003, 356p.

KARCH H. et MEYER T. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-toxin producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 1180-1186

KARCH. H. Origin of EHEC. Abstracts of the second international symposium of the European study group on Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Acta. Clin. Belg*; 1999; **54(1)**: 48.

KARCH. H., RUSSMANN. H., SCHMIDT. H., SCHWARZKOPF. A et HEESEMANN J. Long-term shedding and clonal turnover of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J. Clin. Microbiol*; 1995, **33**: 1602-1605.

KARMALI M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, 1989,**2** : 15-38.

KOCH. C., HERTWIG. S., LURZ. R., APPEL. B., BEUTIN. L. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx*_{OX3} gene which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3992-3998

KOHLI. H.S., CHAUDHURI. A.K., TODD. W.T., MITCHELL. A.A., and Liddell, K.G. A severe outbreak of *E. coli* O157 in two psychogeriatric wards. *J Public Health Med*, 1994, **16**: 11-15.

KUDVA. I.T., HATFIELD. P.G., HOVDE. C.J. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep, *J Clin Microbiol*, 1996, **34**: 431- 433.

LECLERC. V., LE QUERREC. F., ANDRAL B, VERNOZY-ROZAND C. Epidémiologie des *Escherichia coli* vérocytotoxiques et alimentation. *Bulletin épidémiologique*, 2002, 4.

LEGRAND. I. *E. coli* O157 :H7 producteurs de verotoxines, *Viande Prod. Carnés*, 1997, **18** : 257-263.

LEYRAL. G., VIERLING. E. Microbiologie et toxicologie des aliments. Hygiène et sécurité alimentaire. Bioscience et technologie. 2^{ème} édition. Doin, 1997, 272p.

LIN. Z., KURAZONO. H., YAMASAKI. S., and TAKEDA. Y. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. 1993. 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.

LIOR. H. Classification of *Escherichia coli*.1994. In: **MAINIL J (a)**. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Les adhésines et facteurs de colonisations, 2003, *Ann. Méd. Vét*, 147 : 105-126.

MAILLES. A., VERNOZY-ROZAND. C., MARIANI-KURKDJIAN. P., RAPPAPORT. M., PIIHER. N., DUFRAISSE. M. P., CHARRON. M., PERRET. F., HOREN. B., DOIREAU. V., NAUD. J., GRIMONT. F., LANAS. B., ESPIE. E., VAILLANT. V. Epidémie d'infections à *E. coli* O157 :H7 liée à la consommation de Steaks hachés surgelés, Aquitaine et Midi-Pyrénées, 2005.

MAINIL. J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Les adhésines et facteurs de colonisations, 2003a, *Ann. Méd. Vét*, **147** : 105-126.

MAINIL. J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Franchissement des muqueuses et propriétés invasives, 2003b, *Ann. Méd. Vét*, **147** : 159-171

MAINIL. J. G., DAUBE. G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **98**, 1332-1344.

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

MIRAGLIA D., RANUCCI D., D'OVIDIO V., BRANCIARI R., SEVERINI M. Comparison between carcass Microbial load Recovered by Swabbing surfaces of different size and Using the Reference Excision Method. *Veterinary Research Communications*, 2005, **29**: 339-341

NAGANO H., HIROCHI T., FUJITA K., WAKAMONI Y., TAKESHI K and YANO S. Phenotypic and genotypic characterization of β -glucuronidase-positive Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer (cerfs). *Journal of Medical Microbiology*, 2004, **53**: 1037-1043.

NATARO. J.P et KAPER. J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbio. Rev*; 1998, **11**: 144-201

NAUTA. M.J., and DUFRENNE. J. Variability in growth characteristics of different *E.coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. *Quant. Microbiol.* 1999, **1**: 137-155.

NEPAD., Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Appui au développement de la filière ovine avec installation d'un abattoir aux normes internationales dans la wilaya de Djelfa. 2006, TCP/ALG/3102., (NEPAD Ref. 06/47 F).

NOVOTNA. R., ALEXA. P., HAMRIK. J., MADANTA. A., SMOLA. J., CIZEK., Isolation and characterization Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep and goats in

Jordan with evidence of multiresistant serotype O157: H7. *Vet. Med.-Czech*, 2005, **50**(3): 111-118.

OMS, *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC), 2005

OMS. Nouveaux développements dans la mise au point de vaccins contre les infections à *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et entérohémorragique (EHEC), *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire*, 1999, **74** : 105-112.

