

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE BLIDA 1  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

## MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière Biologie  
Option : Génétique - Physiologie

Thème

# Caractérisation moléculaire de Shiga toxines dans les laits d'élevages

Présenté par : SAIDANI Ikram

Devant le jury composé de :

MOHAMED SAID R	MAA	UB1	President
CHARELLAH A	MAA	UB1	Examinatrice
GUETARNI D	Professeur	UB1	Promoteur
BAAZIZE-AMMI D	MAA	UB1	Co-Promotrice

**Promotion, 2012**

## **REMERCIEMENTS**

*Initialement ce mémoire n'aurait pas été réalisé sans le courage, la santé et la patience que dieu le tout puissant ma donné.*

*Je tiens à remercier en premier lieu mon promoteur le **professeur GUETARNI Djamel** pour son accueil bénifique au sein de son laboratoire « **ECOQUAPA** » de l'Université SAAD Dahlab-Blida 1, ainsi que pour ces conseils précieux tout au long de mon travail et sa patience à mon égard, « merci monsieur ».*

*Mes vifs remerciements s'adressent à ma Co-promotrice **madame BAAZIZE AMMI Djamila** pour avoir accepté d'encadrer mon mémoire, sa disponibilité, ses conseils techniques et scientifiques ainsi que sa gentillesse envers moi et son encouragement tout au long de mon travail avec elle.*

*Mes sincères remerciements pour les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail.*

*Je remercie **Mr MOHHAMED SAID Ramdan** notre responsable d'option qui nous a orienté et pris en charge tout au long de notre cursus universitaire de la 3eme année jusqu'à la 5eme année.*

*Un remerciement particulier pour tout le personnel du laboratoire « **Grippe et Virus respiratoire** » de l'institut pasteur d'Algérie (IPA), Annexe Sidi Fredj (Alger).pour leur chaleureux accueil au sein de ce laboratoire où j'ai passé de très bons moments et j'ai appris beaucoup de choses. J'ai eu vraiment la chance de réaliser mon travail dans ce laboratoire et d'avoir vécu cette expérience inoubliable.*

*Je remercie chaleureusement **Melle IZRI Kahina** pour m'avoir guidé à mon arrivée au laboratoire « **Virus et Grippe respiratoire** »pour son énorme aide, son encouragement, sa présence pendant les bons et les mauvais moments et ses précieux conseils ainsi que pour sa gentillesse envers moi.*

*Un immense merci pour mes très chers **parents** sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, merci pour votre amour, votre soutien, votre présence et surtout pour votre encouragement. Vous avez toujours cru en moi et je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci encore à vous deux.*

## **DEDICACES**

*A la mémoire de ma très chère grand-mère paternelle qui nous a quitté le 16/12/2013. Que Dieu, le miséricordieux l'accueille dans son éternel paradis.*

*A ma mère la personne la plus importante dans ma vie. Qui ma donné l'amour, l'aide et qui a été toujours présente à mes cotés dans les bons et les mauvais moments, que dieu te garde pour moi et pour mes sœurs.*

*A mon père qui nous a bien éduqué et qui a été toujours le bon exemple pour moi et mes sœurs.*

*A mon cher fiancé **Amine** qui ne cesse pas de m'encourager et de m'aider dans toute étape difficile dans ma vie.*

*A mes sœurs **Soumeya, Asma, Hind, Hadia** ainsi que mes très chères petites nièces et mes adorables petits neveux.*

*A toute la famille **SAIDANI** et **HAMMANA**.*

*A mes amies **Rabéa, Amira, Meriem, Imene, Ramila, Kahina** avec lesquelles j'ai partagé des merveilleux moments dans ma vie.*

*A tous mes enseignants (es) de la 1<sup>ière</sup> année primaire jusqu'à la 5<sup>ème</sup> année universitaire, merci pour votre assistance et le réconfort que vous m'avez toujours apporté en dépit des distances qui nous séparent,*

*A tous mes collègues de l'établissement **LARBI TBESSI** anis que **SAHRAOUI** à Koléa.*

*A tous les gens qui travaillent à l'IPA annexe Sidi Fredj et plus particulièrement aux gens travailleurs au laboratoire « Virus et Grippe respiratoire ». Pour leurs coups de mains et pour leurs connaissances.*

## RESUME

*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont des agents pathogènes alimentaires susceptibles de provoquer des maladies graves chez l'homme. Les bovins, en tant que porteurs asymptomatiques, constituent le réservoir principal de cet agent pathogène. La contamination de l'homme se fait généralement par l'ingestion de produits alimentaires contaminés dérivés de bovins, parmi lesquels le lait et les produits laitiers.

Dans la présente étude, nous apportons notre contribution dans la caractérisation moléculaire des shigatoxines dans les laits d'élevages bovins laitiers de la wilaya de Blida (Algérie).

L'étude a porté sur 117 échantillons de lait de tank collectés dans différentes laiteries au niveau de la wilaya de Blida. La présence de STEC a été mise en évidence par la recherche des gènes *stx* et le gène *eae* par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence des gènes *stx* dans un seul échantillon de lait (soit un taux de 0,85%) sur le total des échantillons analysés et la présence du gène *eae* dans 6 échantillons de lait (soit un taux de 5,12%) sur le total des échantillons analysés.

Il est à noter que l'échantillon positif pour le gène *stx* porte un profil génétique *stx1- / stx2+* et les échantillons positifs pour le gène *eae* portent le profil génétique *stx- / eae+*.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons dire qu'il faut prendre les mesures d'hygiène nécessaire au niveau de différentes exploitations pour éviter la dissémination des bactéries dans les étables, les mamelles et lors de la traite et par conséquent la contamination accidentelle du lait.

Mots -clés : STEC, lait, produits laitiers, gène *stx*, gène *eae*, PCR.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* producing of Shiga-toxins (STEC) are food disease-causing agents likely to cause serious diseases at the man. The cattle, as asymptomatic carries, constitute the principal tank of this pathogen agent.

The contamination of the man is generally done by the ingestion of contaminated food substances derived from cattle, among which milk and dairy products.

In the present study, we make our contribution in the molecular characterization of the shigatoxines in milks of dairy bovine breedings of the wilaya of Blida (Algeria).

The study looked at 117 samples of milk of tank collected in various dairies on the level of the wilaya of Blida. The presence of STEC has been highlighted by their search of *stx* genes and *eae* gene by PCR (Polymerase Chain Reaction).

The results were used to highlight the presence of *stx* genes in only one milk sample (either a rate of 0.85%) on the total of the analyzed samples and the presence of *eae* gene in 6 samples of milk (or a rate of 5.12%) on the total of the analyzed samples.

It should be noted that the positive sample for *stx* gene carries a genetic profile *stx1-/stx2+* and the positive samples for *eae* gene carries the genetic profile *stx-/eae+*.

On the basis as of got results, we can say that it is necessary to take the measurements of hygiene necessary to the level various exploitations to avoid the dissemination of the bacteria in the cattle sheds, the udders and at the time of the draft and consequently the accidental contamination of milk.

**Key –word:** STEC, milk, dairy products, *stx* genes, *eae* gene, PCR.

## المخلص

الاشريشيا كولي المنتجة للشيجاتوكسين ( STEC ) هي مسببات الأمراض الغذائية التي يمكن أن تسبب مرض خطير عند البشر. الأبقار هي ناقلات بدون أعراض، وهي الخزان الرئيسي لهذا العامل الممرض.

العدوى عند الانسان هي عادة بسبب تناول المنتجات الغذائية الحاملة لهذه البكتيريا المستمدة من الأبقار ، بما في ذلك الحليب ومنتجات الألبان.

في هذه الدراسة ، نتطرق الى الوصيف الجزيئي ل شيجا توكسين في حليب الأبقار الحلوب على مستوى مزارع البلدية (الجزائر).

وشملت الدراسة 117 عينة حليب تم جمعها من منتجات الألبان المختلفة في البلدية. وقد تم تسليط الضوء على STEC بالبحث عن الجينات *stx* و *eae* بواسطة PCR.

واستخدمت النتائج لتحديد وجود جينات *stx* في عينة حليب واحد ( بمعدل 0.85 % ) عن مجموع العينات التي تم تحليلها ووجود الجين *eae* في 6 عينات من الحليب ( بمعدل 5.12 % ) من إجمالي العينات التي تم تحليلها.

لوحظ أن العينة الإيجابية ل هذا الجين *stx* يحمل صفات وراثية + *stx2* - / *stx1* و العينات إيجابية للجينات *eae* تحمل صفات وراثية - *stx* ، + *eae*

وبناء على هذه النتائج، يمكننا القول أنه يجب علينا اتخاذ التدابير الصحية اللازمة في مزارع مختلفة لمنع انتشار البكتيريا في الاسطبلات و الحلمات و أثناء الطلب .

**الكلمات المفتاحية :** STEC الحليب ومنتجات الألبان، جينات *stx* ، جينات *eae*

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUME

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	1
INTRODUCTION	2
<b>CHAPITRE I : TAXONOMIE DES SHIGA-TOXINE ESCHERICH (STEC)</b>	3
I.1. Caractères généraux	3
I.2. Classification d' <i>Escherichia coli</i> responsable des troubles intestinaux	3
I.3. Evolution des STEC	5
I.3.1. Origine des EHEC	5
I.3.2. Origine du clone O157 :H7	6
<b>CHAPITRE II : LES FACTEURS DE VIRULENCE DES STEC</b>	7
II.1. Les Shiga-toxines	7
II.1.1. Structure des toxines Stx1 et Stx2	7
II.1.2. Les gènes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> et leurs variants	7
II.1.3. Le mécanisme d'action des toxines Stx	8
II.2. Les facteurs d'adhésion	9
II.3. Les facteurs plasmidiques	10
<b>CHAPITRE III : DONNEES EPIDIMIOLOGIQUE DES STEC</b>	11
III.1. EPIDEMIOLOGIE ANIMALE, ENVIRONNEMENTALE ET ALIMENTAIRE	11

III.1.1. Portage animal	11
III.1.2. Dans l'environnement	12
III.1.3. Dans les filières agro-alimentaires	12
III.2. EPIDIMIOLOGIE HUMAINE	13
III.2.1. Principaux modes de transmission	13
III.2.2. PATHOLOGIE HUMAINE	15
<b>IV. PARTIE EXPERIMENTALE</b>	16
<b>IV.1. MATERIEL ET METHODES</b>	17
<b>IV.1.1. MATERIEL</b>	17
IV.1.1.1. Prélèvements	17
IV.1.1.2. Matériel non biologique	17
<b>IV.1.2. METHODES</b>	21
1. Traitement des prélèvements de lait	21
2. Extraction d'ADN et contrôle de qualité des ADN extraits	22
3. Analyse par PCR	24
RESULTATS	26
DISCUSSION	31
CONCLUSION	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34
ANNEXES	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Répartition des prélèvements par laiteries	17
<b>Tableau II :</b> Amorces oligonucléotidiques utilisées dans la réaction de PCR	18
<b>Tableau III:</b> Concentrations et volumes des réactifs utilisés dans la PCR	24
<b>Tableau VI :</b> Résultats de la recherche des gènes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> et <i>eae</i> .	30
<b>Tableau V:</b> Profils génétiques des souches d' <i>Escherichia coli</i> isolées de lait	30

