

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Saad Dahlab-Blida

Faculté des sciences agrovétérinaires et biologiques

Département de biologie

Mémoire

**En vue de l'obtention du diplôme de master en Sciences de
la nature et de la vie**

Filière Biologie

Option : Microbiologie Bactériologie

Thème :

**Caractérisation d'Escherichia Coli O 157 en élevages
laitiers de la wilaya de Blida**

Présenté par : M. MADANI Abdeldjalil

Devant le jury composé de :

M. HAMAIDI M.S.	MCA	USDB	président
M. MOHAMED SAID R.	MAA	USDB	examineur
Mme. AMAROUCH N.	MAA	USDB	examinatrice
Mme. BAAZIZE-AMMI D.	MAA	USDB	promotrice
Pr. GUETARNI D.	Professeur	USDB	co-promoteur

Promotion 2012

Remerciements

Je remercie en premier lieu mon encadreur, Mme. BAAZIZE AMMI D., pour tout le savoir qu'elle m'a dispensé durant ces deux dernières années de travail, et surtout de la confiance qu'elle m'a accordé dans un thème relativement difficile à traiter.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Mr. GUITARNI Djamel, mon professeur et co-promoteur pour son aide très précieuse.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens à remercier Mme. LASSAS, Directrice du laboratoire de microbiologie du CHU de Boufarik, sans laquelle l'antibiogramme n'aurait jamais pu être fait.

Sans oublier de remercier Mr. KHECHNA, Directeur du CHU Ferroudja, ainsi que Mme. OULDROUIS, Docteur en mycologie, pour l'aide qu'ils m'ont proposé.

Ainsi que Mme. SABABOU, Biologiste au laboratoire du CHU de Boufarik, pour son aide à finaliser mon travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements à tous les enseignants qui ont accepté de m'apporter leurs aide par des conseils et des prestations de documents et références bibliographiques, et en particulier mes professeurs de l'université de Blida.

Dédicaces

A mes parents avant tout, ma famille et mes proches, pour tous leurs sacrifices, la détermination ainsi que l'abnégation qu'ils ont su m'inculquer durant toutes mes années d'études.

A Kheir-Eddine, Fella-Aïda, Ilyes Adel, Anfel, Walid-Zitouna, Rédhouane, Ryad, Mehdi et Abdou qui à chaque moment étaient présents quand le moral n'était pas au rendez-vous, à Chahinez, Mouloud et Lâarbi pour leurs encouragements.

A mes collègues de laboratoire karima et ouahiba pour leur sympathie.

A Imad, Yacine et Adel, Nadia, Lotfi-bou et tous mes autres collègues vétérinaires.

A Moh et Lotfi, docteur Jo, Omar, Fayçal, Djaafar, mamadou et toute la bande de biologie.

Sans oublié Yacine, Mélissa, Yasmine, Louiza et Chahra et Amine.

A tous mes camarades, et tous ceux de la faculté des sciences agrovétérinaires de l'université de Blida qui me connaissent de près ou de loin.

Abdeldjalil

Abréviations

A/E : lésions attachement effacement

AAC : Aminoside acétyltransférase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse

eae : *E.coli* attaching and effacing

EAEC : *E. coli* entéroaggrégatifs

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques

E-hlyA : entérohémolysine A

EIEC : *E. coli* entéroinvasifs

EPEC : *E. coli* entéropathogènes

ETEC : *E. coli* entérotoxinogènes

Gb3 : globotriosyl céramide

IMS : immuno-magnétique séparation

KatP : catalase peroxydase périplasmique

LEE : Locus d'Effacement des Entérocytes

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLP : protéines liant la pénicilline

pO157 : plasmide du sérotype O157

PTT : Purpura Thrombotique et Thrombocytopenique

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

SLT: Shiga-like toxines

SMAC: mac-conkey au sorbitol

STEC: Shiga-toxin-Producing *E. coli*

Stx : Shiga-like toxin

stx1 : gène codant pour la toxine shigatoxine 1

Stx1: Shigatoxine 1

stx2 : gène codant pour la toxine shigatoxine 2

Stx2: Shigatoxine 2

VTEC : verotoxin-producing *E. coli*

Résumé

Parmi les souches d'*Escherichia coli* productrices de Shigatoxines (STEC), le sérotype O157:H7 est le plus communément retrouvé en clinique humaine mais d'autres sérogroupes sont de plus en plus incriminés lors d'épidémies.

Notre étude a porté sur 30 échantillons de culots issus de fèces, appartenant à des bovins laitiers de la wilaya de Blida testés positifs aux gènes *stx* par PCR.

Les résultats obtenus ont permis l'isolement après immuno-concentration et identification biochimique (galerie API 20^E) de 64 souches d'*Escherichia coli* avec 14 profils biochimiques.

L'identification sérologique n'a révélée aucune souche appartenant au séro groupe O157 et l'étude de la sensibilité des souches caractérisées aux antibiotiques testés n'a montré aucune résistance.

Mots clés : *Escherichia coli*, STEC, Séro groupe O157, Bovin, fèces,

Sommaire

Etude bibliographique

Introduction générale

Chapitre I : Taxonomie et pouvoir pathogène des Escherichia coli enterohémorragiques

I-1 Caractères généraux.....	2
I-2 L'espèce <i>E.coli</i>	3
I-3 Les différents pathovars d' <i>E.coli</i>	3
I-4 Facteurs de virulence des EHEC	5
I-4-1 Les Shiga-toxines	6
I-4-2 Les facteurs d'adhésion	7
I-4-3 Les facteurs plasmidiques	8
I-4-4 Autres facteurs	8

Chapitre II : Clinique et épidémiologie des EHEC

II-1 Aspects cliniques des affections liées aux EHEC	9
II-2 Epidémiologie	10
II-2-1 Principales épidémies	10
II-2-2 Réservoirs	11
II-2-3 Modes de transmission	12

Chapitre III : Antibiotiques et antibiorésistance

III-1. Généralités sur les antibiotiques	14
III-1-1 Définition	14
III-1-2 Classification	14
III-2 Résistance aux antibiotiques	16
III-3 Résistance des entérobactéries	16

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel	21
1-1 Les échantillons	21
1-2 Matériel non biologique	21
1-2-1 Kit de séparation immuno-magnétique	21
1-2-2 Galeries biochimiques	22
1-2-3 Kit de séro-agglutination	22
1-2-4 Matériel utilisé pour l'antibiogramme	23
1-2-5 Petit matériel et équipements de laboratoire	23
2. Méthodes	24
2-1 Séparation immuno-magnétique	24
2-2 Identification	26
2-3 Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques	29
3. Résultats	32
4. Discussions	35
Conclusions	37
Références	38
Annexes	44

Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Vernozy-Rozand et Montet, 2001).....	7
Figure 2 : Lésions d'attachement-effacement induites par une souche <i>E. coli</i> O157:H7 sur des cellules rectales de mouton (Wales <i>et al.</i> , 2001).....	7
Figure 3 : Flux potentiel des STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre les réservoirs que peuvent représenter les animaux d'élevages et l'homme (AFSSA, 2003)...	13
Figure 04 : Dispositif Dynal MPC-M.....	19
Figure 05 : Réactifs Dynabeads anti- <i>E.coli</i> O157.....	19
Figure 06 : Mixer type Coulter.....	19
Figure 07 : Kit DIAGNOSTIC REAGENTS <i>E. coli</i> O157 Latex Test.....	20
Figure 08 : Etapes de l'immuno-concentration.....	22
Figure 09 : Culture après 24h.....	23
Figure 10 : Test de l'oxydase.....	24
Figure 11 : Inoculation de la galerie.....	25
Figure 12 : Résultat après 24h.....	25
Figure 13 : Séro-agglutination d' <i>E. coli</i> O157.....	26
Figure 14 : dépôt des disques d'antibiotiques.....	27
Figure 15 : Culture après 24h.....	27

Liste des tableaux

Tableau I : principaux critères différentiels des espèces du genre <i>Escherichia</i> (Grimont, 1987).....	2
Tableau II : les principales épidémies à EHEC survenues depuis 2006 (Brugere et al., 2012).....	10
Tableau III : les différentes familles d'antibiotique et leur mode d'action avec spectre d'activité (Andre et al., 1998)	15
Tableau IV : classification des entérobactéries selon leurs résistances aux β -lactamines (Philippon, 2006).....	17
Tableau V : Liste des antibiotiques utilisés.....	20
Tableau VI : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour les <i>Entérobactéries</i>	28
Tableau VII : Isolats obtenus après culture sur gélose Mc Conkey.....	29
Tableau VIII : résultats des galeries API classés selon les profils biochimiques.....	30
Tableau IX : Répartition des souches en fonction de leur statut vis-à-vis des antibiotiques testés.....	31

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), considérés comme des pathogènes émergents importants pour la santé publique, ne sont connus que depuis 1982, date à laquelle *E. coli* O157 : H7 a été isolée pour la première fois lors d'épidémies de colites hémorragiques aux Etats-Unis liées à la consommation d'hamburgers contaminés. Mis en cause dans plusieurs épidémies ou cas sporadiques au Canada, au Japon, en Afrique et en Europe lors de la consommation d'aliments contaminés d'origine animale (viande hachée, lait et fromages au lait cru...). La consommation de fruits et légumes, l'ingestion d'eau contaminée, le contact avec les animaux et leur environnement ainsi que la transmission inter-humaine sont d'autres modes de transmission de ces infections à l'Homme (Gacem, 2013).

Plusieurs sérotypes associés aux STEC ont été recensés mais le sérotype O157:H7 demeure le plus dominant aux États-Unis, au Canada, au Japon, au Royaume-Uni et également en France.

Les bovins, principaux réservoirs de STEC dans leur tube digestif, sont des porteurs sains et participent à la contamination de l'environnement et à la transmission de ces pathogènes à l'Homme (ANSES, 2011). A travers le monde, le taux de portage des STEC O157 chez les bovins varie de 0,2 à 48,8% et de 0,4 à 75% pour les souches non-O157 (Hussein, 2005).

En Algérie, le portage asymptomatique des STEC et plus particulièrement du sérotype O157 :H7 ainsi que leur implication en tant que pathogènes sur la santé sont méconnus. Très peu de travaux ont rapporté leur présence sur des denrées alimentaires (Chahed, A. 2006 ; Ferhat, L. 2008 ; Barka, M. S. et kihel, M. 2010).

Le présent travail est une continuité de l'enquête préliminaire, portant sur la Caractérisation moléculaire des Shigatoxines en élevages laitiers, réalisée dans le cadre d'un mémoire de Master en "Sciences de la Nature et de la Vie", filière : "Biologie", option : "Génétique et Physiologie" par GACEM (2013) qui a montré que les gènes *stx* sont présents dans les échantillons fécaux de bovins laitiers au taux de 30,5% ; les objectifs ciblés dans cette étude se résument à l'isolement d'*Escherichia coli* après immuno-concentration et à l'identification sérologique (sérotype O157) des échantillons testés positifs par PCR pour les gènes *stx1* et *stx2*.

CHAPITRE I

TAXONOMIE ET POUVOIR PATHOGENE DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES

I.1. Caractères généraux :

C'est en 1885 que le pédiatre allemand Théodore Escherich isole et décrit pour la première fois le bacille *Bacterium coli commune*, fréquemment présent dans les selles des nourrissons. En 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli* (Grimont, 1987).

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* qui regroupe des espèces fréquemment isolées du tube digestif ou des fèces des mammifères. La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe des bacilles droits à Gram négatif, non acido-résistants, mesurant de 0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 1,0 à 6,0 µm de long. Non sporulés, parfois capsulés. Chimio-organotrophes, ils sont aéro-anaérobies, et possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif. Ils fermentent le glucose (avec ou sans production de gaz), et sont catalase positifs, oxydase négatifs, nitrate réductase positifs. Ces bacilles sont capables de croître sur des milieux ordinaires. (Euzéby, 2007).