PADHYE. N.V et DOYLE M.P. *Escherichia coli* O157:H7. Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in foods. *J. Food. Protect*; 1992, **55**: 555-565.

PATON. A. W., SRIMANOTE P., WOODROW. M.C., PATON. J.C. 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.*, 2001, **69**, 6999-7009.

PHILIPS. D., SUMNER J., ALEXANDER. J., et DUTTON. K. Microbiological quality of Australian sheep meat. *Journal of Food Protection*, 2001, **64**:697-700.

PHILLIPS. D., JORDAN. D., MORRIS. S., JENSON. I., SUMMNER. J. Microbiological quality of Australian sheep meat in 2004. *Meat Science*; 2006, **74** : 261-266.

POHL. P. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137** : 325-333.

READ. S.C., CLARKE. R.C., MARTIN. A., DE GRANDIS. S.A., HII J., MCEWENS S. et **GYLES C.L.** : Polymerase chain reaction for detection of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources, 1992. In: **BOUVET. J et VERNOZY-ROZAND. C.** Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxique (VTEC) et des *Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments, *Revue Méd. Vét.*, 2000, **151** : 907-914.

REGLEMENT (CE) N° 2073/ 2005 DE LA COMMISSION du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. (*J.O L 338/1* du 15 novembre 2005).

REMUZZI. G., RUGGENENTI. P. The hemolytic uremic syndrome, *Kidney Int*, 1995, **47**: 2-19.

REMUZZI. G., RUGGENENTI. P. Traitement du syndrome hémolytique et urémique de l'adulte, *Flammarion Médecine- Sciences_ Actualités néphrologiques*, 2000, 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. 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*, 2006, **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., and COHEN. M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.*,1983, **308**: 681-685.

ROUSSET. E., DUBREUIL. D., Les récepteurs des entérotoxines bactériennes, *Vet. Res*, 2000, **33** : 413-435

SCHMIDT. H., RÜSSMAN. H., SCHWARZKOPF. A., ALEKSIC. S., HEESEMANN. J. and KARCH. H. Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls, *Zentralbl Bakterio*, 1994, **281**: 201-213

SCHROEDER. C.M., ZHAO. C., DEBROY. C., TORCOLINI. J., ZHAO, S., White. D.G., WAGNER. D.D., MCDERMOTT. P.F., WALKER. R.D., and MENG. J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 576-581.

STROCKBINE. N.A., JACKSON. M.P., SUNG. L.M., HOLMES. R.K. and O'BRIEN .A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 1116-1122.

STROCKBINE. N.A., MARQUES. L.R., NEWLAND. J.W., SMITH. H.W., HOLMES. R.K. and O'BRIEN. A.D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun*, 1986, **53**: 135-140.

SUTRA. L, FEDERIGHI. M et JEUVE. J.L. Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica, Paris*, 1998, 308p.

SWERDLOW. DL., BA WOODRUFF. RC BRADY., P GRIFFIN., S. TIPPEN., HD. NONNELL., E. GELDREICH., BJ PAYNE., A. MEYER, J.G. WELLS., K.D. GREENE., M BRIGHT. N.H .BEAN ET PA BLAKE. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine*,1992, **117**: 812-819.

THOMSON. J.S., HODGE. D.S., and BORCZYK. A.A. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**: 2165-2168.

VANDERLINDE. P., SHA. B., et MURRAY. J., Microbiological status of Australian sheep meat. *Journal of Food Protection*, 1999, **62**: 380-385.

VERNOZY-ROZAND. C., MONTET. M, *Escherichia coli* O157:H7. Monographies de microbiologie. 2^{ème} édition. TEC&DOC, 2005, 164p.

VETTORATO. M.P., LEOMIL. L, GUTH. B. E. C., IRINO. K., PESTANA DE CASTRO. A.F, Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia* (STEC) isolates from sheep in the State of Sao Paulo, Brazil, *Veterinary Microbiology*, 2003, **95**: 103-109.

WHITTAM. T.S., WOLFE. M.L., WACHSMUTH. I.K., ORSKOV. F., ORSKOV. I., and WILSON. R.A. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun.*, 1993, **61**: 1619-1629.

WILLSHAW. G.A, SCOTLAND. S.M, SMITH. H.R et ROWE. B. Properties of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. *J. Infect. Dis*; 1992, **166**: 797-802.

WONG. C.S., JELACIC. S., HABEEB. R.L., WATKINS. S.L., and TARR. P.I. The risk of the hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med*, 2000, **342**: 1930-1936.