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure 01 :</b> Pathogénies associées aux six classes d' <i>E. Coli</i> responsables de diarrhées	5
<b>Figure 02 :</b> Modèle hypothétique de l'émergence d' <i>E. Coli</i> O157:H7 à partir d'une souche de sérotype O55:H7	6
<b>Figure 03 :</b> Mécanisme d'action des Shiga-toxines	9
<b>Figure 04 :</b> Flux potentiels des STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme	14
<b>Figure 05:</b> Kit d'extraction d'ADN	18
<b>Figure 06 :</b> Thermocycleur Techne TC-312	19
<b>Figure 07 :</b> Dispositif d'électrophorèse	20
<b>Figure 08 :</b> dispositif de visualisation de migration	20
<b>Figure 09 :</b> Les étapes d'extraction de l'ADN	21
<b>Figure 10:</b> Préparation du gel d'agarose	22
<b>Figure 11 :</b> Le retrait des peignes	23
<b>Figure 12 :</b> Dépôt des échantillons	23
<b>Figure 13:</b> Photo du gel de contrôle de la qualité	26
<b>Figure14 :</b> Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence du gène <i>stx1</i>	27
<b>Figure 15</b> Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence de gène <i>stx2</i>	28
<b>Figure16:</b> Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence du gène <i>eae</i>	29

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
A/E	Attachement/Effacement
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARN	Acide Ribo Nucléique
BET	Bromure d’Ethidium
CH	colites hémorragiques
DAEC	<i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
<i>eae</i>	<i>E.coli</i> attaching and effacing
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Entéroaggrégatif
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Entérohémorragique
E-hlyA	EHEC Hemolysin A
<i>ehxA</i>	Enterohemolysin A
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Entéroinvasif
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Entéropathogène
<i>esp</i>	EPEC Secreted Protein
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Entérotoxinogène
Gb3 ou 4	Globotriosyl céramide 3 ou 4
G+C	Guanine + Cytosine
Iha	Iron-homologue adhesin
kDa	KiloDalton
LDC	lysine décarboxylase
LEE	Locus d’Effacement des Entérocytes
Lpf	long polar fimbriae
LPS	Lipopolysaccharides
ODC	ornithine décarboxylase
Pb	paires de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTT	Purpura Thrombotique Thrombocytopénique
Rpm	Rotations par minutes
SAA	STEC Autoagglutinating Adhesin
SHU	syndrome hémolytique et urémique
St	Shiga-like toxins
SOR	Sorbitol
STEC	<i>Escherichia coli</i> producteurs de Shigatoxines
Stx	Shigatoxine
Stx1	Shigatoxine de type 1
Stx2	Shigatoxine de type 2
TAE	Tris-acetate-EDTA Buffer
Tir	Translocated Intimin Receptor
VTEC	<i>Escherichia coli</i> producteurs de vérotoxine

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme l'un des plus importants groupes de pathogènes émergents. Elles se caractérisent par la production de toxines "shiga like toxins" (Stx) en raison de l'homologie des séquences, la similarité d'activité biologique et les réactions antigéniques croisées observées entre la principale cytotoxine extracellulaire de *Shigella dysenteriae* sérotype 1 et la toxine Stx1 d'*E. Coli* (O'Brien et al., 1982; Calderwood et al., 1987). Parmi les animaux d'élevage, les bovins représentent le principal réservoir en STEC.

Les STEC sont responsables de toxi-infections d'origine alimentaire qui se traduisent par des diarrhées mais aussi par des syndromes plus graves pour l'homme comme le syndrome hémolytique urémique pouvant provoquer la mort. D'une façon générale, les aliments plus particulièrement à risque sont les denrées d'origine animale et les produits contaminés par des fèces animales et consommés crus ou peu cuits. Le lait et les produits laitiers apparaissent moins impliqués, mais plusieurs épidémies dues à leur consommation ont cependant été décrites dans le monde depuis 1983 (Afssa, 2003). En France, des fromages au lait cru ont été à l'origine d'un foyer rapporté en 1992 (Casenave et al., 1993).

En Algérie, quoique peu de travaux portent sur le sujet, la présence des STEC chez le bovin de la wilaya de Blida a déjà été mise en évidence dans les fèces avec un taux de portage individuel de 30,5% (Gassem, 2012). Devant le risque que présente ce portage dans la région à vocation laitière à travers la contamination du lait de tank, la présente étude est une réelle contribution par la recherche des STEC dans le lait d'élevages et la caractérisation moléculaire des gènes (*stx1*, *stx2*, *eae*) au moyen de la technique de PCR.

## CHAPITRE I

### TAXONOMIE DES SHIGA-TOXINE *ESCHERICHIA COLI* (STEC).

#### I.1. Caractères généraux

*Escherichia Coli* est un colibacille découvert par Theodor Escherich en 1885, elle est commensale de la flore digestive de l'homme et qui peut être très pathogène. Son pouvoir pathogène est dû à l'acquisition des gènes de virulence étrangers apportés par des plasmides ou des transposons, c'est une espèce naturellement sensible aux antibiotiques mais qui devient de plus en plus résistante.

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des enterobacteriaceae. Ce sont des bacilles à gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (le Minor *et al*, 1990). Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E.Battae*, *E.Coli*, *E.Fergusonii*, *E.Hermanii*, et *E.Vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractères biochimiques spécifiques, qui permettent de les différencier (Grimont 1987)

#### I.2. Classification d'*Escherichia coli* responsable des troubles intestinaux

Le pouvoir pathogène d'*Escherichia coli* chez l'homme se traduit par des infections intestinales ou extra intestinales comme les infections de l'arbre urinaire, suppurations diverses, méningites et septicémies. (Cooke, 1985 ; Pohl, 1993 ; Lior, 1994 ; Sussman, 1997 ; Wray *et al*, 1997). Pour les infections intestinales, les médecins utilisent une classification qui est basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques et qui comprend 6 groupes (Cf. figure1) :

##### ➤ Les *E. coli* Entérotoxinogènes (ETEC) :

Se caractérisent par un syndrome diarrhéique du nourrisson dans les pays en voie de développement. Ils sont aussi responsables de la « diarrhée des voyageurs » ou turista qui se manifeste par une diarrhée (adulte et enfant). Ces diarrhées sont dues à la sécrétion des toxines thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT) (Levine, 1987). Les ETEC colonisent essentiellement la partie proximale de l'intestin grêle, grâce aux facteurs de colonisation qui sont des adhésions fimbriaires (Cassels *et Wolf*, 1995).

##### ➤ Les *E. coli* Entérotoxinogènes (EPEC) :

Ils sont responsables de gastro-entérites chez les enfants de moins de trois ans. Lors d'infections, des lésions histopathologiques particulières apparaissent appelées lésions

d'attachements et d'effacements (lésions A/E) (Andrade et al, 1989). Ce phénomène est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhérence intime entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes. Le gène *eae* est à l'origine de ces lésions avec d'autres gènes (Jerse et al, 1990).

➤ **Les *E.coli* entéroaggrégatifs (EAEC) :**

Ce groupe entraîne un retard de croissance, des infections urinaires et des diarrhées persistantes, dans différents pays du monde (Amieva, 2005). Les *E.coli* entéroaggrégatifs se caractérisent par une adhésion agrégative entraînant des nécroses au pôle apical des villosités accompagnées par un œdème inflammatoire et hémorragique de la sous-muqueuse. Ils produisent une entérotoxine thermostable (EASTI) et une entérotoxine thermolabile (Kapper et al, 2004)

➤ **Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) :**

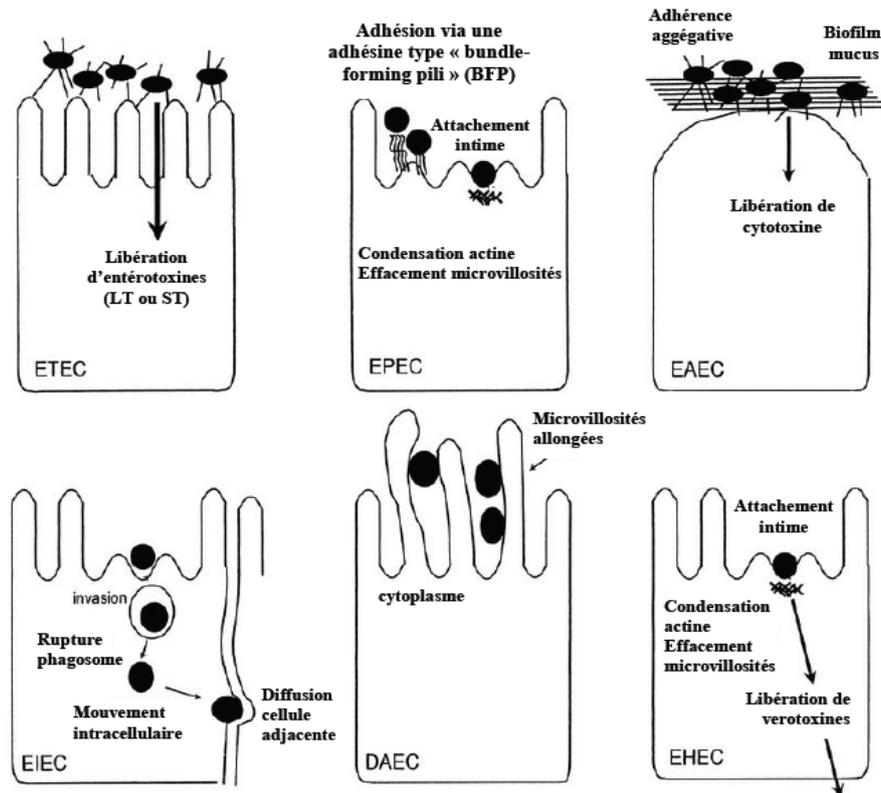
Ils sont phylogénétiquement proches de *shigella spp* (Brenner et al, 1973), et leur mécanisme d'invasion de l'épithélium intestinal est similaire. Le syndrome dysentérique caractérise ce groupe et qui se manifeste par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées accompagnées d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus)

➤ **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) :**

Ce genre d'*E. coli* cause des diarrhées et des infections urinaires, ces diarrhées pouvant être aqueuses et contenir du mucus, chez les jeunes enfants, en particulier entre 1 et 5 ans. L'adhésion diffuse est l'origine d'une adhésion fimbriaire (75% des DAEC produisent l'adhésine fimbriaire). Cette adhésine se lie à une protéine de surface des entérocytes de l'intestin grêle. Les DAEC induisent un effet cytopathique caractérisé par le développement de longues extensions entourant les cellules bactériennes (Cookson et al, 1996).