En plus de l'espèce *E. coli*, le genre *Escherichia* comprend cinq autres espèces : *E. albertii*; *E. blattae* ; *E. fergusonii* ; *E. hermannii* et *E. vulneris* (Euzéby, 2007).

Tableau I : principaux critères différentiels des espèces du genre *Escherichia* (Grimont, 1987).

Caractéristiques	<i>E.coli</i> non O157 :H7	<i>E.coli</i> O157 :H7	<i>E.hermanii</i>	<i>E.vulneris</i>	<i>E.fergusonii</i>
Indole	+	+	+	-	+
Pigment jaune	-	-	+	(+)	-
LDC	(+)	(+)	-	+	+
ODC	+/-	+/-	+	-	+
B-xylosidase	-	-	-	+	-
B-glucuronidase	(+)	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	+

(+), positif avec la majorité des souches ; +/-, positif ou négatif selon les souches, LDC, Lysine Décarboxylase ; ODC, Ornithine Décarboxylase.

I.2. L'espèce *E.coli* :

Escherichia coli fait partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de la plupart des animaux à sang chaud. Elle colonise de façon asymptomatique le tractus digestif des nouveau-nés dans les premières heures qui suivent la naissance et constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin, de plus, cette bactérie est bénéfique par son apport en vitamine K.

Cependant, dès 1885, Escherich la soupçonne d'être impliquée dans l'apparition d'entérites. En 1945, Bray démontre que certaines épidémies de diarrhées chez les enfants, non associées à *Salmonella* ou à *Shigella*, ont pour origine des souches de *E. coli*. En 1947, les travaux de Kauffmann permettent de distinguer les différentes souches de *E. coli* dont les pathogènes responsables d'entérites grâce à leurs antigènes de surface.

Le sérotype de la souche est défini par l'antigène de paroi lipopolysaccharidique « O » (plus de 170 antigènes décrits) et au sein d'un même sérotype, le sérotype est déterminé par l'identification du flagelle de nature protéique « H » (plus de 50 antigènes décrits) et éventuellement de l'antigène capsulaire polysaccharidique « K » (Grimont, 1987).

Escherichia coli, et plus largement les coliformes thermo-tolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournit ainsi l'indication d'une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive comme *Salmonella typhimurium*.

I.3. Les différents pathovars d'*E.coli* :

➤ **ETEC** : Enterotoxigenic *E. Coli*

Sont une cause majeure de diarrhée infantile dans les pays en voie de développement. Ils sont aussi responsables de la « diarrhée des voyageurs ». Les ETEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle suite à l'action d'adhésines fimbriaires. Des entérotoxines thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT) provoquent une diarrhée aqueuse (Duniere, 2012).

Parmi les sérotypes les plus fréquents on trouve le O6 :H16 le O8 :H9 et le O11 :H27 (Blanco et al, 2005).

➤ **EIEC** : Enteroinvasive *E. coli*

Elles provoquent des diarrhées aqueuses évoluant rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Les EIEC sont très proches des Shigelles et possèdent une

stratégie d'infection similaire (Kaper, Nataro et Mobley, 2004), Les EIEC pénètrent les entérocytes du colon, provoquent la lyse de la vésicule d'endocytose et se multiplient, provoquant la mort cellulaire. Elles sont capables de se mouvoir dans le cytoplasme et de pénétrer ensuite dans la cellule adjacente (Duniere, 2012).

Les sérotypes les plus fréquents appartiennent aux sérogroupes O28, O112, O124, O136, O143, O144, O173 (Blanco et al, 2005).

➤ **EAEC** : Enteroaggregative *E. coli*

Ils entraînent un retard de croissance, des infections urinaires et des diarrhées persistantes dans les pays en développement et les pays industrialisés (Amieva, 2005). Ils se caractérisent par une adhésion agrégative, entraînant des nécroses à l'apex des villosités. Et par une entérotoxine qui agit sur les cellules intestinales en perturbant le cytosquelette et les mécanismes de sécrétion (Nataro and Kaper, 1998 ; Amieva, 2005).

➤ **DAEC** : Diffusely adherent *E. coli*

Les DAEC provoquent des diarrhées (aqueuses, éventuellement associées à du mucus) chez les jeunes enfants, et des infections urinaires (Nataro et Kaper, 1998). L'adhésine fimbriale et des protéines de la membrane extérieure codées par la bactérie sont à l'origine d'une adhésion diffuse. Cette adhésine se lie à une protéine de surface des entérocytes de l'intestin grêle.

➤ **EPEC** : Enteropathogenic *E. coli*

Les EPEC sont le principal agent causal de gastro-entérites chez les enfants de moins de 3 ans, avec une fréquence de 30% dans les pays en développement. Ils provoquent des lésions caractérisées par l'effacement des microvillosités intestinales et l'adhérence des bactéries via une protéine membranaire (l'intimine) à la membrane cytoplasmique des entérocytes ces lésions sont appelées lésions d'attachement/effacement (lésions A/E). Le principal gène de virulence responsable de ces lésions est le gène *eae* qui code l'intimine (Senerwa, Olsvik et al. 1989; Amieva 2005 ; Nataro et Kaper. 1998).

Les sérotypes les plus importants des EPEC sont : O55:[H6], O86:H34, O111:[H2], O114:H2, O119:[H6], O127:H6, O142:H6, O142:H34 (Blanco et al, 2005).

➤ **EHEC** : Enterohemorrhagic *E. coli*

Décrits pour la première fois en 1982, lors de deux épidémies survenues aux États-Unis (dans l'Oregon puis dans le Michigan) suite à la consommation d'hamburgers contaminés et

insuffisamment cuits (Riley et al, 1983). Dénommées *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) suite au tableau cliniques présenté par les patients atteints.

Ils sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voir à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique et Thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (Riley et al,1983).

Les EHEC se caractérisent par la production de toxines dénommées toxines Stx (Shiga-like toxin). Ces toxines ont été décrites pour la première fois en 1977 et étaient alors nommées vérotoxines en raison de leur toxicité sur les cellules Véro, cellules épithéliales rénales du singe vert d'Afrique (*Cercopithecusaethiopsabaeus*) (Konowalchuk, Speirs et Stavric, 1977). Quelques années plus tard, O'Brien *et al.* (1983) démontrent que l'effet cytotoxique de ces vérotoxines peut être neutralisé par un sérum dirigé contre la Shiga-toxine produite par *Shigella dysenteriae* sérotype 1 et renomment donc ces toxines « Shiga-like toxines ».

Les EHEC appartiennent au groupe des STEC (Shiga-toxin-Producing *E. coli*) qui est représenté par l'ensemble des souches d'*Escherichia coli* possédant au moins un gène *stx*, les EHEC représente le groupe de bactéries pathogènes au sein des STEC (Vimont 2007).

Actuellement, le groupe des STEC contient plus de 2000 sérotypes différents qui ont été isolés chez l'homme, l'animal, dans la nourriture, l'eau ou l'environnement (Mora, Blanco et al. 2005).

Le sérotype le plus étudié, et aussi le plus fréquemment retrouvé lors d'infections dues a des STEC est *E. coli* O157:H7. Mais plus de 100 sérotypes de STEC non-O157 sont également connus pour être pathogènes : O26:H11, O91:H10, O103:H2, O111:H8, pour n'en citer que quelques uns (Hussein, 2005).

I.4. Facteurs de virulence des EHEC :

Avant de citer les principaux facteurs de virulence on doit rappeler que la dose infectieuse pour les *E.coli* appartenant aux sérogroupe O157 est très minime, estimée a moins de 100 organismes dans l'étude de (Willshaw et al, 1993). Contrairement aux infections aux EPEC qui elles ont besoin d'un inoculum de $>10^8$ organismes pour produire une infection expérimentale chez des adultes (Law, 2000)

I.4.1. Les Shiga-toxines :

Les EHEC sont caractérisées par leur capacité à produire une ou plusieurs cytotoxines capables de tuer *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique). Ces toxines, qui étaient dénommées auparavant verotoxines, sont actuellement regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (SLT), étant donné leurs homologues avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (O'Brien et al, 1982; Strockbine et al, 1988).

a. Structure :

Ce sont des hétéropolymères de 70kDa constitués d'une sous-unité A (pour Activity) de 33kDa et de 5 sous-unités B (pour binding) de 7,7 kDa qui permet l'attachement au récepteur Gb3. La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase qui entraîne un arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible infectée (Gannon et al, 1990).

b. Mécanismes d'action :

Dans une première étape, il y a fixation à la membrane cytoplasmique de la cellule cible : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3 (galactose- α (1-4), galactose- β (1-4) glucosyl-céramide) (Lingwood et al, 1987). Une fois la toxine internalisée par endocytose, elle subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont disulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme, exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S, bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea et al, 1999), ce qui conduit à un arrêt des synthèses protéiques et à la mort cellulaire. Les récepteurs Gb3 se trouvent à la surface des cellules épithéliales de la microcirculation sanguine, notamment au niveau rénal et cérébral (AFSSA, 2003).

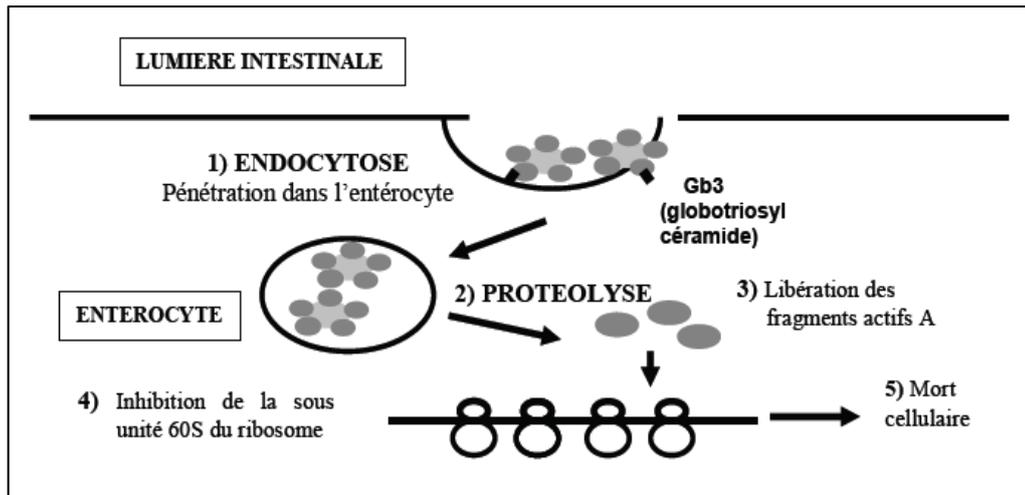
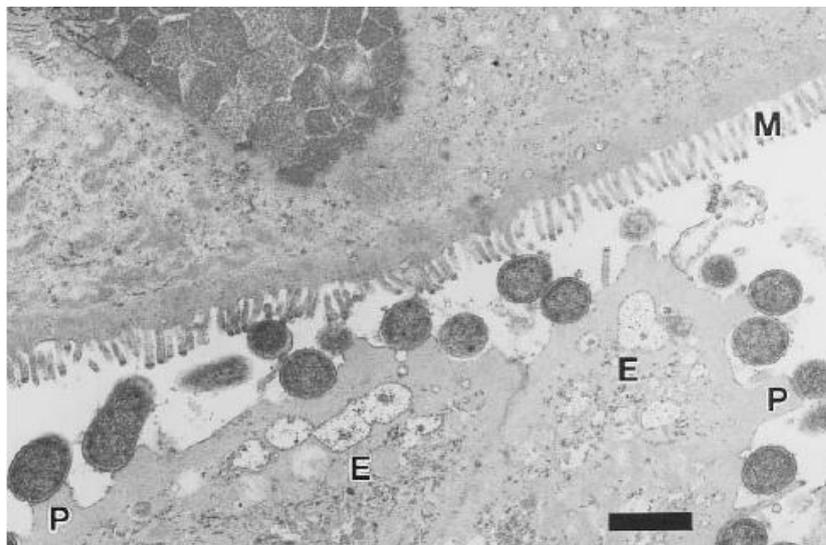


Figure 2 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

I.4.2. Les facteurs d'adhésion :

La colonisation du tube digestif par certaines souches de EHEC s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites lésions d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum (Donnenberg et *al.*, 1993). Ces lésions se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal (Ismaili et *al.*, 1995) et un réarrangement pour former un piédestal sur lequel les bactéries viennent se lier de façon étroite. Le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales seraient à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections.