WRIGHT. D.J, CHAPMAN. P.M et SIDDON. C.A. Immuno-magnetic separation as a sensitive method for isolation *Escherichia coli* O157:H7 from food samples. *Epidemiol. Infect*; 1994, **113**: 31- 39.

YOSHITOMIK. J., JINNEMA. KC., WEAGANTS. S.D., 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 multiplx PCR. *Mol. Cell Probes*. 2006, **20**: 31-41

ZADIK. P.M., CHAPMAN. P.M et SIDDON. P.A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol*; 1993, **39**:155-158.

ZHANG. X.P., MCDANIEL. A.D., WOLF. L.E., KEUSCH. G.T., WALDOR. M.K., ACSHESON D. W. K. Quinolone antibiotics induce shiga toxin- encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, **181**: 664-670.

ZWEIFEL et STEPHAN. Les ruminants, réservoirs de STEC : un problème ? *OVF 3105* magazine, *Rapport Suisse sur les zoonoses*, 2005.

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

ZWEIFEL. C., BLANCO. J.E, BLANCO. M, BLANCO. J, STEPHAN. R. Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia* (STEC) from Swiss cattle, *Vet Microbiol*, 2005, **105**: 37-47.

ZWEIFEL. C., KAUFMAN. M., BLANCO. J., STEPHAN. R., Significance of *Escherichia coli* O157:H7 in sheep at slaughter in Switzerland *Schwerz Arch Tierheilkd*, 2006, jun **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 ;
- Glacière.

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
- Osiris

3-Consommables :

- Eppendorfs
- Micropipette de 1 ml
- Micropipette de 15 µl
- Micropipette de 100 µl
- Pipettes Pasteur
- Anse de platine
- Boîtes de pétri carrées de 12 cm
- Boîtes de pétri de 9 cm
- Tubes pour PCR
- Ecouillons stériles
- Bandelettes E test[®]

→ Disques d'antibiotiques :

- Ampicilline (10 µg)
- Amoxicilline / acide clavulanique (20µg+10µg)
- Mécillinaam (10 µg)
- Ticarcilline (75 µg)
- Pipéracilline (10 µg)
- Cefazoline (30 µg)
- Céfalexine (30 µg)
- Céfoxitine (30 µg)
- Ceftazidime (30 µg)
- Céfépime (30 µg)
- Céfuroxime (30 µg)
- Céfotaxime (30 µg)
- Aztréonam (30 µg)
- Latamoxef (30 µg)
- Imipénème (10 µg)
- Gentamicine (10 U)
- Amikacine (30 µg)
- Nétilmicine (30 µg)
- Kanamycine (30 UI)

- Isépamicine (30 µg)
- Furanes (300 µg)
- Acide nalidixique (30 µg)
- Ciprofloxacine (5 µg)
- Evofloxacine (5 µg)
- Tétracycline (30 UI)
- Chloramphénicol (30 µg)
- Sulfonamides (200 µg)
- Triméthoprim (5 µg)
- Cotrimoxazole (23,75 / 1,25)
- Colistine (10 µg)
- Fosfomycine (200 µg)

→ **Milieux de culture** : (la formule figure en annexe 2)

Eau peptonée tamponnée (EPT)

Tryptone sel eau (TSE)

Milieu de Rapid' *E. coli* (REC2)

Tampon phosphate salin (PBS+Tween)

Mac Conkey Sorbitol (SMAC)

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

Galerie API 20 E

Mueller-Hinton Agar (MH) :

Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)

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)

Tampon Tris Acétate EDTA (TAE)

→ **Réactifs**

Réactif de Kovacs

VPI et VPII

TDA

Huile de vaseline

Amorces ou primers spécifiques des gènes à tester (Applied Biosystems).

Marqueur de taille moléculaire 100 Pb

Désoxynucléotides triphosphate (dNTP) (Amersham pharmacia biotech).

Tampon Flexi Buffer (vert) 5x pH :8,5 (Promega).

Magnesium chloride solution (25 mM) (Promega).

Taq polymerase (Go taq Flexi DNA polymerase) (Promega).