➤ **Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) :**

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) provoquent des pathologies allant de simples diarrhées à des colites hémorragiques (CH), voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort (Riley et al., 1983). Un grand nombre de sérotypes d'EHEC est capable de produire des lésions de type A/E au niveau du colon. *E. coli* entérohémorragiques se caractérisent par la production de toxines Stx1/Stx2 codées par les gènes *stx*, qui pénètrent dans la circulation sanguine et provoquent des atteintes extra-intestinales potentiellement mortelles. (Konowalchuk et al., 1977)



**Figure 01 :** Pathogénies associées aux 6 classes d'*E. Coli* responsables de diarrhées (Nataro et Kaper, 1998).

### I.3. Evolution des STEC :

#### I.3.1. Origine des EHEC

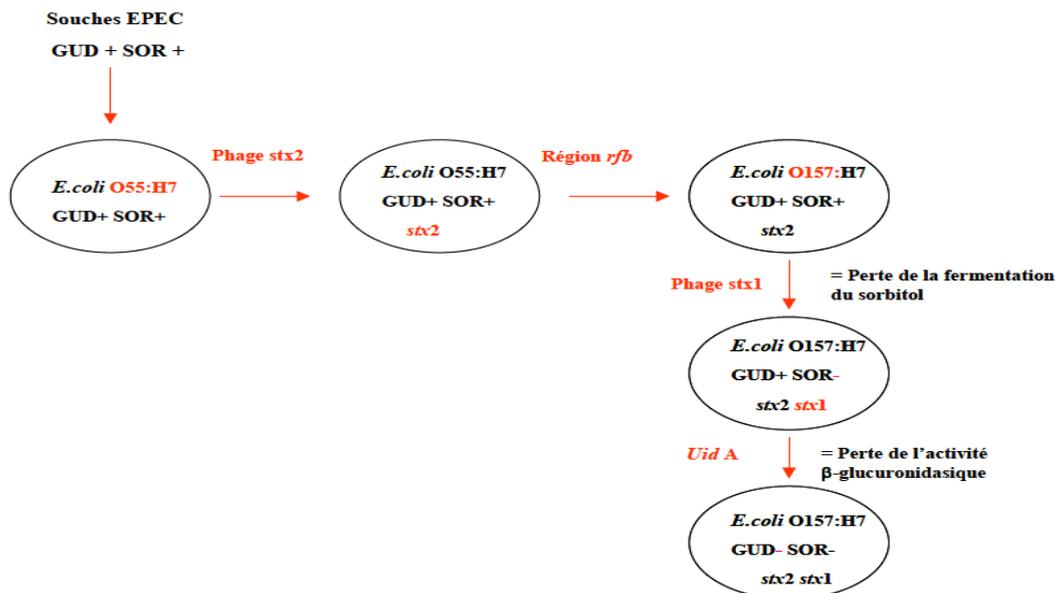
L'évolution de la pathogénie chez *E. coli* est le résultat de l'arrivée d'éléments génétiques mobiles codant pour divers facteurs de virulence. Toutefois, la rétention et l'expression de ces facteurs de virulence dépendent étroitement du fond génétique de la cellule bactérienne dans laquelle ils ont été introduits. (Montet, 2009).

Parmi plusieurs hypothèses posées concernant l'évolution des EHEC. La plus probable serait que les EHEC soient un groupe de clones dérivant des *E. coli* Entéropathogènes (EPEC) (Whittam *et al*, 1993). L'émergence des EHEC serait consécutive à l'acquisition par transfert horizontal de gènes de virulence (*stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx*) localisés sur des éléments mobiles. Les gènes *stx1* et *stx2* sont situés sur des prophages, le gène *eae* (intimine) sur un îlot de pathogénicité LEE et le gène *ehxA* et *katP* (entérohémolysine-EHEC, KatP) sur le plasmide pO157. Ainsi l'acquisition de gènes *stx* par deux clones EPEC aurait conduit à l'émergence de deux lignées majeures de EHEC : EHEC-1, constituée de souches O157, et EHEC-2, constituée de souches O26 et O111 (Sperandio *et al*, 1998 ; Wieler *et al*, 1997).

### I.3.2. Origine du clone O157 :H7

Selon Feng *et al*, (1998) l'apparition du clone O157 :H7 est basé sur une succession des événements génétiques qui auraient eu lieu chez l'ancêtre génétiquement le plus proches du clone O157 :H7 des EHEC, le O55 :H7 des EPEC ( $\beta$ -glucuronidase positive et fermentant le sorbitol) (Cf. figure2)

Le clone O157:H7 aurait émergé à partir d'un ancêtre possédant l'îlot de pathogénicité LEE, il y a au moins trente mille ans, via l'acquisition du gène *stx2* par transduction avec un phage ; il en a résulté l'émergence d'un clone O55:H7 *stx2*-positif. Ensuite, ce clone aurait acquis un plasmide codant des hémolysines et la région *rfb* (nécessaire à la synthèse de l'antigène O157) et plus récemment un gène phagique codant la Shiga-toxine 1 (*stx1*). Ce clone aurait perdu plus récemment la capacité à fermenter le sorbitol et à produire une activité  $\beta$ -glucuronidase fonctionnelle, suite à une mutation T→G en position 92 du gène *uidA* (Park *et al*, 2001). Ce clone aurait également acquis le plasmide de virulence pO157 (gènes *ehxA* et *katP*) donnant naissance au clone O157:H7 "sorbitol -" de répartition mondiale (Feng *et al*, 1998 ; Reid *et al*, 2000).



**Figure 02:** Modèle hypothétique de l'émergence d'*E. Coli* O157:H7 à partir d'une souche de sérotype O55:H7 (Feng *et al*, 1998). GUD+ : activité  $\beta$ -glucuronidase fonctionnelle ; SOR+ : fermentation du sorbitol.

## CHAPITRE II

### LES FACTEURS DE VIRULENCE DES STEC

#### II.1. Les Shiga-toxines

Les souches STEC se caractérisent par la production de cytotoxines inhibant *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication. Ces toxines sont 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 (Strockbine *et al*, 1988 ; O'Brien *et al*, 1982).

##### II.1.1. Structure des toxines Stx1 et Stx2 :

Toutes les souches STEC se caractérisent par la production de Shiga-toxines (Stx). Les Shigatoxines sont des hétéropolymères de 70 kDa formés d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa. Ces toxines ressemblent par leurs structures et leurs fonctions à la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (Gannon *et al*, 1990). La sous-unité A possède une activité de type N-glycosidase qui permet l'arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible infectée. Les deux sous unités A et B sont codées par un opéron d'environ 1230 pb généralement porté par un bactériophage de type  $\lambda$ -like.

Cet opéron est constitué d'un cistron proximal codant la sous-unité A et d'un cistron distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous unité B.

##### II.1.2. Les gènes *stx1*, *stx2* et leurs variants

Les Shiga-toxines comportent deux grandes classes : les toxines Stx1, qui sont neutralisables par les anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (Strockbine *et al*, 1986; Calderwood *et al*, 1996). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie vis à vis de la séquence en acides aminés de la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* (Strockbine *et al*, 1988). La notion de groupe est liée à l'existence de nombreux variants de ces deux types de toxines, principalement pour le groupe Stx2. Plus d'une vingtaine de variants de Stx ont en effet été isolés à ce jour (Hussein and Sakuma 2005). Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques des toxines Stx1 et Stx2 ont été décrits (Beutin *et al*, 2007). Les variants des gènes *stx1* (*stx1c*, *stx1d*) sont très proches dans leurs séquences et spécificités d'hôte, contrairement aux principaux variants de *stx2* (*stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) (Orth and Wurznner 2006) qui

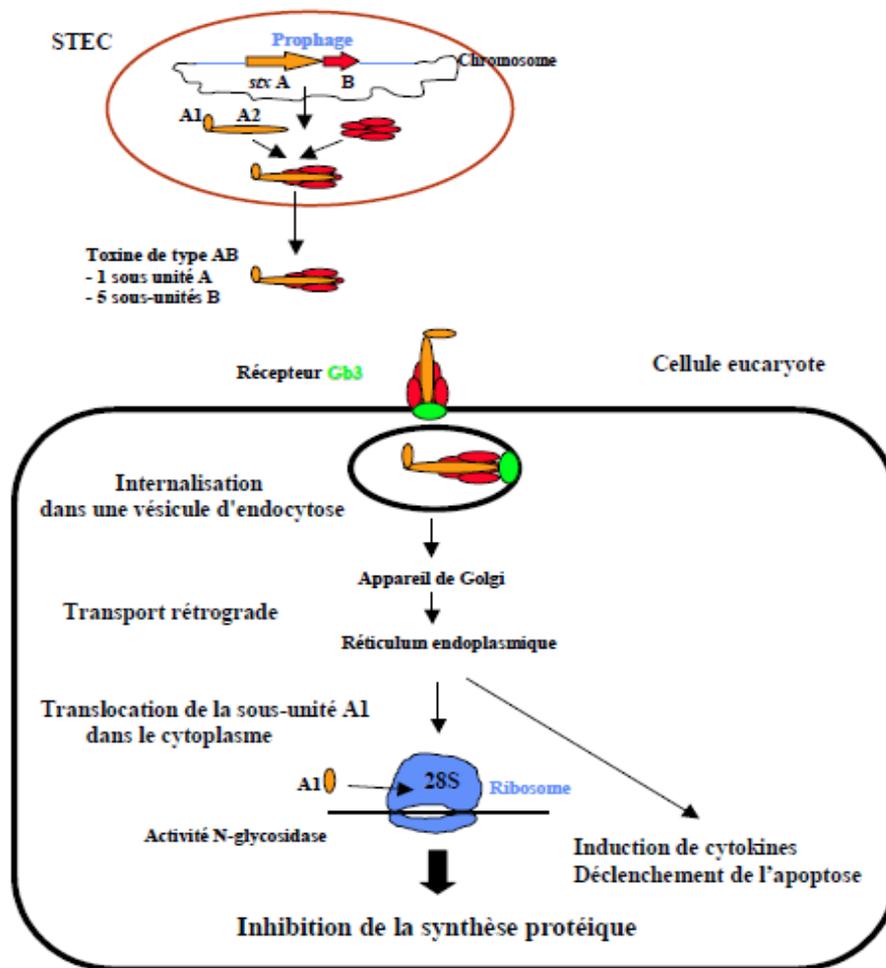
présentent, au niveau de leurs séquences nucléotidiques respectives, 99,7%, 94,9%, 94% et 63,4% d'homologie pour la sous-unité A et 95,2%, 86,6%, 79% et 75,4% pour la sous-unité B, avec les gènes des sous-unités de Stx2 correspondantes (Friedrich et al. 2002).

Stx1 et stx2 ont les mêmes caractères biochimiques et le même mécanisme d'action, mais on peut les distinguer par leurs propriétés immunologiques. Cependant, les toxines Stx1 et Stx2 ne semblent pas traverser de la même façon la barrière de l'épithélium intestinal (Hurley *et al*, 1999). Des études (Wadolowski *et al*, 1990 ; Lindgren *et al*, 1993) ont montré que Stx2 serait 1000 fois plus cytotoxique sur les cellules endothéliales rénales humaines que la toxine Stx1 (Louise et Obrig, 1995). Ces résultats corroborent les données épidémiologiques indiquant que les souches responsables des troubles les plus sévères chez l'homme, comme les souches de sérotype O157:H7, produisent Stx2 (Boerlin, 1999).

### **II.1.3. Le mécanisme d'action des toxines Stx**

Lors d'une première étape, la toxine se fixe 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 (Lingwood *et al*, 1987). La toxine est ensuite internalisée par un mécanisme d'endocytose et 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 exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea *et al*, 1999), conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et par conséquent à la mort cellulaire (Figure 3). Les récepteurs Gb3 se trouvent à la surface des cellules épithéliales de la microcirculation sanguine, notamment au niveau rénal et cérébral (AFSSA, 2003).

Une étude utilisant un système de culture d'organe *in vitro* a démontré que l'épithélium intestinal de l'homme pourrait être affecté par la toxine Stx2 en l'absence de récepteur Gb3 (Schüller *et al*, 2004)



Les STEC possèdent sur leur chromosome des bactériophages portant les gènes *stxA* et *B*. La toxine comporte 1 sous-unité A et 5 sous-unités B. Après fixation de la toxine sur le récepteur Gb3 à la surface des cellules eucaryotes, internalisation, transport rétrograde et translocation, l'activité N-glycosidase de la sous-unité A1 sur l'ARN 28S entraîne une inhibition totale des synthèses protéiques et donc la mort de la cellule.