Les bactéries adhèrent à la surface des entérocytes (E). Les microvillosités sont effacées et certaines bactéries sont sur un piédestal (P). La bordure en brosse normale est présente (M) sur les entérocytes adjacents non colonisés

Figure 3 : Lésions d'attachement-effacement induites par une souche *E. coli* O157:H7 sur des cellules rectales de mouton (Wales et *al.*, 2001).

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Le LEE est notamment caractérisé par un système de sécrétion de type III (Jarvis et Kaper, 1996), par le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) codant une protéine de membrane externe appelée intimine (Jerse et al., 1991) impliquée dans l'effacement des microvillosités et par le gène *tir* codant le corécepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor).

I.4.3. Les facteurs plasmidiques :

a. L'entérohémolysine :

L'entérohémolysine E-hlyA a été mise en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin et al, 1988). Son mécanisme d'action est comparable à celui de l' α -hémolysine. Son activité cytotytique est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane cytoplasmique et à sa capacité à former des pores, engendrant ainsi une lyse osmotique des cellules (Soloaga et al, 1999). Son rôle est de stimuler le développement des bactéries grâce au fer libéré suite à la lyse des hématies.

b. Autres facteurs plasmidiques :

D'autres facteurs plasmidiques pourraient jouer un rôle dans la virulence :

Une sérine protéase EspP capable de cliver le facteur V de coagulation humain (Brunner et al, 1997). La dégradation du facteur V contribuerait au développement des colites hémorragiques observées chez les patients. Une catalase peroxydase périplasmique KatP de 82 kDa, ainsi que des toxines de type *Clostridium difficile*-like (Burland et al., 1998).

I.4.4. Autres facteurs de virulence :

- L'entérotoxine EAST1 a été mis en évidence chez plusieurs souches de STEC (Iyoda et al., 2000). Elle pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.
- La capacité à survivre dans des aliments acides tels que la mayonnaise, le jus de pomme, la viande (Abdul-Raouf et al., 1993). Par un système oxydatif, un système arginine-dépendant et un système glutamate-dépendant (Price et al., 2000).qui ont été mis en évidence chez *E.coli* O157 ; H7.

CHAPITRE II

CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS A EHEC

II.1. Aspects cliniques des affections liées aux EHEC :

L'essentiel des signes cliniques est lié à la production des toxines Stx. Cependant, le processus infectieux est multifactoriel et dépend à la fois de facteurs bactériens et de facteurs liés à l'hôte (Paton et Paton, 1998).

Tous les groupes d'âge peuvent être infectés par une souche EHEC bien que les enfants de moins de 5 ans et les personnes de plus de 65 ans soient plus sensibles et plus gravement touchées. La sensibilité aux Shiga-toxines est influencée par plusieurs facteurs tels que : l'état de santé, le nombre de récepteurs aux toxines Stx et les traitements médicaux suivis (Vernozy et Montet, 2001).

Les EHEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant et le sujet âgé, ou purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Tarr et *al.*, 2002).

En 1985 Karmali et *al.* (1985) ont établi pour la première fois la relation entre une infection intestinale à STEC et la survenue d'un SHU. Les signes biologiques sont toujours une anémie hémolytique microangiopathique (altération des petits vaisseaux sanguins ou des capillaires), une thrombocytopénie (raréfaction du nombre de plaquettes sanguines), et une insuffisance rénale aiguë. L'apparition du SHU se fait en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs pour environ 10 % des personnes ayant déclaré une diarrhée sanglante (Heuvelink, 1999). Le SHU typique, ou SHU post-diarrhée, représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et représente la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson. Une atteinte d'autres organes (pancréas, système nerveux central) peut également être observée. Elle est due à la présence de récepteurs Gb3 à la surface de ces cellules (Loirat et *al.*, 1992). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause de décès (Decludt et *al.*, 2000).

Comme pour le SHU, l'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, auto-immune...), et la relation entre l'infection par *E. coli* O157:H7 et l'apparition de ce syndrome a été démontrée par Kovacs et *al.*, (1990). Le PTT touche essentiellement l'adulte. On

considère le PTT comme étant une forme clinique plus large que le SHU, avec fièvre et troubles neurologiques.

II.2. Epidémiologie :

II.2.1. Principales épidémies :

Les principales récentes épidémies sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau II : les principales épidémies à EHEC survenues depuis (Brugere et al., 2012)

Sérogroupe/sérotype	Pays (année)	Mode de transmission	Nombre de cas
O104:H4 stx2	France (2011)	Alimentaire (graines germées de fenugrec)	15
O104:H4 stx2	Allemagne (2011)	Alimentaire (graines germées de fenugrec)	3 816
O145:H28 stx1 eae	Norvège (2009)	Personne à personne (crèche)	16
O157	Angleterre (2009)	Contact avec des animaux de ferme (ferme pédagogique)	36
O157: H- stx1 stx2 eae	Pays-Bas (2008-2009)	Alimentaire (viande de bœuf crue)	20
O157	États-Unis (2008)	Alimentaire (viande de bœuf)	99
O111	États-Unis (2008)	Alimentaire (aliment non précisé)	341
O157:H-	États-Unis (2008)	Alimentaire (lait cru)	14
O157:H-	États-Unis (2007)	Contact avec des animaux de ferme (ferme pédagogique)	7
O157:H- stx1 stx2 eae	Pays-Bas; Islande (2007)	Alimentaire (salade verte)	50
O26:H11 stx1 stx2 eae	Danemark (2007)	Alimentaire (saucisse de viande bovine biologique)	20
O26 stx2 eae / O145 stx1 eae	Belgique (2007)	Alimentaire (glace au lait pasteurisé)	12
O157 stx1 stx2	Angleterre (2007)	Alimentaire (sandwich au poulet et herbes)	12
O157:H7 stx2	États-Unis (2006)	Alimentaire (salade verte)	77
O157:H7 stx1 stx2	Japon (2006)	Contact avec des animaux de ferme (ferme laitière)	4
O157:H7 stx2	États-Unis (2006)	Alimentaire (épinards)	205

II.2.2. Réservoirs :

Les études d'épidémiologie analytique ont permis d'identifier les réservoirs des souches EHEC pathogènes pour l'homme tels que :

- **Les bovins :**

Les bovins sont considérés comme étant les principaux réservoirs de souches STEC, en particulier de souches STEC O157. La présence de STEC chez les bovins a été démontrée dans le monde entier. Le pourcentage de bovins porteurs de STEC O157 varie entre 0,2 et 48,8% et entre 0,4 et 75% pour les souches non-O157 (Hussein, 2005). En Europe, le pourcentage de bovins porteurs de STEC varie entre 2,8% (Royaume-Uni) et 75% (Norvège) avec une moyenne européenne de 15,6%. Quant au seul sérotype O157, le pourcentage de bovins porteurs varie entre 0,2% (France) et 16,6% (Italie) avec une moyenne de 4,1%. La grande disparité des résultats obtenus tient à l'existence de facteurs de variation liés à la fois aux caractéristiques des animaux étudiés et aux méthodes d'échantillonnage et de détection utilisées. Les estimations obtenues pourraient être biaisées et sont, en l'absence de protocole standardisé, difficilement comparables (Loukiadis, 2007).

Chez les bovins le portage et l'excrétion de souches EHEC sont asymptomatiques. Néanmoins, d'autres souches STEC, présentes chez les animaux de boucherie, ne présentent pas systématiquement toutes les caractéristiques requises pour être pathogènes chez l'homme et aucun critère fiable ne permet de distinguer ces souches STEC non pathogènes pour l'homme, des souches EHEC (Beutin et al., 2005).

- **Autres ruminants domestiques :**

Des souches STEC, appartenant au sérotype O157 mais aussi à d'autres sérotypes associés à la maladie chez l'homme tels que O5, O6, O75, O91, O128 ou O146, ont été fréquemment mis en évidence dans les fèces des ovins du monde entier et dans certains pays, comme l'Australie, cette espèce est même considérée comme le principal réservoir de souches STEC.

- **Réservoir environnemental :**

Il est difficile d'évaluer la prévalence et la survie des souches EHEC dans l'environnement. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de protocole standardisé de dépistage des souches EHEC dans les matrices environnementales. Par ailleurs, ces souches sont souvent difficiles à dénombrer dans ces matrices, car présentes en faible quantité et parfois sous forme viable mais non cultivable (Muniesa, 2006).

II.2.3. Modes de transmission :

Les infections humaines par des souches EHEC peuvent avoir pour origine la consommation d'aliments contaminés, la transmission inter-humaine, l'ingestion d'eau contaminée ou le contact avec des animaux (notamment les bovins). Ces différents modes de transmission ont fait l'objet de nombreuses études et ont été estimés respectivement à 66%, 20%, 12% et 2% aux Etats-Unis (Loukiadis, 2007).

- **Transmission alimentaire :**

La majorité des épidémies recensées à ce jour est liée à l'ingestion de denrées animales ou d'origine animale contaminées par des souches EHEC. La viande de bœuf insuffisamment cuite constitue la principale source de contamination cependant d'autres sources ont été à l'origine d'épidémies comme les produits laitiers et les légumes crus (Loukiadis, 2007).

- **Transmission inter-humaine :**

Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire. La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. Le manque d'hygiène et les contacts étroits favorisent ce mode de transmission. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches ou les centres de soins journaliers (Dunier, 2012).

- **Transmission hydrique :**

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. Entre 1971 et 2000, des souches d'*E. coli* pathogènes étaient retrouvées dans 6% des épidémies dues à l'ingestion d'eau de

boisson contaminée au USA (Craun et al., 2005). Au Canada une épidémie d'infection à *E. coli* O157:H7 à fait plus de 2 300 malades en Mai 2000 suite à la consommation d'eau de boisson (Hrudey et al., 2003).

• **Transmission par contact avec un animal porteur ou son environnement :**

La transmission de souches EHEC par contact direct ou indirect avec les animaux de ferme ou leurs déjections a été à l'origine d'infections humaines sporadiques mais également d'épidémies (Caprioli et al., 2005). Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a été à l'origine d'épidémies à *E. coli* O157:H7, durant des événements en plein air, tels que des festivals ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (Ogden et al., 2002).