→ **Matériel biologique :**

Souche de référence : ATCC 25922

Annexe 2

Formule des milieux de culture

Eau peptonée tamponnée (EPT) :

Formule pour un litre d'eau distillée :

Peptone.....	10 g
NaCl.....	5 g
Phosphate disodique (Na ₂ PO ₃).....	3,5g
Phosphate dihydrogéné de potassium (KH ₂ PO ₃).....	3,5g

pH= 7,26 ± 0,2 à 25°C

Tryptone sel eau (TSE) :

Formule pour un litre d'eau distillée :

Tryptone.....	1 g
NaCl.....	8,5g

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 ± 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 HPO..... 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 boites 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 lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) :

Peptone.....	10 g
Lactose.....	10 g
Bile de bœuf déshydraté.....	20 g
Vert brillant.....	0,013 g
Eau.....	1000ml

pH final= 7,4 ± 0,2

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 + 1litre d'eau distillée

Tableau 14 : Table de MAC CRADY (3tubes par dilution)

Nombre caractéristique	Nombre de microbes
000	0
001	0, 3
010	0, 3
011	0, 6
020	0, 6
100	0, 4
101	0, 7
102	1, 1
110	0, 7
111	1, 1
120	1, 1
121	1, 5
130	1, 6
200	0, 9
201	1, 4
202	2, 0
210	1, 5
211	2, 0
212	3, 0
220	2, 0
221	3, 0
222	3, 5
223	4, 0
230	3, 0
231	3, 5
232	4, 0
300	2, 5
301	4, 0
302	6, 5
310	4, 5
311	7, 5
312	11, 5
313	16, 0
320	9, 5
321	15, 0
322	20,0
323	30,0
330	25,0
331	45,0
332	110,0
333	114,0

Annexe 3

Figures montrant les risques des contaminations croisées entre les deux espèces bovine et ovine, ainsi des carcasses au niveau de l'abattoir d'El Harrach.



Photo personnelle 19: Transport des bovins et des ovins dans le même camion



Photo personnelle 20: Concentration des bovins et des ovins dans un même enclos
au niveau de l'abattoir



Photo personnelle 21: Risque de contamination des carcasses par les ovins non encore abattus se trouvant à proximité



Photo personnelle 22: Souillure de la carcasse par les matières fécales

Résumé :

Depuis leur première description, les souches d'*Escherichia coli* O157:H7 et autres *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont connues pour être les principaux agents infectieux responsables des diarrhées hémorragiques. Ces *E. coli* produisent une ou plusieurs Shiga-toxine (Stx) d'où leurs nom *E. coli* producing Shiga-toxine (STEC). Entre 5 et 10% des personnes infectées, particulièrement les jeunes enfants et les personnes âgées développent une complication sévère, le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ce syndrome est caractérisé par une anémie, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë, avec un taux de létalité compris entre 2 et 7% et des séquelles à long terme comme des lésions rénales (insuffisance rénale chronique). Les bovins et autres ruminants représentent le réservoir principal des STEC et de nombreuses épidémies ont été associées à la consommation de la viande de bœuf et au lait cru. La présente étude a eu pour objectif de rechercher les STEC O157:H7 à partir de carcasses ovines au niveau de deux abattoirs de la wilaya d'Alger (Rouiba et El Harrach), de confirmer leur virulence, et de tester leur sensibilité aux antibiotiques. Au cours de la même étude, un dénombrement des germes indicateurs d'hygiène a été réalisé. Cent cinquante et une (151) carcasses ovines ont été écouvillonnées par une méthode non destructive reposant sur le double écouvillonnage (humide/sec). L'isolement d'*E. coli* O157:H7 a nécessité une étape d'enrichissement non sélectif suivie d'une étape d'immuno-concentration des bactéries par la technique de séparation immuno-magnétique (IMS), puis un isolement des bactéries sur gélose CT-SMAC. La présence de l'antigène somatique O157 et de l'antigène flagellaire H7 à partir des colonies suspectes isolées a été confirmée par le test d'agglutination au latex anti-O157 et celui de l'antisérum H7. La confirmation de la virulence des souches d'*E. coli* O157:H7 isolées a été obtenue par amplification génique (PCR). Le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes thermotolérants a été réalisé respectivement sur gélose Rapid *E. coli* 2 et sur bouillon lactosé bilié au vert brillant. La présence des *Escherichia coli* O157:H7 a été mise en évidence sur onze carcasses ovines sur les 151 testées soit une prévalence de 7,26 %. Neuf provenaient de l'abattoir d'El Harrach et deux de l'abattoir de Rouiba. A partir des onze carcasses positives, treize souches d'*E. coli* O157:H7 ont été isolées : dix souches sont sorbitol et β -glucuronidase négatives et trois souches sont sorbitol et β -glucuronidase positives. Parmi elles, quatre souches présentent le pathotype *eae stx2 ehxA*, une souche le pathotype *eae stx1 ehxA*, une souche le pathotype *eae ehxA stx-*, trois souches le pathotype *eae stx2*, et trois souches le pathotype *eae- stx2*. Seule une souche ne possède aucun gène codant pour les facteurs de virulence. Trois souches sont résistantes à la tétracycline, une souche aux furanes et une souche à la fois aux furanes et à la tétracycline. Huit souches sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Les résultats des dénombrements des *E. coli* et des coliformes thermotolérants réalisés sur cinquante carcasses ovines abattus au niveau de l'abattoir d'EL Harrach, plus important en nombre d'abattages, ont montré de mauvaises pratiques d'abattage- habillage dans cet abattoir. La présence de STEC O157:H7 potentiellement pathogènes a été confirmée au niveau des carcasses ovines produites dans les abattoirs de la région d'Alger, ce qui présente un danger pour le consommateur. De ce fait, des mesures correctives ainsi que la mise en place de plans de surveillance des agents pathogènes au niveau du secteur de la production des viandes sont recommandées.