**Figure 03 :** Mécanisme d'action des Shiga-toxines (adapté de Pradel, 2001).

## II.2. Les facteurs d'adhésion

Les facteurs d'adhésion semblent être des éléments majeurs de la pathogénie. Les principaux mécanismes d'adhésion décrits chez les entérobactéries font appel à des fimbriae, des protéines de membrane externe et des lipopolysaccharides (Wagner et Hensel, 2011).

Les entérocytes subissent des lésions spécifiques dites **lésions d'attachement-effacement (A/E)** qui se limitent au colon et au caecum, et qui en résulte de la colonisation du tube digestif par certaines souches STEC (Donnenberg et al, 1993). Les lésions A/E, d'abord décrites chez les EPEC, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal. Cet effacement est dû à une dépolymérisation des filaments d'actine constitutifs des microvillosités (Ismaili et al, 1995). Il s'en suit une accumulation et une

repolymérisation d'actine pour former un piédestal sur lequel les bactéries viennent se lier de façon étroite. Les lésions provoquées par le mécanisme de résorption des microvillosités intestinales seraient à l'origine des symptômes diarrhéiques observés lors des infections. Contrairement aux EPEC qui colonisent l'intestin grêle, l'adhésion des STEC se limite à l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer (Phillips et Frankel, 2000).

### **II.3. Les facteurs plasmidiques**

Le plasmide des STEC est de 90Kb, il porte différents facteurs de virulence. **L'entérohémolysine E-hlyA** a été mise en évidence chez les STEC en 1988 (Beutin et al, 1988). C'est une toxine qui forme des pores dans la membrane cytoplasmique après son insertion dans la membrane, engendrant ainsi une lyse osmotique des cellules (Soloaga et al, 1999). Elle permettrait notamment de stimuler le développement des cellules bactériennes grâce au fer libéré suite à la lyse des hématies.

D'autres facteurs plasmidiques comme la sérine protéase EspP, la catalase peroxydase périplasmique KatP, des toxines de type *Clostridium difficile*-like (Burland et al, 1998) sont impliqués dans la pathogénie des STEC. Par ailleurs, le gène *astA* codant l'entérotoxine East1 a été identifié chez de nombreuses souches STEC et cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.

## CHAPITRE III

### DONNEES EPIDIMIOLOGIQUE DES STEC

#### III.1. EPIDEMIOLOGIE ANIMALE, ENVIRONNEMENTALE ET ALIMENTAIRE

##### III.1.1. Portage animal

###### a. Chez les bovins

Les bovins sont considérés comme le principal réservoir de STEC (Whipp *et al.*, 1994). Les taux de prévalence en STEC chez les bovins en élevages sont très élevés et ces bactéries paraissent omniprésentes dans la population bovine. D'après certaines études, les tests sur fèces de bovins dans différentes fermes du monde montrent des prévalences très variables : de 0,2 à 48,8% pour le sérotype O157:H7 et de 0,4 à 74% pour les non-O157 (Hussein and Sakuma, 2005).

Les souches de STEC isolées dans ces différentes études appartenaient à différents sérogroupes, certains d'entre eux étant connus pour être pathogènes pour l'homme. Il a pu être montré que des troupeaux préalablement négatifs pour *E.coli* O157:H7 devenaient positifs. Inversement, des cheptels positifs pour cette même bactérie devenaient négatifs trois mois après (Zhao *et a.l.*, 1995). Ces résultats suggèrent que l'infection des cheptels à *E.coli* O157:H7 est transitoire et qu'elle nécessite donc l'examen de nombreux animaux sur une période assez longue. D'une manière générale, le portage sain est transitoire (inférieur à 3 mois) mais à l'échelle du troupeau, l'excrétion peut durer plusieurs années avec un pic en été. Ce portage concerne plus les animaux jeunes que les animaux âgés (Wells *et al.*, 1991). Les bovins laitiers sont plus susceptibles d'être porteurs excréteurs de STEC que les bovins de boucherie (Sekiya, 1997).

###### b. Chez d'autres espèces animales

Le portage fécal en STEC des moutons et des chèvres, a fait l'objet de nombreux travaux. Des chiffres élevés de contamination ont pu être rapportés (Beutin *et al.*, 1993 ; Randall *et al.*, 1997). Les sérotypes les plus répondu lors de ces études sont : O91 : NM, O128 :H2 et O146 :H21 (Zhang *et al.*, 2002) .

Les STEC O157 ont été isolés chez d'autres animaux domestiques comme les chevaux, les chiens, les lapins domestiques, les lièvres. Il n'est pas encore bien établi si ces animaux sont des hôtes réels ou de simples vecteurs (contaminés après contact) pour ces microorganismes.

Les porcs ne sont pas considérés comme des réservoirs potentiels des STEC pathogènes pour l'homme. Le portage fécal des porcs testés au niveau des abattoirs varie de 0,2% à 2% en Europe, Japon et aux Etats-Unis et de 8 à 10% en Amérique du Sud (Caprioli et al, 2005).

### **III.1.2. Dans l'environnement**

La contamination fécale est la principale source de contamination de l'environnement et l'apport régulier de STEC à travers les fèces des animaux est en partie responsable de la persistance de ces pathogènes dans l'environnement. En effet, l'épandage de fumiers ou de lisiers (à des fins de fertilisation des sols) peut être un vecteur important de contamination du sol, des cultures et des eaux (profondes ou de surface) et ainsi présenter un risque potentiel de contamination de l'animal et de l'homme. Les STEC semblent pouvoir survivre et conserver leur capacité de virulence (production de Stx1 et/ou Stx2) après survie pendant plusieurs semaines dans l'environnement de la ferme (abreuvoir, fumier et lisier) (Wang et al., 1996 ; Fremaux et al., 2007a), dans les sols (Fenlon et al., 2000) et dans les eaux (Wang et Doyle, 1998). Cette réelle capacité de survie augmente le pouvoir de virulence des STEC.

### **III.1.3. Dans les filières agro-alimentaires**

La contamination des aliments est la plupart du temps liée à une contamination fécale. Elle peut avoir lieu à l'abattoir lorsque l'hygiène de l'abattage n'est pas maîtrisée. Elle peut être liée à une mauvaise hygiène de la traite. Enfin, les végétaux peuvent être contaminés par des effluents tels que les substances d'épandages ou de l'eau contaminée par des déjections animales (Savoie, 2011). Les études épidémiologiques ont montré que les aliments le plus souvent impliqués dans les épidémies à STEC étaient la viande de bœuf insuffisamment cuite et les fromages au lait cru (Mailles *et al.*, 2006).

#### **a. Contamination de la filière lait et produits laitiers**

De nombreuses études se sont intéressées à la présence des STEC dans les produits laitiers (Baylis, 2009). En Angleterre, en 1993, *E. coli* O157:H7 est isolé pour la première fois de lait non pasteurisé (Chapman et al., 1993). La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. Néanmoins, une étude menée *in vitro* a montré l'envahissement des cultures épithéliales mammaires par *E. coli* O157:H7 (Matthews et al., 1997). Ces résultats suggèrent l'existence possible d'une voie de contamination du lait avant la traite.

Concernant la prévalence de *E. coli* O157:H7 ou d'autres STEC dans les laits et produits laitiers, très peu de résultats sont disponibles. Il faut, cependant, souligner la difficulté de

mettre en évidence des bactéries pathogènes peu nombreuses dans les laits de mélange, due au facteur de dilution.

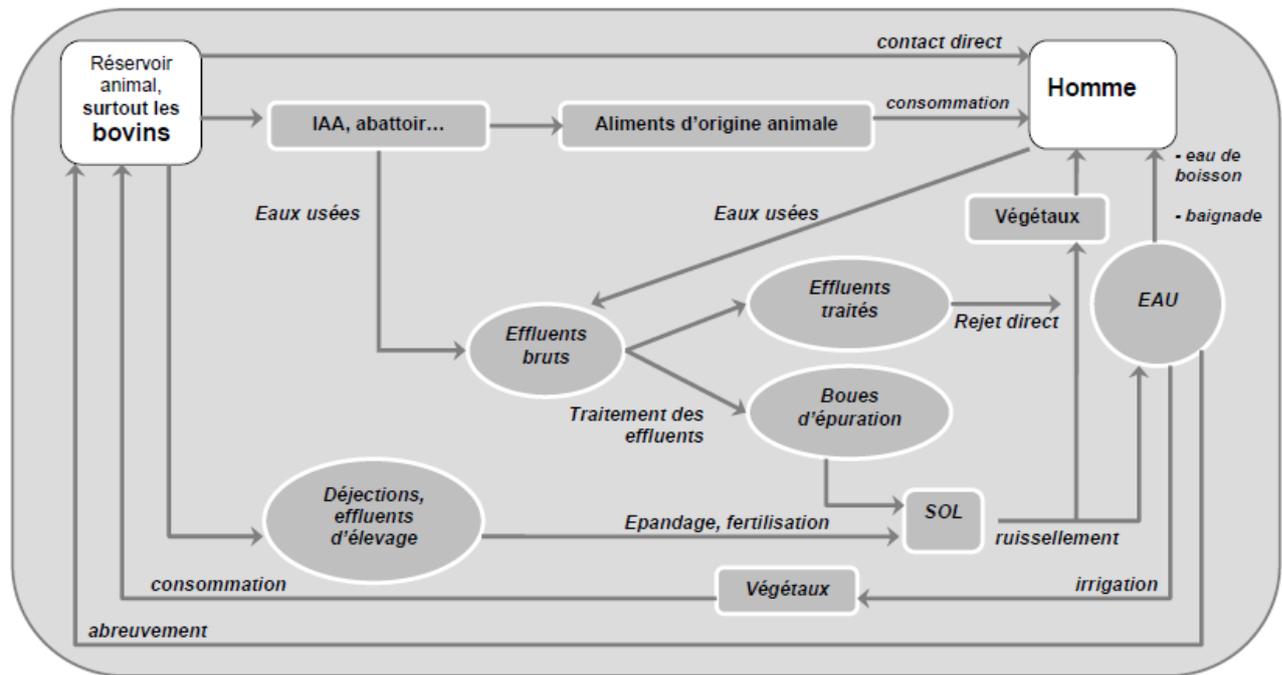
Les laits crus et les fromages ont tout de même entraîné une dizaine d'épidémies mettant en cause *E.coli* O157:H7, mais aussi des STEC non-O157:H7, bien que ces types d'aliments semblent peu contaminés (Casenave *et al.*, 1993; Deschenes *et al.*, 1996; Allerberger *et al.*, 2001). Outre la prévalence de contamination des produits laitiers, on peut alors également s'interroger sur la survie ou la croissance des STEC dans ces produits. Des *E.coli* O157:H7 inoculés dans du lait pasteurisé et non pasteurisé peuvent survivre pendant 28 jours à 5°C, leur nombre augmente à 8 et 15°C et la croissance est maximale à 15°C (Wang *et al.*, 1997). Maher *et al.* (2001) ont montré que *E.coli* O157:H7 était capable de survivre à tous les stades de fabrication de fromages au lait cru, notamment à pâte molle, et ce, pendant plus de 70 jours. Enfin, les résultats d'une étude sur du lactosérum pasteurisé et non pasteurisé indique que *E.coli* O157:H7 est retrouvée dans le lactosérum non pasteurisé sur une période supérieure à 3 semaines pendant le stockage. Cette durée peut-être plus longue dans le petit lait pasteurisé, la contamination ayant eu lieu après la pasteurisation (Marek *et al.*, 2004). Il apparaît donc que de bonnes pratiques d'hygiène lors de la traite ne suffisent pas à elles seules pour assurer une sécurité optimale pour le consommateur de fromage. Le tableau I présente des données générales quant aux fréquences observées de produits laitiers contaminés par des STEC dans différents pays.