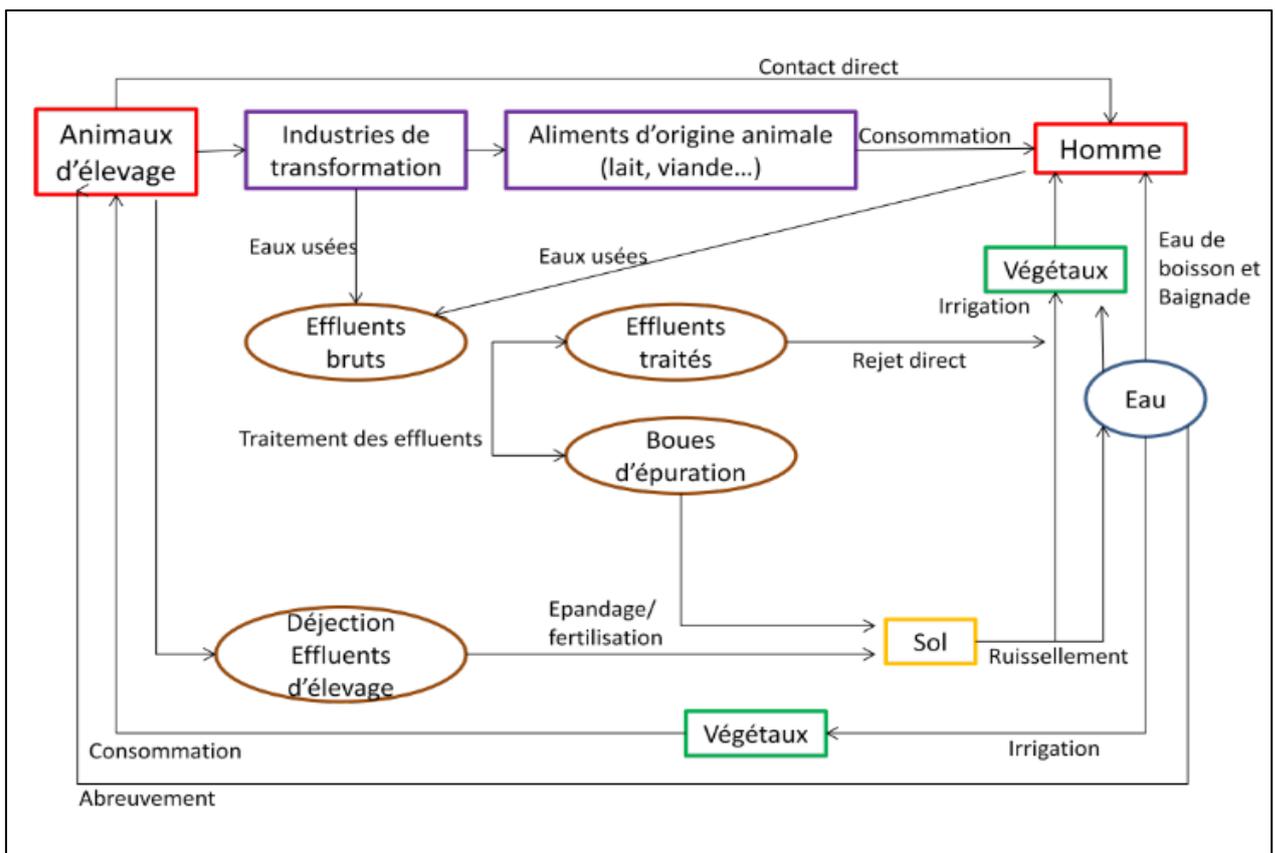


Figure 4 : Flux potentiel des STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels de STEC entre les réservoirs que peuvent représenter les animaux d'élevages et l'homme (AFSSA, 2003).

CHAPITRE III ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE

III.1. Généralités sur les antibiotiques :

Après la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming et la streptomycine par Selman Waksman, et les résultats miraculeux que ces molécules pouvaient apporter à la médecine dans les années 40. Tout le monde les considéra dès lors comme étant des produits miracles. Mais par la suite, l'utilisation croissante et abusive des antibiotiques, non seulement en médecine humaine et vétérinaire a contribué à la sélection de bactéries résistantes voire multi-résistantes aux antibiotiques qui aujourd'hui sont un vrai cauchemar pour la médecine actuelle (Roy, 1997).

III.1.1 Définition :

Du grec (*anti*, contre et *bios*, vie), ce sont des produits microbiens ou leurs dérivés, capables de tuer les microorganismes sensibles (action bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (action bactériostatique), on peut aussi les désigner par agents antimicrobiens. (Prescott et al., 2008) Actuellement autre que les antibiotiques naturels on peut trouver des agents semi-synthétiques et synthétique d'origine non microbienne.

Les antibiotiques varient dans leur champ d'efficacité. Beaucoup sont des antibiotiques à spectre étroit, c'est-à-dire qu'ils ont une efficacité limitée à une variété restreinte de microorganismes. D'autres ont un large spectre et attaquent de nombreux types d'agents pathogènes différents (Prescott et al., 2008).

III.1.2 Classification :

La classification des antibiotiques prend en charge plusieurs critères de différenciation parmi les quels on trouve : la nature biochimique, le mode d'action et le spectre d'activité. Le prochain tableau nous résume les principales familles d'antibiotiques ainsi que leurs modes d'action et leurs spectres d'activité.

Tableau III : les différentes familles d'antibiotique et leur mode d'action avec spectre d'activité (Andre et al., 1998)

Famille	Mode d'action	Principaux groupes ou antibiotiques	Spectre (général)
Acide fusidique	Inhibition de la synthèse des protéines	Acide fusidique	Étroit
Aminosides	Inhibition de la synthèse des protéines	Amikacine, Apramycine, Isépanicine, Streptomycine, Nétilmicine, Tobramicine, Gentamicine	Large
Bêta-lactamines	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Groupe de la pénicilline G, Pénicillines anti-staphylococciques (méthicilline, oxacilline), Amidinopénicillines, Monobactams Céphalosporines de 1 ^{ère} génération (cephalothin)	Étroit
		Aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), Carboxypénicillines, Uréido-pénicillines, Penems et Carbapenems, Céphemés et oxacéphemés Céphalosporines de 2 ^{ème} (cefamandole, cefuroxime, cefoxitin) 3 ^{ème} (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et 4 ^{ème} (cefipime) génération	Large
		Pénicillines-sulfones, Clavams ou oxapénams	Large
Fosfomycine	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Fosfomycine	Large
Glycopeptides	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Teicoplanine, Vancomycine	Étroit
Imidazolés	Coupage des brins d'ADN et déroulement de l'ADN	Métronidazole, Ornidazole	Étroit
Lincosamides	Inhibition de la synthèse des protéines	Clindamycine, Lincomycine	Étroit
Macrolides et kétolides	Inhibition de la synthèse des protéines	Érythromycine, Azithromycine, Dirithromycine, Clarithromycine Telithromycine	Étroit
Nitrofuranes	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Furaltadone, Furazolidone	Large
Novobiocines	Inhibition de la réplication de l'ADN	Novobiocine	Étroit
Oxazolidinones	Inhibition synthèse protéique	Linezolid	Large
Phénicolés	Inhibition de la synthèse des protéines	Chloramphénicol	Large
Polypeptides	Action sur la membrane externe des Gram-	Polymyxine B, Colistine, Bacitracine, Tyrocidine	Étroit
Quinolones et fluoroquinolones	Inhibition de la synthèse de l'ADN	Acide calidixique, Acide oxolinique, Acide piromidique	Étroit
		Ciprofloxacine, Enoxacine, Ofloxacine, Sparfloxacine	Large
Sulfamides	Blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique	Sulfadiazine, Sulfadoxine, Sulfaméthoxydiazine, Sulfaméthoxazole	Large
Streptogramines	Inhibition de la synthèse des protéines	Pristinamycine, Virginiamycine Synercid	Étroit
Tétracyclines	Inhibition de la synthèse des protéines	Chlortétracycline, Doxycycline, Minocycline	Large
Fifamycines	Blocage de la synthèse des ARN messagers	Rifamycine SV, Rifaximine	Étroit
		Ripampicine	Large

III.2. La résistance aux antibiotiques :

Il existe deux types de résistances :

- Naturelle : existence d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance innée, donc propre à l'espèce bactérienne. Elle intervient dans la définition du spectre d'action d'un antibiotique ()
- Acquisie : acquisition d'un mécanisme de résistance par une souche d'une espèce habituellement sensible. Cette résistance est due à une mutation spontanée ou à un transfert horizontal de gènes de résistance qui ont eux même plusieurs origines et plusieurs modalités de transfert (plasmides, transposons, phages) (Philippon, 2008).

III.3. Résistance des entérobactéries :

a. Vis-à-vis des β -lactamines :

Les β -lactamines sont les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité et à leur pouvoir bactéricide. Cependant, les entérobactéries hébergent naturellement et ont acquis des résistances limitant leur activité.

Le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux β -lactamines est la production de β -lactamases. Elle est observée naturellement dans la plupart des espèces.

Les entérobactéries ont été classées en 5 groupes vis-à-vis de leur résistance aux β -lactamines comme le montre le tableau suivant.

Tableau IV: classification des entérobactéries selon leurs résistances aux β -lactamines (Philippon, 2006)

Principales bactéries	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Antibiotiques	<i>E.coli</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>Salmonella sp</i> <i>Shigella sp</i>	<i>K.pneumoniae</i> <i>K.oxytoca</i> <i>E.hernannii</i> <i>L.malonatica</i>	<i>C.freundii</i> <i>E.cloacae</i> <i>E.aerogenes</i> <i>M.morganii</i>	<i>Y.enterocolitica</i> <i>S.fonticola</i>	<i>P.vulgaris</i> <i>P.pemneri</i> <i>K.ascorbat</i> <i>K.georgiana</i>
Amoxicilline	S	R	I/R	R	R
+ Acide clavulanique	S	S	I/R	R	S
Ticarcilline	S	R	S	R	R
+ Acide clavulanique	S	S	S/I	S	S
Piperacilline	S	S	S	S	S
+ Tazocilline	S	S	S	S	S
Mecillinam	S	S	S/I		
Cefalotine	S	S	I/R	R	I/R
Cefamandole	S	S	S/I	S	I/R
Cefuroxime	S	S	I/R	S/I	I/R
Cefoxitine	S	S	S/I/R	I	S
Ceftazidime	S	S	S	S	S
Cefotaxime	S	S	S	S	S
Ceftriaxone	S	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	S	S
Imipeneme	S	S	S	S	S
Meropeneme	S	S	S	S	S

b. Vis-à-vis des aminosides :

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides qui agissent en inhibant les synthèses protéiques. La famille est très riche en composés, mais un nombre restreint de molécules est utilisé en thérapeutique comme la gentamicine et l'amikacine.

Les entérobactéries sont naturellement sensibles aux aminosides sauf :

- *Providencia* spp. : résistance naturelle à la gentamicine, la tobramycine et la nétilmicine par production d'une AAC
- *Serratia marcescens* AAC=Aminoside acétyltransférase.

c. Vis-à-vis des quinolones :

Pour les entérobactéries, la résistance est essentiellement liée à des mutations de la cible de l'antibiotique : l'ADN gyrase. Ce qui leur confère une résistance variable aux quinolones de première et de deuxième génération (Allouch, 1995).

PARTIE EXPERIMENTALE

La présente étude a porté sur la caractérisation d'*Escherichia coli* O157 chez les vaches laitières testées positives pour les gènes des Shigatoxines par PCR. Pour répondre à cet objectif, nous avons adopté une démarche basée sur trois volets, à savoir :

1. L'isolement de la bactérie par séparation immuno-magnétique (IMS).
2. L'identification biochimique et sérologique.
3. L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.

MATERIEL ET METHODES

Cadre de l'étude

L'étude s'est déroulée durant la période de mai 2012 à septembre 2013. Les analyses microbiologiques ont été réalisées au laboratoire de recherche du département de Biologie, faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques, université Saad Dahleb Blida ainsi que le laboratoire de Bactériologie du CHU de Boufarik.