Mots clé : STEC, *E. coli* O157:H7, gènes codant pour les facteurs de virulence, carcasses ovines, écouvillonnage, sensibilité aux antibiotiques, abattoirs, hygiène.

Summary:

Since they were first described, *Escherichia coli* O157: H7 and other related enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) have become known as a major infectious cause of bloody diarrhea. These *E. coli* produce one or more shiga-toxins (stx) hence their name *E. coli* producing Shiga-toxine (STEC). Between 5% and 10% of infected people, particularly young children and elderly people, develop a severe complication, the haemolytic uraemic syndrome (HUS). HUS is characterized by anaemia, a low platelet count, and renal failure, with a case fatality rate of between 2% and 7% and a rate of long-term sequel, such as renal impairment. The main reservoir for STEC is cattle and other ruminants, and many outbreaks have been associated with beef products and raw milk. The present study aims to research the STEC O157: H7 from sheep carcasses in two slaughterhouses of Algiers wilaya (Rouiba and El Harrach), to confirm their virulence, and their sensitivity to antibiotics. During the same study, an enumeration of germs health indicators has been realized. One hundred and fifty-one (151) sheep carcasses were swabbed by nondestructive method based on double swabbing (wet / dry). *E. coli* O157: H7 isolation has needed a non selective enrichment followed by an immuno-concentration by immuno-magnetic separation (IMS) technique, then isolation on CT-SMAC agar. The somatic antigen O157 and flagellar antigen H7 presence in isolated suspected colonies was confirmed by the agglutination test latex anti-O157 and that of antiserum H7. The confirmation of *E. coli* O157: H7 strains virulence isolated was obtained by gene amplification (PCR). The *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms enumeration was performed respectively on Rapid *E. coli* 2 agar and brilliant green bile broth. *Escherichia coli* O157: H7 has been detected on eleven sheep carcasses from 151 tested (7.26%). Nine were from El Harrach slaughterhouse and two from Rouiba slaughterhouse. Thirteen strains of *E. coli* O157: H7 have been isolated from the eleven positive carcasses: ten strains are negative sorbitol and β -glucuronidase and three strains are positive sorbitol and β -glucuronidase. Among them, four strains present *eae stx₂ ehxA* pathotype, and one present *eae stx₁ ehxA* pathotype, one present *eae ehxA stx-* pathotype, three present *eae stx₂* pathotype, and three strains present *eae- stx₂* pathotype. Only one strain has no gene coding for the virulence factors. Three strains are resistant to tetracycline, one strain to furans and one strain both to furans and tetracycline. Eight strains are sensitive to all tested antibiotics. *E. coli* and thermotolerant coliforms counting carried on 50 sheep carcasses slaughtered at El Harrach abattoir with higher slaughtering rate, showed the poor practices of slaughtering- dressing in the slaughterhouse. The presence of STEC O157: H7 potentially pathogen has been confirmed on sheep carcasses produced in Algiers region slaughterhouses, which presents a danger to the consumer. Thus, remedial measures and pathogens monitoring plans establishment at level of meat production sector are recommended.

Key words: STEC, *E. coli* O157: H7, virulence genes, sheep carcasses, swab, sensitivity to antibiotics, slaughterhouses, hygiene.