La consommation de lait cru (vache ou chèvre) a été associée à plusieurs cas de pathologies en Europe et en Amérique du Nord. La plupart de ces épidémies ont été provoquées par des souches de sérotype O157:H7, mais d'autres souches de sérotypes, moins fréquents, ont eux aussi été pointés du doigt. Il s'agit des sérotypes O22 :H8, O110 :H-, O80 :H- ou encore une souche appartenant au sérogroupe O145. La consommation de fromage à base de lait cru de vache ou de chèvre a elle aussi été impliquée dans des cas épidémiques (Miszczycha.2013).

## **III.2. EPIDIMIOLOGIE HUMAINE**

### **III.2.1. Principaux modes de transmission**

A l'heure actuelle, les 4 principales voies d'infection à EHEC sont l'ingestion d'aliments, la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade), la transmission interhumaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement. La Figure 04 présente les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme.



**Figure 04:** Flux potentiels des STEC. Les flèches indiquent les flux potentiels des STEC entre le réservoir animal et l'homme (AFSSA, 2003).

#### a. Transmission alimentaire

Un grand nombre des infections à *E. coli* O157:H7 a été relié épidémiologiquement à la consommation de denrées animales (Vernozy-Rozand et Montet, 2001). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (Roberts et al., 1995). La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mis en cause (Martin et al., 1994; Orskov et al., 1987; Griffin et Tauxe, 1991; Doyle, 1991; Paton et al., 1996). De même, des produits végétaux contaminés et des produits laitiers ont été à l'origine d'épidémies (Morgan et al., 1993; Cieslak et al., 1993; Ackers et al., 1998; Miller et Kaspar, 1994). Pour certains aliments, l'hypothèse d'une contamination croisée avec de la viande de bœuf ou par l'utilisation d'ustensiles contaminés a été avancée. On peut également citer une contamination par simple contact avec les aliments (Morgan et al., 1988).

#### b. Transmission inter-humaine

Le portage sain humain de STEC existe (Silvestro *et al.*, 2004) mais semble rare et transitoire (Stephan et Untermann, 1999). Cependant, la contamination de personne par contact avec les malades est bien plus fréquente que le portage sain. En effet, des cas de transmission de personne à personne, par contact rapproché avec une ou des personnes ayant eu de la diarrhée, a été observée en milieu familial (Vaillant et Espié, 2002). Cette transmission est d'autant plus importante que l'hygiène générale et plus particulièrement celle des mains est

insuffisante et que les contacts sont étroits. De ce fait, la contamination oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches ou les divers centres de soins (hôpitaux, maisons de retraites...) (Belongia *et al.*, 1993). les centres de soins journaliers (Reida *et al.*, 1994) et aussi dans les centres pénitenciers (CDC, 2012).

### **c. 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. La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infections (Chalmers *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 1998) et d'épidémies à *E. coli* O157 (Holme, 2003 ; Mannix *et al.*, 2007).

### **d. Transmission par contact avec les animaux de ferme et leur environnement**

La contamination se fait généralement par contact direct avec les animaux de ferme et/ou leurs déjections. Le taux de porteurs sains est d'ailleurs plus élevé dans la population en contact permanent avec les animaux (Crump *et al.*, 2002). La contamination par les déjections des animaux a pu être largement documentée lors d'épidémies survenues au cours de festivals ou de campements d'adolescents (Varma *et al.* 2003; Durso *et al.* 2005). Dans ces cas de transmission directe à partir de l'animal, la maladie peut tout autant s'exprimer sous forme sporadique que sous une forme épidémique (Caprioli *et al.*, 2005).

## **III.2.2. PATHOLOGIE HUMAINE**

Les STEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU), les personnes les plus sensibles sont les enfants de moins de 3 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans ou purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte (Tarr, 1995). Le SHU et le PTT sont considérés comme un ensemble de manifestations de microangiopathie thrombotique. Ces affections ont en commun des lésions des cellules endothéliales de la microcirculation, suivies d'un gonflement cellulaire, d'adhérence plaquettaire et de thrombose. Les manifestations sont déterminées par le lit vasculaire le plus atteint : celui des reins dans le SHU, celui du cerveau dans le PTT. Ces deux affections sont caractérisées par une microangiopathie sévère, ainsi que par une réduction marquée du taux des plaquettes et du taux d'hémoglobine (afssa, 2013).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## IV. PARTIE EXPERIMENTALE

La présente étude a porté sur la caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* productrices de Shigatoxines dans le lait de tank, par la caractérisation des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae*.

### IV.1. MATERIEL ET METHODES

#### Cadre de l'étude

L'étude s'est déroulée durant la période de février 2013 à mai 2014. Les prélèvements ont été traité au laboratoire de recherche « ECOQUAPA » de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Blida 1. La caractérisation moléculaire a été réalisé au laboratoire « Gripes et virus respiratoires » de l'institut pasteur d'Algérie (IPA), Annexe Sidi Fredj (Alger).

#### IV.1.1. MATERIEL

##### IV.1.1.1. Prélèvements

La présente étude a porté sur 117 échantillons de lait de tank appartenant aux élevages de bovins de la wilaya de Blida.

Les prélèvements ont été effectués avec la participation du service de collecte du lait cru de vache pour les laiteries de la région d'étude.

La distribution des prélèvements selon la localité sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I** : Répartition des prélèvements par laiteries.

Laiteries	Localités	Nombre de prélèvements
Laiterie 1	Ouled Yaich	16
Laiterie 2	Beni Mared	21
Laiterie 3	Boufarik	12
Laiterie 4	Beni Tamou	9
Laiterie 5	Guerouaou	19
Laiterie 6	Chiffa	40
Total	6	117

##### IV.1.1.2. Matériel non biologique

### a. Kit d'extraction d'ADN

Nous avons utilisé le kit d'extraction d'ADN « InstaGene™ Matrix 20ml » (BIO-RAD)



**Figure 05:** Kit d'extraction d'ADN (photo originale).

### b. Amorces

Pour la mise en évidence de la séquence nucléotidique conservée des gènes *stx1* & *stx2* et pour la recherche des gènes *stx1* et *stx2* séparément ainsi que le gène *eae*, nous avons utilisé les amorces produites par Eurogentec (France) rapportées dans le tableau.

**Tableau II :** Amorces oligonucléotidiques utilisées dans la réaction de PCR.

Facteurs de virulence	Code primer	Séquence (5'-3')	Poids du produit (bp)	Références
<i>stx1</i>	VT1-1	TTAGACTTCTCGACTGCAAAG	530	Woodward et al., 1992 Padola et al., 2004
	VT1-2	TGTTGTACGAAATCCCCTCTG		
<i>stx2</i>	VT2-1	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807	Woodward et al., 1992 Padola et al., 2004
	VT2-2	GACATTCTGGACTCTCTT		
<i>eae</i>	B52	AGG CTT CGT CAC AGT TG	570	Fremaux et al., 2006 ; Reid et al., 1999
	B53	CCA TCG TCA CCA GAG GA		

### c. Kit PCR :

Nous avons utilisé le kit Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega) qui comporte les réactifs suivants :

- 5X Green or Colorless Go Taq® Flexi Buffer
- MgCl<sub>2</sub>, 25mM
- dNTP (10mM)

- Taq polymérase (5U/μl)

#### **d. Petit matériel et équipements de laboratoire**

- **Petit matériel**

Nous avons utilisé les équipements du laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire. Tout le matériel et les équipements utilisés dans le présent travail sont rapportés en annexe (Cf. annexe 1)

- **Thermocycleur :**

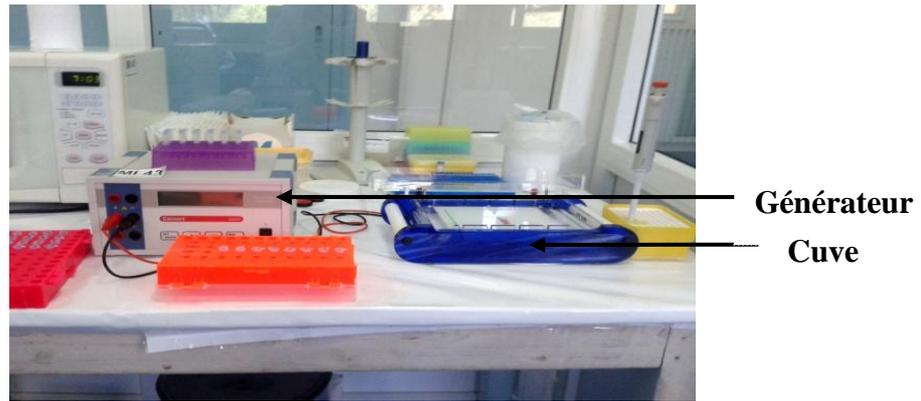
Nous avons utilisé le thermocycleur « techne TC-312 » pour la réalisation de la PCR.



**Figure 06 :** Thermocycleur Techne TC-312 (photo originale)

- **Dispositif d'électrophorèse :**

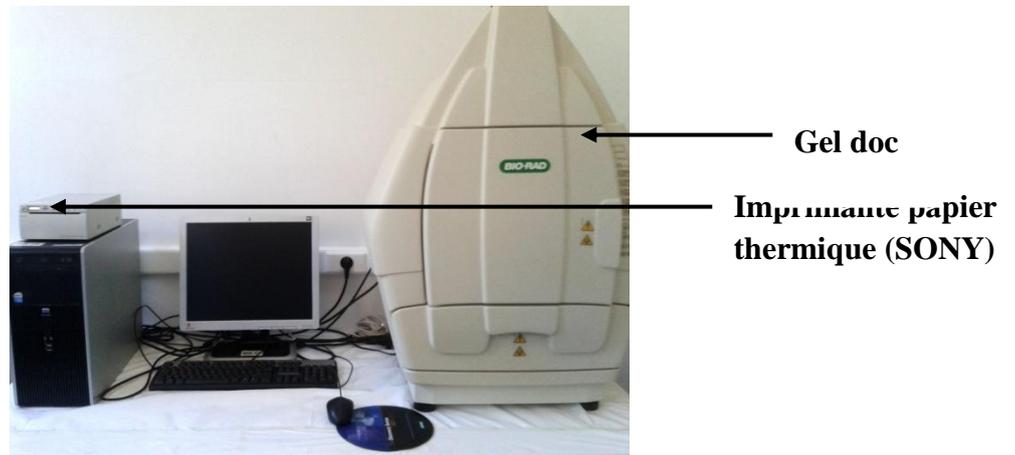
Nous avons utilisé le dispositif d'électrophorèse comportant une cuve horizontale avec support pour gel et peignes de marque FICHERBRAND et un générateur de courant électrique de marque CONSORT.



**Figure 07 :** Dispositif d'électrophorèse (photo originale)

○ **Dispositif de visualisation de migration sur gel :**

Nous avons utilisé le dispositif de visualisation de migration sur gel de type « Gel Documentation system XR (BIO-RAD) ».



**Figure 08 :** dispositif de visualisation de migration (photo originale).

## IV.1.2. METHODES

Notre étude expérimentale a comporté trois étapes, à savoir : le traitement des prélèvements de lait, l'extraction d'ADN et l'analyse par PCR.