1. MATERIEL :

1.1. Prélèvements :

Notre étude a porté sur un échantillon de 30 culots issus de fèces, appartenant à des bovins laitiers testés positifs par PCR pour les gènes des Shigatoxines, traités par filtration, lavage au PBS et centrifugation et conservés par congélation.

1.2. Matériel non biologique :

1.2.1. Kit de séparation immuno-magnétique (IMS) (Invitrogen Dynal Norway) :

Nous avons utilisé le kit Dynabeads anti-*E. coli* O157 comportant :

- Le dispositif Dynal MPC-M comportant un portoir muni d'une paroi à aimant concentrateur.
- Le réactif 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).

- Le Mixer type Coulter.



Figure 04 : Dispositif Dynal MPC-M



Figure 05: Réactifs Dynabeads anti-E.coli O157



Figure 06 : Mixer type Coulter

1.2.2. Galeries biochimiques

Nous avons utilisé les galeries biochimiques type API 20^E.

Système d'identification des *enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés.

1.2.3. Kits de séro-agglutination

Nous avons utilisé le kit DIAGNOSTIC REAGENTS *E. coli* O157 Latex Test (OXOID) qui contient :

- Le réactif à base de particules de latex bleues sensibilisées par des anticorps de lapin dirigés contre l'antigène somatique O157 : Réactif test DR 621M.
- Le réactif à base de particules de latex bleues sensibilisées par des immunoglobulines de lapin non spécifiques : réactif de contrôle DR 622M.
- Le réactif à base d'*E. coli* O157 inactivé : réactif de contrôle positif DR 623M.
- Le réactif à base d'*E. coli* O116 inactivé : réactif de contrôle négatif DR 624M.

- Les cartes tests DR 50 OG.



Figure 07: Kit DIAGNOSTIC REAGENTS *E. coli* O157 Latex Test

1.2.4. Matériel utilisé pour l'étude de la sensibilité des souches d'*E. coli* aux antibiotiques (antibiogramme) :

Pour la réalisation de l'antibiogramme, nous avons utilisé une gamme de onze (11) antibiotiques conditionnés sous formes de disques d'un diamètre de 9mm chacun (Cf. tableau V) ainsi qu'un densitomètre.

Tableau V : Liste des antibiotiques utilisés

Antibiotiques	Abréviations	Concentration (charge des disques)
Cefoxitin	Fox	30µg
Amikacin	AK	30µg
Ampicillin	AMP	10µg
Cefotaxime	CTX	30µg
Gentamicin	CN	10ug
Trimethoprim-sulfamethoxazole	SxT	25µg
Ticarcillin	TC	75µg
Nalidixic Acid	NA	30µg
Ticarcillin-clavulanic acid	TiM	85µg
Chloramphenico	C	30µg
Céphalotine	KF	30µg

1.2.5. Petit matériel et équipements de laboratoire :

Nous avons utilisé les équipements du laboratoire de microbiologie. Les appareils, les réactifs ainsi que les milieux de cultures sont rapportés en annexe 01.

2. METHODES :

2.1. Séparation immuno-magnétique (IMS) : Immuno-concentration.

L'immuno concentration comporte les étapes suivantes :

a. Enrichissement :

Ajoutez 10ml du bouillon Trypticase soja au culot issu de fèces et incuber à 37°C pendant 6 heures.

b. Immuno concentration :

1. Charger le dispositif Dynal MPC-M avec les tubes Eppendorf identifiés.
2. Transférer stérilement 15µl du réactif Dynabeads anti-*E. coli* O157 dans chaque tube Eppendorf.
3. Ajouter 1ml de la suspension mère pré-enrichie dans chaque tube Eppendorf puis vortexer (Cf. figure 09a et 09b).
4. Placer les tubes Eppendorf dans le mixer Coulter et laisser sous agitation rotative lente pendant 30 minutes pour une bonne homogénéisation (Cf. figure 09c).
5. Placer à nouveau les tubes Eppendorf dans le dispositif Dynal MPC-M et remuer pendant 2 à 3 minutes jusqu'à ce qu'une tache brune se forme sur la paroi des tubes (Cf. figure 09d).
6. Vider aseptiquement le contenu des tubes sans léser la tache formée, ajouter 1ml du tampon de lavage PBS-Tween. Vortexer et remettre les tubes dans le dispositif Dynal MPC-M.
7. Remuer à nouveau le dispositif Dynal MPC-M pendant 2 à 3 minutes jusqu'à ce qu'une autre tâche se forme sur la paroi, et éliminer le contenu ;
8. Répéter les opérations 6 et 7 ;
9. Débarrasser le dispositif Dynal MPC-M de sa paroi à aimant et rajouter dans chaque tube Eppendorf 100µl de tampon PBS-Tween, puis vortexer.

La suspension de complexe billes-bactéries ainsi obtenue servira pour l'isolement sur la gélose Mac conkey sorbitol (SMAC).

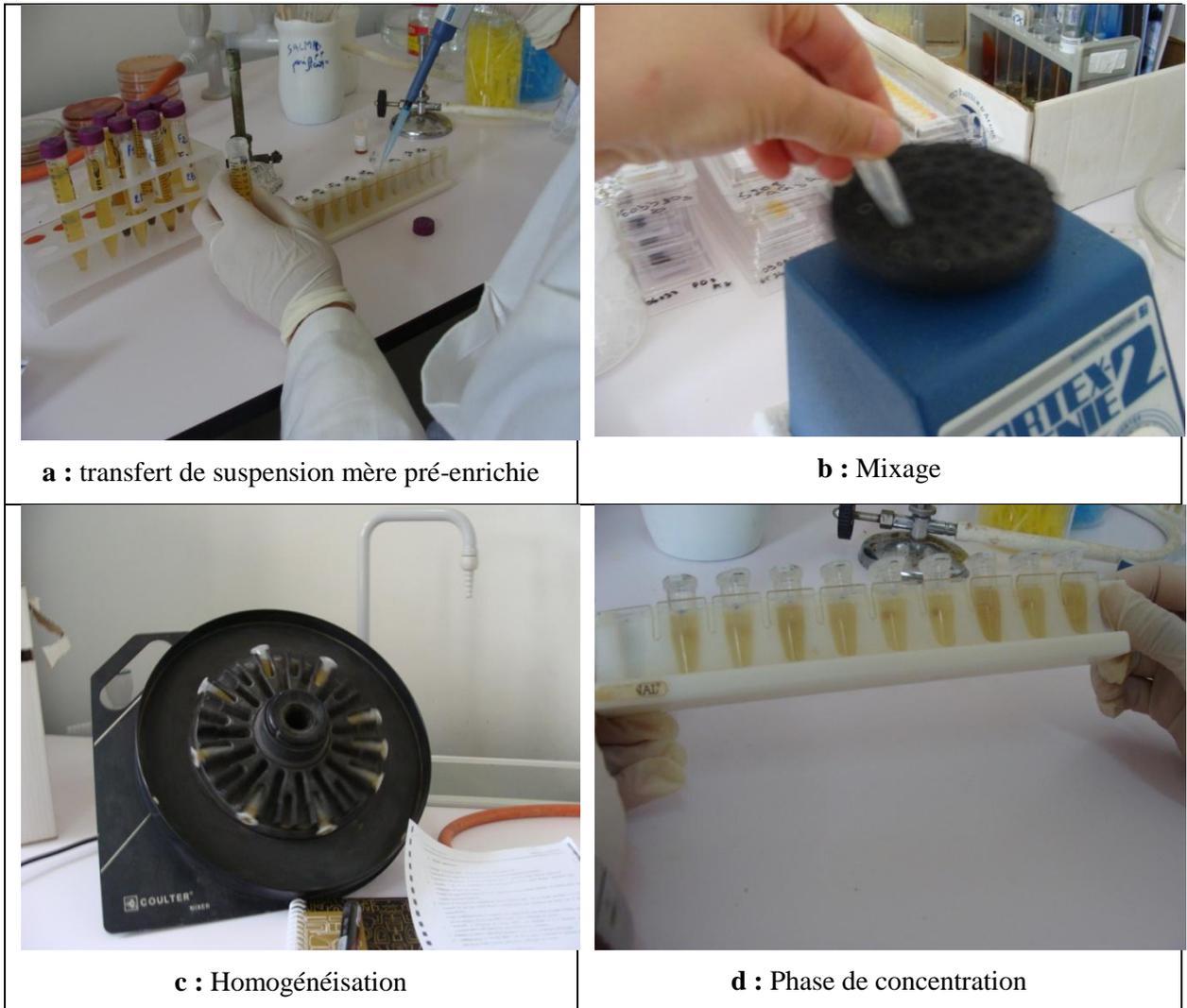


Figure 08 : Etapes de l'immuno-concentration

c. Isolement :

Prélever stérilement 10 μ l et 15 μ l de la suspension obtenue, étaler respectivement sur deux boîtes de gélose Mac conkey sorbitol (SMAC) et mettre en incubation à 37°C pendant 24h.

Lecture : Deux types de colonies peuvent être isolées : celles apparaissant de couleur rougeâtre qui se caractérisent par la fermentation du sorbitol (Sorbitol positive) et celles apparaissant de couleur blanchâtre qui se caractérisent par la non fermentation du sorbitol (Sorbitol négative).

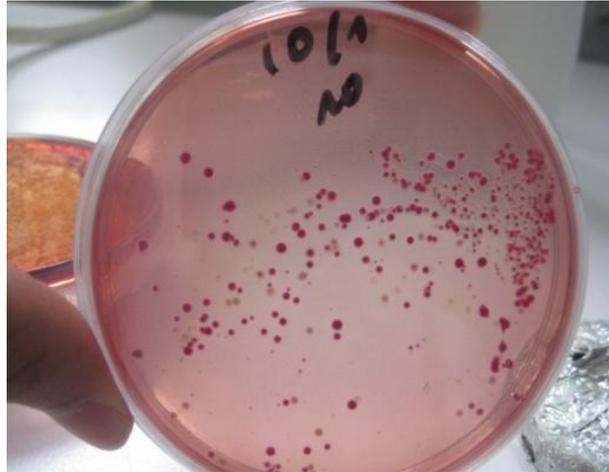


Figure 09 : Culture après 24h.

d. Purification :

A partir des boîtes de culture, nous avons prélevé pour purification :

- Quatre colonies à partir des boîtes ne comportant qu'un seul type de colonie (soit sorbitol positive, soit sorbitol négative) ;
- Trois colonies de chaque type (sorbitol positive et sorbitol négative) à partir des boîtes comportant les deux types de colonies.

Il est à noter que chaque colonie a été ensemencé sur une boîte de gélose TSA ou gélose nutritive et mise en incubation à 37°C pendant 24h.

2.2. Identification :

A partir de chaque boîte de culture (culture pure), nous avons réalisé systématiquement :

- a. Une orientation de l'identification par la coloration de Gram et la recherche d'oxydase suivie d'une identification biochimique préliminaire au moyen d'une mini galerie basée sur la recherche de :
 - la production de sulfure d'hydrogène et la fermentation du lactose du saccharose et de D-glucose (milieu TSI),
 - l'uréase, le tryptophane désamylase (T.D.A) et la production d'indole (Bouillon urée indole),
 - la β galactosidase (disque ONPG).
- b. Une identification biochimique au moyen de la galerie API^E.
- c. Une identification sérologique.

2.2.1. Orientation de l'identification :

- **Recherche de l'oxydase :**

Déposer sur une plaque d'oxydase (DrySlide™, Becton Dickinson) un fragment de chaque colonie à tester et lire immédiatement la réaction. S'il n'y a pas de changement de couleur, la bactérie appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*.