ملخص:

منذ وصفهم لأول مرة، تعتبر سلالة *E. coli* O157 : H7 وغيرها من *E. coli* المتسببة في النزيف المعوي (EHEC) من العوامل المعدية الرئيسية المسؤولة عن الإسهال النزيفي، هذه السلالات من *E. coli* بإمكانها إنتاج نوع أو أكثر من الشيجا السمية (STX) لذا لقيت بـ *E. coli* المنتجة لشيجا السمية (STEC)، ما بين 5 و 10 % من الأشخاص المصابين لا سيما الأطفال و كبار السن يتعرضون إلى تعقيدات صحية خطيرة كـ SHU الذي يتميز بفقر في الدم، انخفاض في الصفائح الدموية و الفشل الكلوي الحاد الذي بإمكانه أن يتطور إلى القصور الكلوي المزمن و يقدر معدل الوفيات بـ 2 إلى 7 %، تعد الأبقار و غيرها من الحيوانات المجترة الخزان الرئيسي للكثير من STEC و تسبب استهلاك لحوم البقر و الحليب الخام إلى ظهور الكثير من الأوبئة.

هذه الدراسة تهدف إلى البحث عن STEC O157:H7 في هياكل الأغنام المذبوحة في مذبحين بولاية الجزائر (الروبية، الحراش)، وتأكيد قدرتها الممرضة ومدى حساسيتها للمضادات الحيوية، وخلال الدراسة نفسها، تم حساب الجراثيم الدالة على النظافة. 151 هيكل أغنام تم مسحها بطريقة غير تدميرية: المسح المزدوج (رطب/جاف). عزل *E. coli* تطلب إجراء عملية إنماء غير انتقائي تليه مرحلة تركيز مناعي للبكتيريا بواسطة طريقة الفصل المناعي المغناطيسي ثم العزل بواسطة وسط جيلوزي (هلامي) CT. SMAC. وجود مولد الضد السوماتيكي O157 ومولد الضد السوطي 7 H في الخلايا المشتبهة المعزولة تم تأكيده بواسطة اختبار التلازن باللصق ل O157 و المصل المضاد ل H 7. تأكيدات القدرة الممرضة لجرثومة O157 : H7 المعزولة تم بواسطة تضخيم الجينات (PCR). تعداد اشيرشيا *coli* والكوليفورم المحتملة للحرارة (ترموتوليرون) تم على التوالي بواسطة وسط *Rapid E. coli* ووسط BLBVB. تم العثور على *E. coli* O175 : H7 في إحدى عشر هيكل أغنام من بين 151 مفحوصة (7.26 %)، تسعة منها مصدرها مذبح الحراش واثنين من مذبح الروبية. من بين أحد عشر هيكلًا إيجابيًا تم عزل ثلاث عشرة سلالة من *E. coli* H 175 : O عشر سلالات كانت سوربيتول و

β -غلوكورونيداز سلبي، و 3 سلالات كانت سوربتول و β -غلوكورونيداز إيجابي. من بينها، أربع سلالات أظهرت باطوتيب *eae stx₂ ehxA* واحدة أظهرت باطوتي *eae stx₁ ehxA*، واحدة أظهرت باطوتيب *eae stx- ehxA*، ثلاث سلالات أظهرت باطوتيب *eae stx₂* وثلاث سلالات أظهرت باطوتيب *eae- stx₂* وسلالة واحدة فقط لم تظهر أي مورثة رامزة للعوامل الممرضة. ثلاث سلالات كانت مقاومة للنتريكيلين، واحدة للفيورينات، وواحدة لكليهما، وكانت ثمان سلالات حساسة لجميع المضادات الحيوية المختبرة. نتائج عد *E. coli* والكوليفورم المحتملة للحرارة المنجز على 50 هيكل أغنام مذبوحة في مذبح الحراش ذو وتيرة الذبح العالية أظهرت سوء عملية الذبح في المسلخ. تم التأكد من وجود STEC O157 : H7 في هياكل الأغنام في مسالخ الجزائر العاصمة مما يشكل خطرا على صحة المستهلك ويستلزم اتخاذ تدابير علاجية فضلا عن إنشاء مخطط مراقبة الجراثيم المسببة للأمراض على مستوى قطاع إنتاج اللحوم.

الكلمات الأساسية:

STEC, *E. coli* O157 : H7، المورثات، هياكل الأغنام، المسح، الحساسية نحو المضادات الحيوية، المسالخ، النظافة.