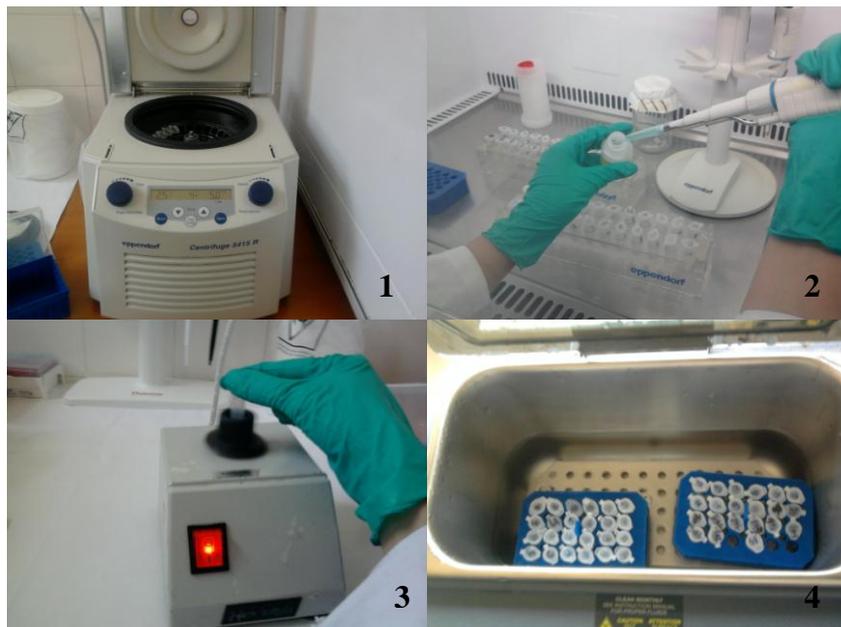
### 1. Traitement des prélèvements de lait

- Centrifuger 50 ml de lait de tank a 6000 rpm pendant 10min
- Laver le culot obtenu avec du PBS à pH7,4 et reprendre cette opération deux fois de suite puis ajouter 20ml de TSB au culot et enrichir le milieu à 37°C pendant 24h.
- Prendre 1ml du milieu d'enrichissement, centrifuger à 6000 rpm pendant 10mn et congeler pour extraction

### 2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée sous hotte à flux laminaire dans un box dédié à l'extraction sur les recommandations du protocole du kit InstaGene™Matrix à partir du culot de centrifugation.

- Additionner 200µl d'Insta Gene Matrix au culot bactérien et incuber à 56°C pendant 30 min (Cf.photo 2 figure 09).
- Vortexer à grande vitesse pendant 10 sec et placer le tube à 100°C pendant 8 min (Cf.photos 3 et 4, figure 09).
- Vortexer à grande vitesse pendant 10 sec et centrifuger à 12000 rpm pendant 3 mn.
- Utiliser 20µl du surnageant résultant pour 50µl de PCR et stoker le reste à -20°C.



**Figure 09** : Les étapes d'extraction de l'ADN (photos originales)

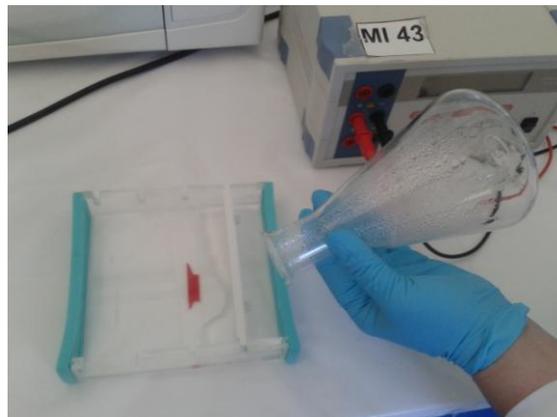
## **Contrôle de qualité des ADN extraits :**

Le contrôle de la qualité des ADN extraits a été réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% comme suit :

- **Préparation du gel d'agarose :**

Préparer un gel d'agarose à 1% dans du TAE x1 (Tris-Acetate-EDTA) :

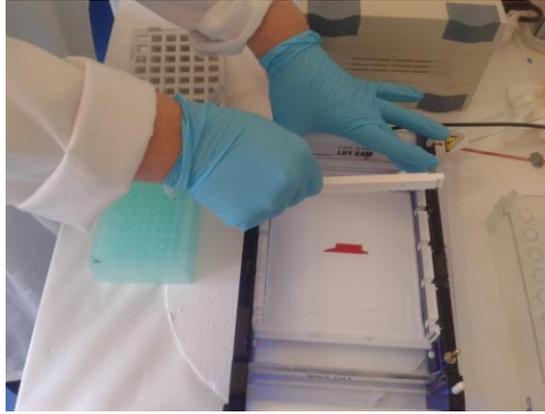
- Préparer le support de coulage en obturant de façon étanche avec un ruban adhésif les 2 cotés ouverts de ce support ; disposer dans les encoches les peignes permettant de créer les puits de dépôt des ADN.
- Peser 1 g d'agarose et mettez-le dans un Erlenmeyer de 250 ml.
- Ajouter 100 ml de TAE.
- Mélanger et faire bouillir dans un four à micro ondes jusqu'à ce que la solution soit limpide.
- Laisser refroidir le liquide jusqu'à pouvoir toucher le récipient sans se bruler.
- Verser l'agarose dans la cuve préparée et laisser solidifier le gel
- Retirer le ruban adhésif.



**Figure 10:** Préparation du gel d'agarose (photo originale).

- **Préparation de la cuve à électrophorèse :**

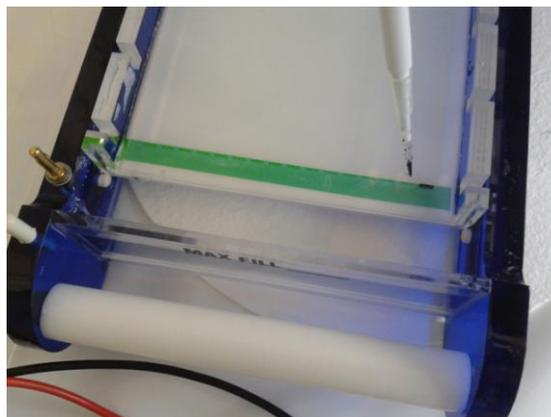
- Placer le gel (toujours sur son support) dans la cuve à électrophorèse, les puits disposés coté cathode.
- Remplir la cuve avec le tampon TAE jusqu'à ce que le gel soit recouvert de quelques mm de tampon.
- Retirer alors délicatement et bien verticalement les peignes.



**Figure 11** : Le retrait des peignes (photo originale).

- **Dépôt des échantillons :**

- Déposer 5 $\mu$ l de MT additionné de 2 $\mu$ l de tampon de chargement (TC) et 15 $\mu$ l de chaque échantillon à analyser additionné de 2 $\mu$ l de tampon dans les puits correspondants.
- Fermer la cuve.
- Brancher la cuve au générateur de courant.
- Appliquer une tension de 100V correspondant à environ 1h de migration.
- Couper l'alimentation quand le colorant a parcouru la distance requise.
- Débrancher le générateur de la cuve.
- Introduire le gel sans support dans un bain de BET à 10 mg/ml pendant 20 min.



**Figure 12** : Dépôt des échantillons (photo originale).

- **Lecture :**

Egoutter le gel et le disposer dans l'automate Gel Doc qui permet de le visualiser et le photographier. Dans cet appareil, le gel est éclairé sous ultraviolets afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes. La révélation se fait grâce au BET qui devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets. Le gel peut être

alors visualisé et photographié avec un appareil photo numérique. L'interprétation des résultats est faite grâce à la comparaison avec l'échelle de marqueur de taille moléculaire (MT).

### 3. Analyse par PCR :

Pour la réalisation de la PCR nous avons travaillé dans un box dédié à la préparation du Mix sous hotte PCR HEPA/UV3.

Chaque échantillon analysé par PCR a été traité comme suit :

- Déposer dans chaque cône Eppendorf 10 µl 5x Green or Colorless Go taq Flexi Buffer (1x), 3µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), 1µl de dNTP (0.2mM), 1µl de l'amorce 1 (0.4µM), 13.7µl d'eau distillé stérile, 0.3µl de taq polymérase (Go taq DNA polymerase) (5U/µl), soit 40µl du Mix et rajouter :
  - 20µl d'ADN de chaque échantillon à analyser pour un volume final de 50µl.
  - 5µl d'ADN de la souche de référence EDL933 et 15µl d'eau distillé stérile pour le contrôle positif.
  - 10µl d'eau distillée pour le contrôle négatif.

Le Mix ayant servi aux réactions de PCR a été préparé à la concentration finale comme rapporté dans le tableau.III

**Tableau III:** Concentrations et volumes des réactifs utilisés dans la PCR

Réactifs	Volume final (µl)	Concentration Finale
5X Green or Colorless Go Taq® Flexi Buffer <sup>1</sup>	10	1X
MgCl <sub>2</sub> , 25mM <sup>1</sup>	2-8	1,0-4,0 mM
dNTP (10mM)	1	0,2mM pour chaque dNTP
Amorce amont (20µM)	X	0,1-1,0µM
Amorce en aval (20µM)	Y	0,1-1,0µM
Taq polymérase (5u/µl)	0,25	1,25u
ADN	Z	<0,5µg/50µl
Eau distillée stérile qsp	50	

L'amplification a été réalisée selon le programme suivant : 1 cycle de dénaturation à 94° C pendant 3min ; 35 cycles [(dénaturation à 94°C pendant 90 sec), (hybridation à 59°C pendant 90 sec) et (élongation à 72°C pendant 5min)], suivi d'un (1) cycle d'élongation finale à 72°C pendant 5min.

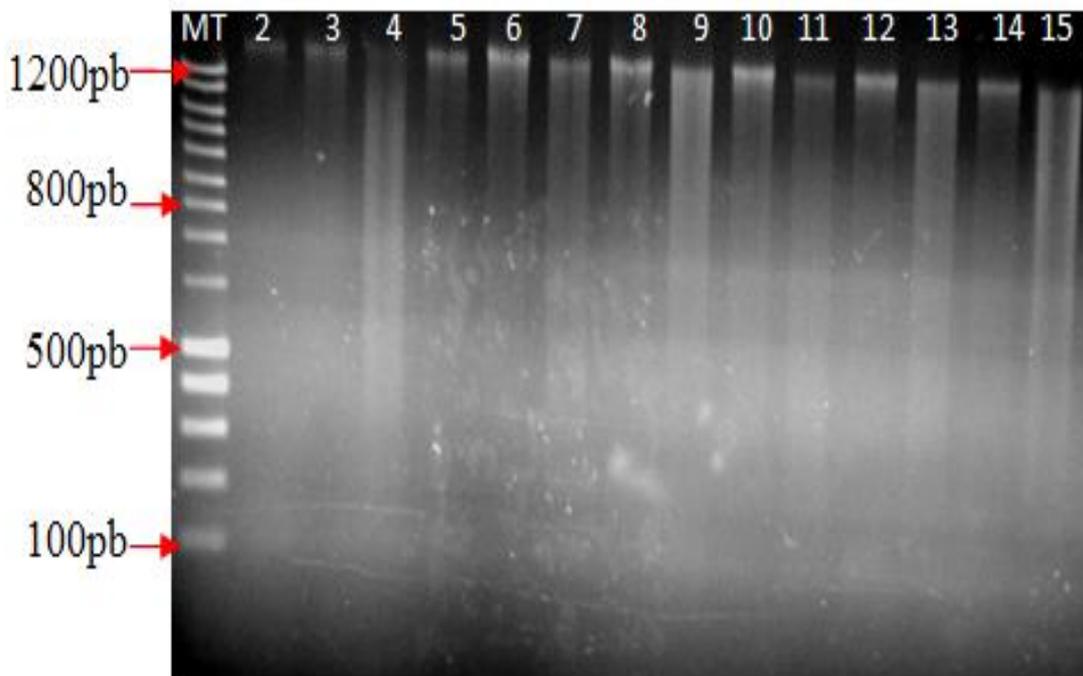
Les échantillons analysés pour la recherche du gène *stx1*, *stx2* et *eae*.