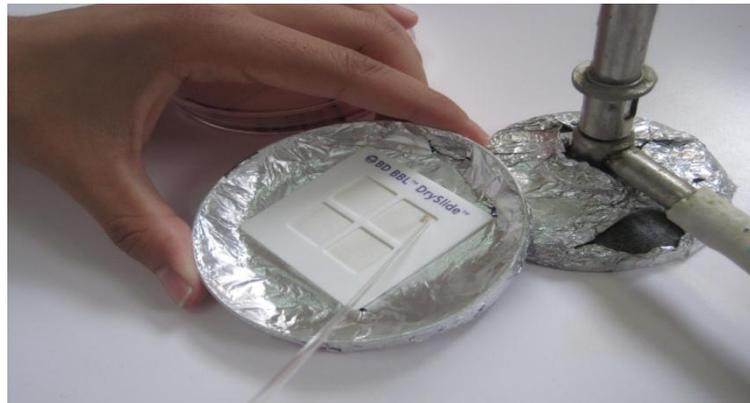


Figure 10 : Test de l'oxydase

- **Mini galerie biochimique :**

- **Milieu Tri Sugar Iron (TSI) :**

Ensemencer, à l'aide d'une pipette pasteur, le milieu en tube par piqûre centrale et la pente par stries. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

Lecture :

- Le changement de couleur du culot au jaune traduit la fermentation du glucose.
- Le changement de couleur de la pente au jaune traduit la fermentation du saccharose et du lactose.
- L'absence de précipité noir traduit une non production d'H₂S.
- La présence de bulles d'air et/ou de fissures dans le milieu traduit la production de gaz.

- **Bouillon urée-indole**

Ensemencer, à partir d'une suspension bactérienne préalablement préparée le milieu en tube. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

Lecture :

- En premier lieu, vérifier s'il y a un changement de couleur qui traduit une uréase positive.
- En deuxième lieu, répartir le milieu dans deux tubes distincts, puis :

- ✓ Ajouter dans le premier tube quelques gouttes du réactif TDA et voir s'il y a apparition d'une coloration brune traduisant une réaction positive.
- ✓ Ajouter dans le second tube quelques gouttes du réactif de Kovacs et voir s'il y a apparition d'un anneau rouge traduisant une réaction positive.

○ **Réaction O.N.P.G :**

Introduire un disque d'O.N.P.G dans 3 ml de la suspension bactérienne et incuber à 37°C pendant 24 heures.

Lecture : Le changement de couleur vers le jaune traduit une réaction positive.

2.2.2. Identification biochimique avec galerie Api 20 E :

- Préparation de la galerie : identification
- Préparation de l'inoculum et ensemencement : réalisation d'une suspension bactérienne dans de l'eau distillée selon la densité correspondante ; procéder ensuite à l'ensemencement et suivre les étapes prescrites dans la notice accompagnant les galeries utilisées.
- Incubation à 37°C pendant 24h
- Lecture de la galerie :
 - Lecture macroscopique des puits de la galerie.
 - Lecture numérique à l'aide du logiciel d'identification Apiweb™



Figure 11 : Inoculation de la galerie



Figure 12 : Résultat après 24h

2.2.3. Identification sérologique :

La réaction de séro agglutination d'*E. coli* O157 a été réalisée comme suit :

- Après avoir ramené à la température ambiante les réactifs, déposer une goutte de latex test sur un cercle de la lame de réaction près du bord du cercle et ajouter une goutte de solution saline tout en s'assurant que le latex et la solution saline ne se mélangent pas.
- Prélever une partie de la colonie à tester et l'émulsionner dans la solution saline de façon à obtenir une suspension homogène.
- Mélanger la suspension et le latex test en couvrant toute la surface du cercle de réaction.
- Imprimer à la lame un mouvement de rotation et observer l'agglutination qui doit apparaître en une minute maximum (cas positif).
- Si aucune agglutination n'est observée, tester une autre colonie.
- Si on obtient une agglutination, tester cette colonie avec le latex de contrôle pour s'assurer que la souche n'est pas auto-agglutinable.

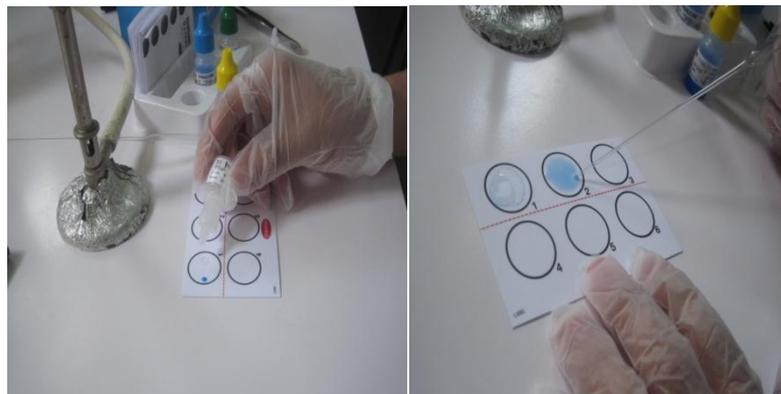


Figure 13 : Séro-agglutination d'*E. coli* O157.

2.3. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques :

L'antibiogramme a été réalisé sur vingt souches de l'ensemble des souches d'*E. coli* identifiées.

Les souches isolées et identifiées ont été revivifiées par culture sur boîtes de gélose nutritive incubées à 37°C pendant 24h.

- Réaliser une suspension de 0.5 Mc Farland à partir de chaque souche à tester.
- Ensemencer à l'aide d'un écouvillon imbibé de la suspension la gélose Mueller Hinton.

- Déposer les disques d'antibiotiques à tester et incuber à 37°C pendant 24h (Cf. figure 15).
- Mesurer au moyen d'un pied à coulisse le diamètre d'inhibition.



Figure 14 : dépôt des disques d'antibiotiques

Lecture et interprétation :

Les zones d'inhibition obtenues (Cf. figure 16) sont mesurées au pied à coulisse et les diamètres enregistrés sont confrontés aux valeurs critiques de chaque antibiotique (Cf. tableau VII).

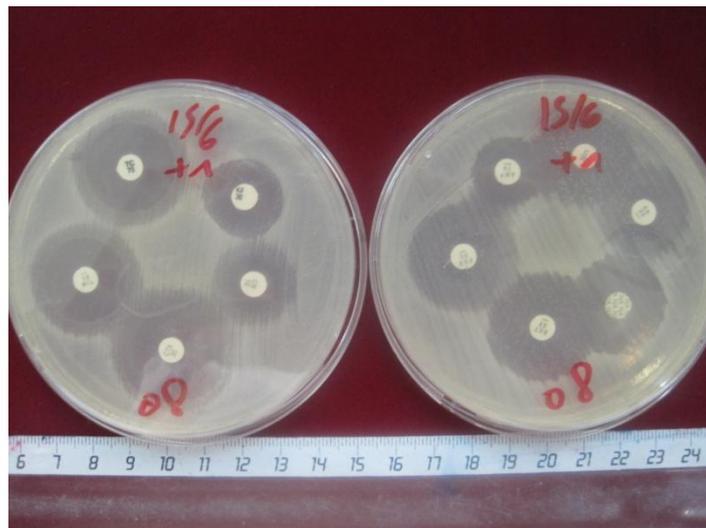


Figure 15 : Culture après 24h.

Tableau VI : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour les *Entérobactéries*.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
Ampicilline	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicilline + acide clavulanique	20/10 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Céfazoline	30 µg	≤ 19	20-22	≥ 23
Céfalotine	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefoxitine	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxime	30 µg	≤ 22	23-25	≥ 26
Ceftriaxone	30 µg	≤ 19	20-22	≥ 23
Imipénème/ Merpénème	10 µg	≤ 19	20-22	≥ 23
Ertapénème	10 µg	≤ 19	20-22	≥ 23
Amikacine	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Acide nalidixique	30 µg	≤ 13	14-18	≥ 19
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Chloramphénicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Furanes	300 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Fosfomycine	200 µg	≤ 12	13-15	≥ 16
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg	≤ 10	11-15	≥ 16

3. RESULTATS :

- **Isolement des souches après immuno-concentration :**

A l'isolement sur gélose Mc Conkey, nous avons obtenu :

- 17 cultures avec un seul type de colonie de couleur rose (sorbitol positive) ;
- 06 cultures avec un seul type de colonie de couleur blanche (sorbitol négative) ;
- 07 cultures avec les deux types de colonies.

Ces cultures ont permis l'obtention de 89 isolats à sorbitol positif et 45 isolats à sorbitol négatif, rapportés dans le tableau ci-dessous..

Tableau VII : Isolats obtenus après culture sur gélose Mc Conkey.

	Colonies isolées (n=134)	
	Nombre	Pourcentage
Isolats à sorbitol (-)	45	33.6%
Isolats à sorbitol (+)	89	66.4%

- **Résultat de l'identification préliminaire :**

Après purification des 134 souches isolées, les tests biochimiques préliminaires (TSI, TDA, urée indole et ONPG) ont permis de les classer en deux catégories :

- 84 souches d'*Escherichia coli* présomptif, soit un taux de 62,68%.
- 50 souches non *Escherichia coli*, soit un taux de 37,32%.

- **Résultats des tests biochimiques par galeries API 20^e :**

L'identification par galerie API 20^E a permis la caractérisation de 64 souches appartenant à l'espèce *Escherichia coli* et 20 souches n'appartenant pas à l'espèce *Escherichia coli*.

Le traitement des résultats de la galerie API 20^E a permis l'obtention de 14 profils biochimiques différents, rapportés dans le tableau ci dessous.

Tableau VIII : résultats des galeries API classés selon les profils biochimiques

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Profil 1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Profil 2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Profil 3	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Profil 4	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Profil 5	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Profil 6	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Profil 7	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Profil 8	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Profil 9	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Profil 10	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Profil 11	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Profil 12	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Profil 13	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
Profil 14	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+

- **Résultats du sérotypage :**

L'ensemble des souches testées (64) n'a donné de séro-agglutination positive avec le sérum anti *E. coli* O157.

- **Résultats de l'antibiogramme :**

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus pour chaque antibiotique testé pour les 20 souches sont rapportés en annexe 02.

Les résultats de la confrontation des diamètres obtenus par rapport aux valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour les souches testées sont rapportés en annexe 03.

La répartition des souches en fonction de leur statut vis-à-vis des antibiotiques testés est rapportée dans le tableau ci-dessous.

Tableau IX : Répartition des souches en fonction de leur statut vis-à-vis des antibiotiques testés.

Antibiotiques testés	Statut des souches					
	Sensible		Intermédiaire		Résistance	
	n	%	n	%	n	%
Cefoxitin	20	100	0	0	0	0
Amikacin	20	100	0	0	0	0
Ampicillin	13	65	7	35	0	0
Cefotaxime	20	100	0	0	0	0
Gentamicin	20	100	0	0	0	0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	20	100	0	0	0	0
Ticarcillin	20	100	0	0	0	0
Nalidixic Acid	20	100	0	0	0	0
Ticarcillin-clavulanic acid	20	100	0	0	0	0
Chloramphenicol	20	100	0	0	0	0
Céphalotine	15	75	5	25	0	0

4. DISCUSSION :

Dans la présente étude, nous avons utilisé une étape d'enrichissement sur milieu non sélectif (TSB pendant 6h) suivie d'une étape d'immunoconcentration d'*E.coli* O157 par la technique de séparation Immuno-magnétique (IMS) puis un isolement sur gélose SMAC.

Le recours à la phase d'enrichissement sur milieu non sélectif pendant 6h est préconisé par ZUTTER et URADZINSKI car une durée plus longue provoque la croissance de la flore compétitive.

Selon VERNOZY-ROZAND (1999), il semblerait que la technique de la séparation immuno-magnétique soit la plus efficace mais cette technique reste très onéreuse aussi bien pour l'acquisition des dispositifs que pour le réactif lui-même.