## IV.2. RESULTATS

L'extraction d'ADN à partir des culots de lait a permis l'obtention de 117 éluats (ADN).

### 1. Qualité des ADN extraits :

Le contrôle de la qualité des ADN extraits est représenté par les profils électrophorétiques obtenus sur la photographie du gel rapporté en figure 13.



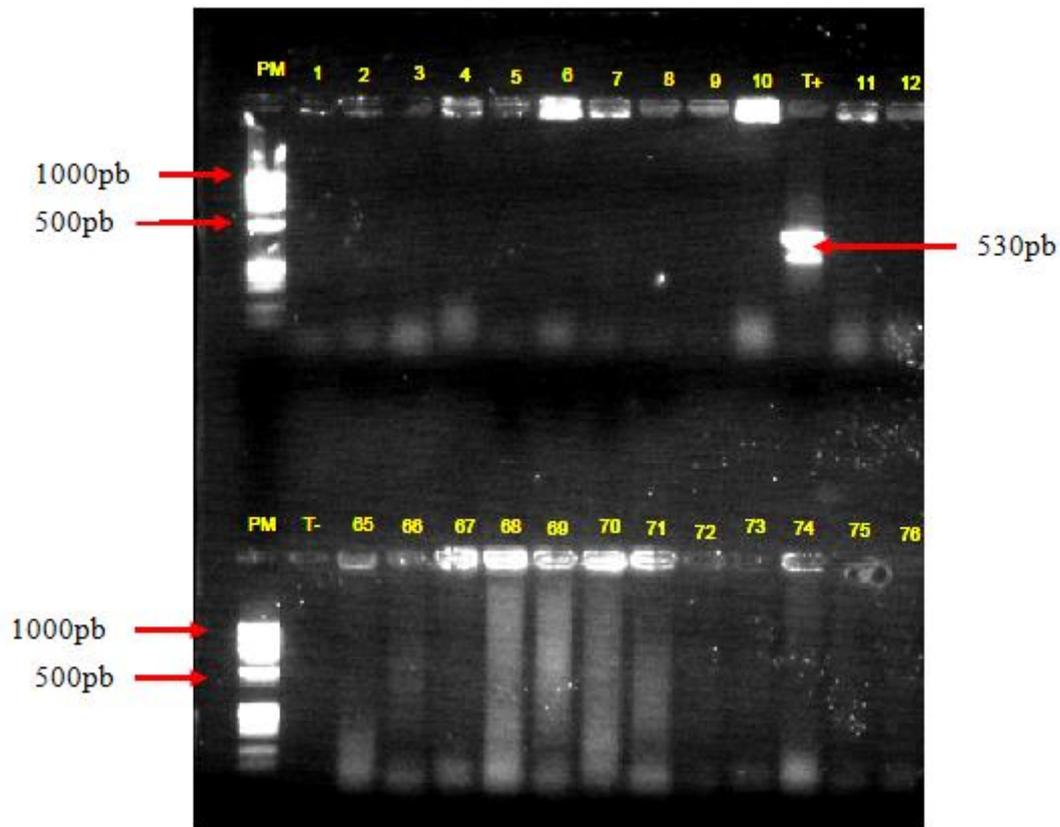
MT : marqueur de taille ; de 2 à 15 : échantillons analysés

**Figure 13** : Photo du gel de contrôle de la qualité (14 échantillons d'ADN extraits + MT)  
(photo originale).

Les profils électrophorétiques obtenus sont révélateurs de la bonne qualité des ADN extraits.

## 2. Recherche du gène *stx1* :

Nous rapportons sur la photographie du gel d'électrophorèse (figure 14), les profils électrophorétiques obtenus sur les produits de PCR correspondant à la recherche du gène *stx1*.



PM : marqueur de taille ; T- : témoin négatif ; T+(EDL933) : témoin positif; Toutes les autres lignes portant correspondent aux échantillons négatifs (absence de gène *stx1*).

**Figure 14:** Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence du gène *stx1* (photo originale).

Les profils électrophorétiques correspondant à la migration des produits PCR montrent :

- La présence d'une bande à 530 pb chez le témoin positif (EDL933, ligne 12 de la première série) et l'absence de bande chez le témoin négatif (eau distillée, ligne 2 de la deuxième série).
- L'absence de bande à 530 pb dans les produits PCR de tous les échantillons analysés témoignant de l'absence du gène *stx1*.

### 3. Recherche du gène *stx2* :

Nous rapportons sur la photographie du gel d'électrophorèse (figure 15), les profils électrophorétiques obtenus sur les produits de PCR correspondant à la recherche du gène *stx2*.



MT : marqueur de taille ; T- : témoin négatif ; EDL933 : témoin positif ; Les lignes portant les numéros 2, 3, 5, 10, 11, 12, 13, 17, 18 correspondent aux échantillons négatifs alors que la ligne portant le n° 21 correspond à l'échantillon positif (présence de gène *stx2*).

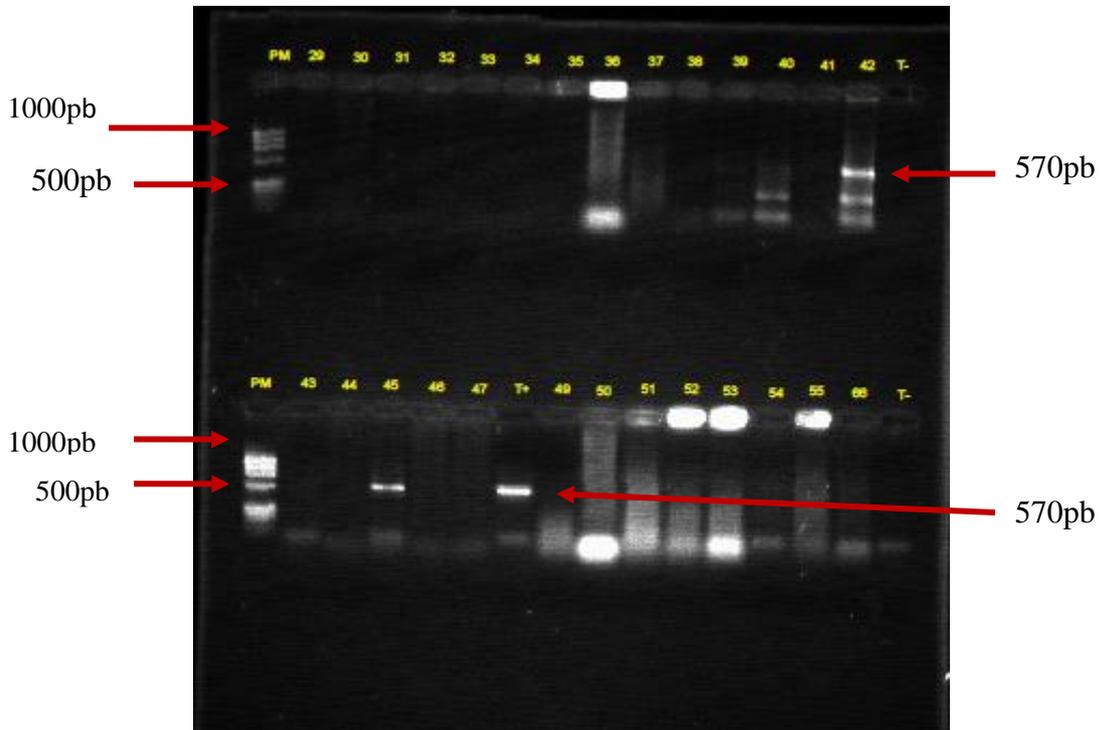
**Figure 15:** Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence de gène *stx2* (Photo originale).

Les profils électrophorétiques correspondant à la migration des produits PCR montrent :

- La présence d'une bande à 807 pb chez le témoin positif (EDL933, ligne 13 de la première série) et l'absence de bande chez le témoin négatif (eau distillée, ligne 12 de la première série).
- La présence d'une bande à 807 pb dans un seul produit PCR correspondant à l'échantillon portant identification n° 21 (ligne 13) témoignant de la présence du gène *stx2*.

#### 4. Recherche du gène *eae* :

Nous rapportons sur la photographie du gel d'électrophorèse (figure 16), les profils électrophorétiques obtenus sur les produits de PCR correspondant à la recherche du gène *eae*.



PM : marqueur de taille ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif (EDL933) ; La ligne portant le numéro 42 de la première série et la ligne portant le numéro 45 de la deuxième série correspondent aux échantillons positifs (présence du gène *eae*).

**Figure16** : Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence du gène *eae* (photo original)

Les profils électrophorétiques correspondant à la migration des produits PCR montrent :

- La présence d'une bande à 570 pb chez le témoin positif (EDL933, ligne 7 de la deuxième série) et l'absence de bande chez le témoin négatif (eau distillée, dernière ligne de la première série).
- La présence d'une bande à 570 pb dans les produits PCR des échantillons analysés portant n° d'identification 42 de la première série et 45 de la deuxième série témoignant de la présence du gène *eae*.

Les résultats de la recherche des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* sont rapportés dans le tableau VI.

Tableau VI: Résultats de la recherche des gènes *stx1*, *stx2* et *eae*

Laits analysés (n = 117)	Gènes de virulence		
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>Eae</i>
Laits positifs	00	01	06
<b>%</b>	<b>00</b>	<b>0,85</b>	<b>5,12</b>

Il en ressort ce qui suit :

- L'absence du gène *stx1* dans tous les échantillons analysés.
- La présence du gène *stx2* dans un (1) seul échantillon, soit un taux de 0,85%.
- La présence du gène *eae* dans six (6) échantillons, soit un taux de 5,12%.

Le traitement des résultats obtenus par rapport au profil génétique (pathotype) est rapporté dans le tableau suivant :

Tableau V: Profils génétiques des souches d'*Escherichia coli* isolées de fèces

Pathotype	Facteurs de virulence			Souches	
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>Eae</i>	N	%
STEC	+	-	-	0	0
	+	-	+	0	0
	-	+	-	01	0,85
	-	+	+	0	0
	+	+	+	0	0
	+	+	-	0	0
EPEC	-	-	+	06	5,12

EPEC : Enteropathogen *Escherichia coli* ; STEC : shigatoxin *Escherichia coli*.

Au total, nous avons obtenu deux (02) pathotypes :

- Le premier, révélateur de la présence d'*Escherichia coli* Shigatoxines portant le gène *stx2* seul.
- Le second, révélateur de la présence d'*Escherichia coli* Enteropathogène portant le gène *eae* seul,

### IV.3.DISCUSSION

1. La recherche des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* dans les 117 échantillons de lait d'élevages a révélé un taux de contamination de STEC (*stx1* et/ou *stx2*) de 0,85% sur l'ensemble des échantillons analysés. L'échantillon positif a révélé la présence du gène *stx2* seul.

Très peu de données sont disponibles sur la contamination des laits et produits laitiers par *Escherichia coli* shigatoxines. Cette situation semble trouver une explication par rapport à la difficulté de mettre en évidence des bactéries pathogènes peu nombreuses dans les laits de mélange, due au facteur de dilution (Afssa., 2003). Cependant, le lait et les produits laitiers ont été à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC dans le monde. (Guh et al., 2010. Anses, 2010).