L'utilisation de la gélose SMAC reste non sélective, bien qu'elle met en évidence la propriété non fermentaire du sorbitol. L'addition du tellurite et du cefixime, quand ils sont disponible, à la gélose SMAC permettrait certes une augmentation du caractère sélectif vis-à-vis des STEC O157 mais aussi le coût du milieu.

A l'isolement sur gélose SMAC, nous avons obtenu 134 colonies morphologiquement typiques d'*Escherichia coli*, mais à l'identification préliminaire 84 souches seulement étaient *E. coli* présomptives. L'usage de la galerie API 20^E a permis la confirmation de 64 souches à l'espèce *Escherichia coli* et leur classement en 14 profils biochimiques différents.

Toutes les souches *Escherichia coli* (64) ne portent pas l'antigène somatique O157. Cela n'exclut nullement la présence d'autres sérotypes STEC parmi ces échantillons.

Après l'épidémie de 1982, la recherche des STEC, par PCR des gènes de virulences (stx1, stx2 ou eae) a été faite dans de nombreux pays à travers le monde (Espagne, France, Suisse, Brésil, Australie). Les taux de portage asymptomatique des STEC obtenus varient entre 2.8% et 95%, respectivement au Royaume-uni et au Brésil (Wray et al., 1993 ; Moreira et al., 2003).

Il est reconnu et établi que le sérotype O157 est l'un des plus virulents des STEC, et le plus fréquemment isolé lors d'épidémies de colites hémorragiques (HC) et de syndrome hémolytique et urémique (HUS). A ce jour, il a fait l'objet de nombreuses études dans le but de mieux connaître les caractéristiques des STEC (Vimont, 2007). Cependant d'autres sérotypes appartenant aux STEC sont de plus en plus isolés à travers le monde, à savoir : O26, O103, O111, O113, O145 et le O148. Ces sérotypes ont également été identifiés comme

responsables d'infections humaines (Huppertz et al., 1996 ; Karch et al., 1997 ; Brooks et al., 2005 ; Espié et al., 2006).

En ce qui concerne le portage asymptomatique du sérotype O157 :H7 ; il est très variable. A titre d'exemple, il a été mis en évidence en Argentine au taux de 0,5% (Lelis et al., 2004) alors qu'en France, selon l'étude de l'AFSSA (2006), il n'a été que de 1,7%. Quoique faible, le portage de ce sérotype dans les fèces bovines a été rapporté par Nastasijevic et al (2008) au taux de 2,8% pour la Serbie. Mais, malgré la présence de tous les gènes de virulence normalement porté par le sérotype O157 ;H7; son absence a été signalé dans les résultats des deux enquêtes menées par Blanco et al en 1996 et en 2005 (Blanco et al., 1997 ; Blanco et al., 2005). Il est clair que les raisons de la variation des taux de portage asymptomatique d'*Escherichia coli* O157 ;H7 ne sont pas toutes connues, mais l'absence de méthodes standardisées pour la recherche de ce dernier peut à elle seule justifier cette variation, en plus de l'existence de périodes d'excrétion des STEC par les bovins à des intervalles inconnus qui peut aussi influencer la recherche des STEC et par là même entraver la mise en évidence du sérotype O157 :H7. Les travaux de Besser et al. (1997) montrent que quoique les niveaux d'excrétion d'*E. coli* O157:H7 chez les bovins sont faibles, des variations brutales du taux d'excrétion sont possibles avec un taux d'excrétion plus important en été qu'en hiver. De plus, selon Smith et al., (2001), l'excrétion d'*E. coli* O157:H7 est plus importante quand les conditions d'hébergement des animaux ne sont pas satisfaisantes et en particulier quand le sol humide avec accumulation de boue et de bouses chez 23% des animaux testés.

Pour ce qui est de l'antibio-résistance, la présente étude a montré qu'aucune souche isolée n'avait de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés. En effet, une étude similaire effectuée dans le sud de la Thaïlande a montré que toutes les souches STEC isolées étaient sensibles aux antibiotiques utilisés (Sukhumungoon et al., 2011). Toutefois, la résistance des STEC aux antibiotiques, particulièrement à la Sulfisoxazole, la tetracycline, la streptomycine et l'acide nalidixique a été rapportée par Azucena et al (2005) ; Midori et al (2012) et Asis Khan et al (2002) avec un taux variable de résistance allant de 22.5% (au japon) à 49.2% (en inde).

Conclusion

La présente étude a permis de mettre en évidence la présence de souches *Escherichia coli* dans les échantillons fécaux de bovins laitiers de la wilaya de Blida. L'identification sérologique de ses souches a révélé qu'elles ne portent pas l'antigène somatique O157. Quoique ce sérotype soit le plus fréquemment isolé lors d'épidémies de colites hémorragiques (HC) et de syndrome hémolytique et urémique (HUS), cela n'exclut nullement la présence des autres sérotypes STEC, identifiés comme responsables d'infections humaines, comme le O26, O103, O111, O113, O145 et le O148 parmi ces échantillons.

Quoique l'ensemble des souches *Escherichia coli* caractérisées se sont révélées sensibles aux antibiotiques testés, ces données ne traduisent pas les risques réels d'un point de vue santé publique. Néanmoins, il est important de déterminer les autres sérotypes de STEC et les facteurs de virulence pour évaluer la pathogénicité de ces souches et leur impact sur la santé humaine.

Références bibliographiques

1. **Abdul-Raouf, U. M., L. R. Beuchat, and M. S. Ammar.** (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl Environ Microbiol* 59:2364-2368.
2. **AFSSA.** (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
3. **Amieva, M. R.** (2005). "Important bacterial gastrointestinal pathogens in children: a pathogenesis perspective." *Pediatr Clin North Am* 52(3): 749-77.
4. **Andre. M H, Lortholary. O, Bryskier. A** (1998). Classification des antibiotiques : relation structure-activité.
5. **Antoine VIMONT** (2007). Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
6. **Asis Khan, S. C. Das, T. Ramamurthy, A. Sikdar, J. Khanam, S. Yamasaki, Y. Takeda, and G. Balakrish Nair.** (2002). Antibiotic Resistance, Virulence Gene, and Molecular Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Diverse Sources in Calcutta, India.
7. **Azucena Mora, Jesús E. Blanco, Miguel Blanco, M. Pilar Alonso, Ghizlane Dhab, Aurora Echeita, Enrique A. González, M. Isabel Bernárdez, Jorge Blanco.** (2005) Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain.
8. **Barka, M. S. et Kihel, M.** (2010) Prevalence of *Escherichia coli* enterohemorrhagic O157 ;H7 in frozen bovine meat in Algeria.
9. **Besser T.E., Hancock D.D., Pritchett L.C., McRae E.M., Rice D.H., Tarr P.I.** (1997) Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis* ; 175 : 726
10. **Bettelheim, K. A., L. Beutin, et al.** (2003). "Serotypes of *Escherichia coli* isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne, Australia." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(1): 55-63.
11. **Beutin, L., E. Strauch, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, C. Schaudinn, A. Mannel, and H. R. Gelderblom.** (2005). Genetical and functional investigation of *fliC* genes encoding flagellar serotype H4 in wildtype strains of *Escherichia coli* and in a laboratory *E. coli* K-12 strain expressing flagellar antigen type H48. *BMC Microbiol* 5:4.
12. **Beutin, L., J. Prada, S. Zimmermann, R. Stephan, I. Orskov, and F. Orskov.** (1988). Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 267:576-588.
13. **Blanco, M., J. E. Blanco, J. Blanco, E. A. Gonzalez, M. P. Alonso, H. Maas, and W. H. Jansen.** (1996). Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain).
14. **Blanco, M., S. Schumacher, et al.** (2005). "Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2)." *BMC Microbiol* 5(1): 23.
15. **Brooks, J. T., E. G. Sowers, J. G. Wells, K. D. Greene, P. M. Griffin, R. M. Hoekstra, and N. A. Strockbine.** (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002.

16. **Brugère, H., Auvray, A., Mariani-Kurkidjian, P., King, L.A., Loukiadis, E.** (2012). E.coli producteurs de shigatoxines(STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). Bull. Epid. Santé anim. alim., Anses-DGAL.50, 23-30.
17. **Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch.** (1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. Mol Microbiol 24:767-778.
18. **Burland, V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia, and F. R. Blattner.** (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic Acids Res 26:4196-4204.
19. **Calderwood, S., D. Akesson, G. Keusch, T. Barrett, and P. Griffin.** (1996). Proposed New Nomenclature for SLT (VT) family. ASM News 62:118-119.
20. **Caprioli, A., and A. E. Tozzi.** (1998). Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. In : *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains / Ed. par Kaper JB et O'Brien A.D. Washington, DC : American Society for Microbiology, p. 38-48.
21. **Caprioli, A., S. Morabito, H. Brugere, and E. Oswald.** (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res 36:289-311.
22. **Chahed, A.** (2006) Prévalence et caractérisation de souches d'*Escherichia coli* O157 productrices de shigatoxines isolées de denrées alimentaires d'origine animale en Belgique et en Algérie. Th. Université de liege.
23. **Craun, G. F., R. L. Calderon, and M. F. Craun.** (2005). Outbreaks associated with recreational water in the United States. Int J Environ Health Res 15:243-262.
24. **Decludt, B., P. Bouvet, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, P. A. Grimont, B. Hubert, and C. Loirat.** (2000). Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection in children in France. Société de Néphrologie Pédiatrique. Epidemiol Infect 124:215-220.
25. **Donnenberg, M. S., S. Tzipori, M. L. McKee, A. D. O'Brien, J. Alroy, and J. B. Kaper.** (1993). The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. J Clin Invest 92:1418-1424.
26. **Duniere, L.** (2012). Stratégies de limitation du portage sain des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) par les bovins. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en alimentation animale.
27. **Escherich, T.** (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. Fortschr Med 3:515,522,547-554.
28. **Espié, E., P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, N. Pihier, V. Vaillant, S. Francart, H. de Valk, and C. Vernozy-Rozand.** (2006). Shigatoxin Producing *Escherichia coli* O26 Infection and Unpasteurised Cows Cheese, France 2005. In 6th International Symposium on STEC, Melbourne.
29. **Euzéby, J. P.** (2007) 1998-2007, posting date. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [Online.]
30. **Feng, P., K. A. Lampel, H. Karch, and T. S. Whittam.** (1998). Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J Infect Dis 177:1750-1753.
31. **Ferhat, L.** (2008) Recherche et caractérisation des souches d'*Escherichia coli* O157 isolées à partir des carcasses ovines provenant de deux abattoirs de la wilaya d'Alger. Th. Ecole nationale vétérinaire d'El Harrach-Alger.
32. **Gassem, O.** (2012) caractérisation moléculaire de shigatoxines en élevage laitiers (étude préliminaire).

33. **Gannon, V. P., C. Teerling, S. A. Masri, and C. L. Gyles.** (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol* 136:1125-1135.
34. **Griffin PM** (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, in *Infections of the Gastrointestinal Tract* pp 739-58, Raven Press, New York.,
35. **Griffin, P. M., and R. V. Tauxe.** (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13:60-98.
36. **Grimont, P.** (1987). Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect Numéro spécial*.
37. **Heuvelink, A. E., J. T. Zwartkruis-Nahuis, R. R. Beumer, and E. de Boer.** (1999). Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot* 62:1115-1122.
38. **Hrudey, S. E., P. Payment, et al.** (2003). "A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world." *Water Sci Technol* 47(3): 7-14.
39. **Huppertz, H., D. Busch, H. Schmidt, S. Aleksic, and H. Karch.** (1996). Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin.
40. **Hurley, B. P., M. Jacewicz, C. M. Thorpe, L. L. Lincicome, A. J. King, G. T. Keusch, and D. W. Acheson.** (1999). Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 67:6670-6677.
41. **Hussein, H.S., Sakuma, T.,** (2005). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J. Dairy Sci.* 88, 450–465.
42. **Ihekweazu, C., M. Barlow, S. Roberts, H. Christensen, B. Guttridge, D. Lewis, and S. Paynter.** (2006). Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Euro Surveill* 11:128-130.
43. **Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc, and P. M. Sherman.** (1995). Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63:3316-3326.
44. **Iyoda, S., K. Tamura, K. Itoh, H. Izumiya, N. Ueno, K. Nagata, M. Togo, J. Terajima, and H. Watanabe.** (2000). Inducible stx2 phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. *FEMS Microbiol Lett* 191:7-10.
45. **Jarvis, K. G., and J. B. Kaper.** (1996). Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* 64:4826-4829.
46. **Jerse, A. E., and J. B. Kaper.** (1991). The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* 59:4302-4309.
47. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123-140.
48. **Karch, H., H. Huppertz, J. Bockemuhi, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, and R. Lissner.** (1997). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany.
49. **Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior.** (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 151:775-782.
50. **Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric.** (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18:775-779.

51. **Kovacs, M. J., J. Roddy, S. Gregoire, W. Cameron, L. Eidus, and J. Drouin.** (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* **88**:177-179.
52. **Law D, Charth H.** (1998). Enteroaggregative *E. coli*, a review. *J Appl Microbiol.*;84:685-697. *Revue*
53. **Lea, N., J. M. Lord, and L. M. Roberts.** (1999). Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* 145:999-1004.
54. **Lelis Meichtri, Elizabeth Miliwebsky, Andrea Gioffré, Isabel Chinen, Ariela Baschkier, Germán Chillemi, Beatriz E.C. Guth, Marcelo O. Masana, Angel Cataldi, H.Ricardo Rodríguez, Marta Rivas.** (2004). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties.
55. **Lerman, Y., D. Cohen, A. Gluck, E. Ohad, and I. Sechter.** (1992). A cluster of cases of *Escherichia coli* O157 infection in a day-care center in a communal settlement (kibbutz) in Israel. *J Clin Microbiol* **30**:520-521.;
56. **Lindgren, S. W., A. R. Melton, and A. D. O'Brien.** (1993). Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun* 61:3832-3842.
57. **Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis, and M. Karmali.** (1987). Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* 262:8834-8839.
58. **Loirat, C., V. Baudouin, E. Sonsino, P. Mariani-Kurkdjian, and J. Elion.** (1992). Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant : aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques. In *Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker*. Flammarion-Médecine-Sciences (ed)-Paris:pp133-158.
59. **Loukiadis E,** (2007). Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement *via* les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)
60. **Malika Goualia,* , François-Xavier Weill.** (2013). Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité *Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.
61. **Midori Hiroi, Naomi Takahashi, Tetsuya Harada, Fumihiko Kawamori, Natsuko Iida, Takashi Kanda, Kanji Sugiyama, Norio Ohashi, Yukiko Hara-Kudo, and Takashi Masuda** (2012). Serotype, Shiga Toxin (Stx) Type, and Antimicrobial Resistance of Stx-Producing *Escherichia coli* Isolated from Humans in Shizuoka Prefecture, Japan (2003–2007).
62. **Mora, A., J. E. Blanco, et al.** (2005). "Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain." *Res Microbiol*.
63. **Moreira CN, Pereira MA, Brod CS et al.** (2003) Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC*) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol.* 2003 May 29;**93**(3):179-83
64. **Muniesa, M., J. Jofre, C. Garcia-Aljaro, and A. R. Blanch.** (2006). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ Sci Technol* **40**:7141-7149.
65. **Nastasijevic, I., Mitrovic, R., Buncic, S.** (2009) The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle, *Meat Science* 82, 101-105.
66. **Nataro, J. P. and J. B. Kaper** (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clin*

67. **O'Brien, A. D., T. A. Lively, et al.** (1983). "Purification of Shigella dysenteriae 1 (Shiga)-like toxin from Escherichia coli O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis." *Lancet* 2(8349): 573.
68. **O'Brien, A., G. LaVeck, M. Thompson, and S. Formal.** (1982). Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli. *J Infect Dis* 146:763-769.
69. **Orth, D. and R. Wurzner** (2006). "What makes an enterohemorrhagic Escherichia coli?" *Clin Infect Dis* 43(9): 1168-9.
70. **P.Y Allouch, B. PANGON, J.C. GHASSIA.** (1995). AntibioGramme des antérobactéries.
71. **Park, S., R. W. Worobo, and R. A. Durst.** (2001). Escherichia coli O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Crit Rev Biotechnol* 21:27-48.
72. **Paton, A. W. and J. C. Paton** (1998). "Detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO111, and rfbO157." *J Clin Microbiol* 36(2): 598-602.
73. **Philippon A, Arlet G.** (2006). B-Lactamases des bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Ann Biol Clin* 2006;64:37-51.
74. **Philippon A.** (2008). Résistance bactérienne: définition, mécanismes, évolution EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses,8-006-N-10,2008.
75. Prescott et al., 2008 livre de microbiologie
76. **Price, S., C. Cheng, C. Kaspar, J. Wright, F. DeGraves, T. Penfound, M. Castanie-Cornet, and J. Foster.** (2000). Role of rpoS in acid resistance and fecal shedding of Escherichia coli O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 66:632-637.
77. **Reid, S. D., C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander, and T. S. Whittam.** (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic Escherichia coli. *Nature* 406:64-67.
78. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - SEPTEMBRE-OCTOBRE 2012 - N° 445
79. **Riley, L. W., R. S. Remis, et al.** (1983). "Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype." *N Engl J Med* 308(12): 681-5.
80. **Roy. P.H** (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries.
81. **Schmidt, H., L. Beutin, and H. Karch.** (1995). Molecular analysis of the plasmidencoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63:1055-1061.
82. **Senerwa, D., O. Olsvik, et al.** (1989). "Colonization of neonates in a nursery ward with enteropathogenic Escherichia coli and correlation to the clinical histories of the children." *J Clin Microbiol* 27(11): 2539-43.
83. **Smith D., Blackford M., Younts S., Moxley R., Gray J., Hungerford L., Milton T., Klopfenstein T.** (2001). Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *J. Food Prot.* 2001; 64: 1899-1903.
84. **Smith, D., M. Blackford, et al.** (2001). "Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding Escherichia coli O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen." *J Food Prot* 64(12): 1899-903.
85. **Soloaga, A., M. P. Veiga, L. M. Garcia-Segura, H. Ostolaza, R. Brasseur, and F. M. Goni.** (1999). Insertion of Escherichia coli alpha-haemolysin in lipid bilayers as a nontransmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* 31:1013-1024.

86. **Strachan, N. J., D. R. Fenlon, and I. D. Ogden.** (2001). Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* **203**:69-73.
87. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** (1986). Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**:135-140.
88. **Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**:1116-1122.
89. **Sukhumungoon, P., Mittraparp-arthorn, P., Pomwised, R., Charernjiratragul, W. and * Vuddhakul, V,** (2011). High concentration of Shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* isolated from Southern Thailand
90. **Tarr, C. L. and T. S. Whittam** (2002). "Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **184**(2): 479-87.
91. **Vernozy-Rozand, C., and M. P. Montet.** (2001). *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc, pp. 135.
92. **Wachtel, M. R., L. C. Whitehand, and R. E. Mandrell.** (2002). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J Food Prot* **65**:18-25.
93. **Wadolkowski, E. A., L. M. Sung, J. A. Burriss, J. E. Samuel, and A. D. O'Brien.** (1990). Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* **58**:3959-3965.
94. **Wales AD, Pearson G R, Skuse A M, Roe J M, Hayes C M, Cookson A L and Woodward M J** (2001) Attaching and Effacing Lesions Caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Experimentally Inoculated Neonatal Lambs. *J Med Microbiol* **50**: pp 752-8.
95. **Whittam, T. S., M. L. Wolfe, I. K. Wachsmuth, F. Orskov, I. Orskov, and R. A. Wilson.** (1993). Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* **61**:1619-1629.
96. **Willshaw, G.A., Smith, H.R., Roberts, D., Thirlwell, J., Cheasty, T., and Rowe, B.** (1993) Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. *J Appl Bacteriol* **75**: 420-426.
97. **Wray, C., I. M. McLaren, and P. J. Carroll.** (1993). *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *Vet Rec* **133**:439-442.

Annexe 01

Matériel de laboratoire :

Boîtes de pétrie

Pipettes pasteur

Micropipettes réglables

Bec bunsen

Autoclave

Centrifugeuse

Four pasteur

Vortex

Agitateur magnétique

Portoir

Verreries

Réfrigérateur

Congélateur gants

Eppendorfs de 1.5ml

Tubes stériles de 15ml

Etuve

Milieux de culture et réactifs :

SMAC (mac-conkey au sorbitol)

Gélose nutritive

TSI (tri sugar inions)

Citrate de simons

PBS phosphate bufferd saline

Eau distillée stérile

Annexe 02

Tableau : Diamètres d'inhibition

N° d'ordre	Antibiotiques Echantillons	Diamètre des zones d'inhibition										
		fox	AK	AMP	CTX	CN	SxT	TC	NA	TiM	C	K
1	F2(2) +4	24	23	16	29	19	24	26	24	25	22	17
2	F2(2) +3	28	24	14	30	19	29	28	28	27	21	20
3	F2(4) +1	25	26	16	30	21	25	28	26	24	23	19
4	F2(4) +2	26	24	17	31	21	26	29	25	26	22	17
5	F2(11) +1	23	20	14	30	20	27	26	27	26	22	18
6	F9(3) +1	24	20	15	30	19	26	27	27	27	22	15
7	F9(3) +3	27	22	16	29	20	25	28	28	28	25	19
8	F10(1) +1	28	24	21	29	21	27	25	25	26	26	19
9	F10(2) +1	24	24	28	29	23	27	27	27	26	26	20
10	F10(3) +1	23	25	25	30	20	25	26	29	28	22	20
11	F10(7) +1	28	23	23	29	22	28	28	27	27	24	17
12	F11(5) +1	24	28	20	34	19	26	25	26	26	22	19
13	F11(5) +2	26	27	22	32	20	28	27	27	25	22	19
14	F15(1) +1	28	24	18	30	23	25	28	30	27	25	20
15	F15(1) +3	23	25	16	31	22	25	30	29	27	23	19
16	F15(6) +1	28	24	17	30	21	28	30	25	28	25	19
17	F18(4) +3	27	25	19	29	22	28	26	28	28	26	18
18	F20(2) +2	24	30	23	35	25	28	27	30	24	26	19
19	F21(1) +1	27	22	19	30	22	27	26	27	25	23	20
20	F21(6) +3	28	24	18	30	23	28	27	28	27	27	17

Annexe 03

Tableau de l'interprétation des diamètres d'inhibition :

N° d'ordre	Interprétation des Diamètres d'inhibition											
	Antibiotiques Echantillons	fox	AK	AMP	CTX	CN	SxT	TC	NA	TiM	C	K
1	F2(2) +4	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I
2	F2(2) +3	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
3	F2(4) +1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
4	F2(4) +2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
5	F2(11) +1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
6	F9(3) +1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I
7	F9(3) +3	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
8	F10(1) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	F10(2) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	F10(3) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	F10(7) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
12	F11(5) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	F11(5) +2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	F15(1) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	F15(1) +3	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
16	F15(6) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	F18(4) +3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	F20(2) +2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	F21(1) +1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	F21(6) +3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I