La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. (hussein et al., 2005). Néanmoins, une étude *in vitro* a montré l'envahissement des cultures épithéliales mammaires par *E.Coli* O157:H7 (Matthews et al., 1997). Ces résultats suggèrent l'existence possible d'une source mammaire de contamination du lait (Lira et al., 2004; Matthews et al., 1997; Stephan et al., 1999).

Plusieurs études ont évalué la prévalence de *E. Coli* O157H7 ou d'autres STEC dans les laits et produits laitiers (Klie H et al., 1997, Vernozy-Rosand C et al., 2002). En Europe les travaux de Trevisani et al, (2014) sur le lait de tank et les filtres à lait ont montré respectivement que 12.5% et 30.2% des échantillons sont positifs pour *stx1* et/ou *stx2*. Une autre étude qui a été réalisé en France a montré que 21% des échantillons de lait analysés portait le gène *stx1* et/ou *stx2* (Madic et al., 2009) tandis qu'en Allemagne aucun échantillon de lait n'était positif pour STEC (Messelhäusser et al., 2008).

Dans les autres régions du monde la prévalence de STEC dans le lait est de 17.47% en Iran (Mohammadi et al, 2013), 3.2% en USA (Cobbold et al., 2008), une autre étude réalisé par Kessel et al, (2011) sur le lait de tank et les filtres à lait a révélé respectivement que 15.2% et 51% des échantillons sont positifs pour *stx1* et/ou *stx2*. Cette différence dans les résultats peut être due à plusieurs facteurs comme la location géographique, la saison, le nombre d'animaux dans la ferme, l'hygiène et les méthodes de détection utilisées (Mohammadi, 2013).

Selon Boerlin et al., (1999) les souches EHEC produisant des Stx2 sont davantage associées au risque de développer un SHU que les souches productrices de Stx1. Cette hypothèse se trouve confortée par Siegler et al., (2003) qui rapportent que les Stx2 sont 1000 fois plus

toxiques que les Stx1 sur des cellules endothéliales rénales humaines en culture et davantage associées à l'apparition de SHU chez des singes de laboratoire

Dans la présente étude, le portage seul du gène *stx2* de notre échantillon positif ne suffit pas pour le considérer comme pathogène car il ne porte pas le gène *eae* et le pouvoir pathogène des STEC est corrélé au nombre de facteurs de virulence où la présence du gène *eae* est considérée comme essentielle (Afssa, 2003)

**2.** La présence du gène *eae* a été mise en évidence dans 5.2% des échantillons de lait analysés, ce qui révèle la présence des EPEC dans les laits d'élevages.

Sur la base des résultats obtenus dans l'étude réalisée par l'institut de veille sanitaire français en 2007 qui montre que la souche O26 :H11, isolée des selles des enfants présentant un SHU dû à la consommation de camembert, porte un profil de virulence *stx-/eae+*, nous pouvons dire que le portage du gène *eae* en l'absence du gène *stx* dans nos échantillons positifs n'exclut pas leur pathogénicité .

Cependant, il est à noter que la mauvaise qualité hygiénique du lait a été rapportée dans de nombreuses études dans la même région. Selon Baazize et al., (2006), la contamination des lait de mélange par les coliformes a été estimé à 80,13% et par la bactérie *Escherichia Coli* à 17.8%. On peut considérer que la contamination fécale indirecte est vraisemblablement la voie majeure de la contamination des laits. A partir de ces données nous pouvons dire que la contamination des laits par les *E. coli* shigatoxine est probable. En effet selon Gasseem (2012), le portage de STEC dans les fèces de vaches laitières est de 30.5% dans les élevages bovins laitiers de la même région d'étude.

#### **IV.4. CONCLUSION**

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence des STEC dans les échantillons de lait d'élevages bovins laitiers de la wilaya de Blida.

En effet, le lait et les produits laitiers sont à l'origine de différents foyers épidémiques à STEC à travers le monde. Actuellement, la voie de contamination du lait retenue est celle à partir des matières fécales de bovins lors de la traite.

D'après nos résultats, la contamination fécale indirecte est vraisemblablement la voie majeure de contamination du lait.

En Algérie il faut prendre les mesures d'hygiène nécessaire au niveau de différentes exploitations qui permettent d'éviter la dissémination des bactéries dans les étables, les mamelles et lors de la traite pour éviter la contamination accidentelle du lait.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**-Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.M., and Slutsker, L.** (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* **177**: 1588-1593.

**-AFSSA.** (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC).

**-AFSSA.** (2008). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines considérées comme pathogènes pour l'homme. *Saisine n°2008-SA-0122*.

<http://www.afssa.fr/Documents/MIC2008sa0122.pdf>.

**-AFSSA.** (2010). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. *Saisine n°2010-SA-0031*.

<http://www.afssa.fr/Documents/MIC2010sa0031.pdf>.

**-Allerberger F., Wagner M., Schweiger P., Rammer H.P., Resch A., Dierich M.P., Friedrich A.M. and Karch H.** (2001) "*Escherichia coli* O157 infections and unpasteurized milk." *Euro Surveill* **6**:147-151.

**-Amieva, M. R.** 2005. "Important bacterial gastrointestinal pathogens in children: a pathogenesis perspective." *Pediatr Clin North Am* **52**(3): 749-77.

**-Andrade, J. R., Da Veiga, V. F., De Santa Rosa, M. R. & Suassuna, I.** (1989). An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **28**, 49-57.

**-Baylis C.L.** (2009) Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *international journal of dairy technology*. **62** 293-307.

**Belongia, E.A., Osterholm, M.T., Soler, J.T., Ammend, D.A., Braun, J.E., and MacDonald, K.L.** (1993) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *Jama* **269**: 883-888.

**-Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S. and Scheutz F.** (1993) "Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals." *J Clin Microbiol* **31**: 2483-2488.

- Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Orskov, I. & Orskov, F. (1988).** Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 267, 576–588.
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P., and Gyles, C.L. (1999)** Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 37: 497-503.
- Boerlin, P. 1999.** Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* 56:735-741.
- Brenner, D., Fanning, G., Miklos, G. et Steigerwalt, A. 1973.** Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int J Syst Bacteriol* 23: 1-7.
- Burland, V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Sofia, H.J. et Blattner, F.R. 1998.** The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26: 4196-4204.
- Calderwood, S. B. and J. J. Mekalanos. 1987.** "Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus." *J Bacteriol* 169(10): 4759-64.
- Calderwood, S.B., Akeson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J. et Griffin, P.M. 1996.** Proposed New nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 62: 118-119.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H. & Oswald, E. (2005).** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 36, 289 311.
- Casenave C., Desenclos J.C., Maillot E., Benoit S., Deschesnes G., Nivet H., Grimont F., Baron S., Mariani P. and Grimont P. (1993)** "Ecllosion de syndrome hémolytique et urémique dans une commune rurale du Cher." *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1993: 222-224.
- Cassels, F.J. et Wolf, M.K. 1995.** Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol* 15: 214-226.
- CDC. (2012).** Centers for Disease Control - Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 infections associated with a correctional facility dairy - Colorado, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 61, 149–152.
- Chalmers, R.M., Aird, H., Bolton, F.J., 2000.** Waterborne *Escherichia coli* O157. *Symp. Ser.Soc. Appl. Microbiol.* 29, 124S-132S.
- Cieslak, P.R., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Gensheimer, K.F., Beckett, G., Buffington, J., and Smith, M.G. (1993)** *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* 342: 367.
- Cobbold, R. N., Davis, M. A., Rice, D. H., Szymanski, M., Tarr, P. I., Besser, T. E. & Hancock, D.D. (2008).** Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates

of non-O157 Shiga toxinogenic *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. *J Food Prot* 71, 1023–1027.

**-Cookson, S.T. et Nataro, J.P.** 1996. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb Pathol* 21: 421-434.

**-Crump, J.A., Sulka, A.C., Langer, A.J., Schaben, C., Crielly, A.S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D.M., Hunter, S.B., Hoekstra, R.M., Wong, S.K., Griffin, P.M., and Van Gilder, T.J.** (2002) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* 347: 555-560.

**-Deschenes G., Casenave C., Grimont F., Desenclos J.C., Benoit S., Collin M., Baron S., Mariani P., Grimon P.A. and Nivet H.** (1996) "Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese." *Pediatr Nephrol* 10:203-205.

detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and

**-Doireau V., Llanas B., Espié E., and Vaillant V.** (2006). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of ground beef, France 2005. *6th International Symposium on STEC, Melbourne.*

**-Donnenberg, M.S., Tzipori, S., McKee, M.L., O'Brien, A.D., Alroy, J. et Kaper, J.B.** 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* 92: 1418-1424.

**-Doyle, M.P.** (1991) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* 12: 289-301.

*E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg* 267: 576-588.

**F.M.** 1999. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a nontransmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* 31: 1013-1024.

**-Feng, P., Lampel, K.A., Karch, H. et Whittam, T.S.** 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 177: 1750-1753.

**-Fenlon, D. R. & Wilson, J.** (2000). Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented

**-Fremaux B., S. Raynaud, L. Beutin, C. Vernozzy Rozand.** (2006). Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Veterinary Microbiology* 117. 180–191.

**-Fremaux, B., Delignette-Muller, M. L., Prigent-Combaret, C., Gleizal, A. & Vernozzy Rozand, C.** (2007a). Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. *J Appl Microbiol* 102, 89–99.

**-Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., and Karch, H.** (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185: 74-84.

- Gannon, V.P., Teerling, C., Masri, S.A. et Gyles, C.L.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol* **136**: 1125-1135.
- Gassem Wahiba,** (2012) Caractérisation moléculaire des Shigatoxines .
- Griffin, P.M., and Tauxe, R.V.** (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.
- Grimont, P.** 1987. Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect*, 6-10.
- Guh, A., Phan, Q., Randall, N., Purviance, K., Milardo, E., Kinney, S., Mshar, P., Kasacek, W. and Cartter, M.** (2010) Outbreak of *Escherichia coli* O157 Associated with Raw Milk, Connecticut, 2008. *Clin. Infect. Dis.* 51(12): 1411-1417.
- Hideki Kobayashi, Jun Shimada, Muneo Nakazawa, Tetsuo Morozumi, Tarja Pohjanvirta, Sinikka Pelkonen et Koshi Yamamoto.** (2001). Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 67, N°1, 484-489
- Holme, R.** (2003). Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol* 47, 1–6.
- Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T. et Acheson, D.W.** 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **67**:6670-6677.
- Hussein, H. S. & Sakuma, T.** (2005a). Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci* 88, 450–465.
- Hussein, H. S. & Sakuma, T.** (2005b). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: pre- and postharvest control measures to ensure safety of dairy cattle products. *J Food Prot*
- Ismaili, A., Philpott, D. J., Dytoc, M. T. & Sherman, P. M.** (1995). Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63, 3316–3326.
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Johnson, R.P., Odorico, V.G., Alves, D., Rahn, K., Wilson, J.B., Welch, M.K., and Khakhria, R.** (1998) *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol Infect* **120**: 17-20.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. et Kaper, J.B.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7839-7843.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. et Mobley, H.L.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 123-140.

**-Klie, H., Timm, M., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K.W., and Steinruck, H.** (1997) [Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **110**: 337-341.

**-Konowalchuk, J., Speirs, J.I. et Stavric, S.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**: 775-779.

laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157. *Lett Appl Microbiol* **30**, 118–121.

**-Le Minor, L., Popoff, M.Y. et Bockemuhl, J.** 1990. Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **141**: 1173-1177.

**-Lea, N., Lord, J.M. et Roberts, L.M.** 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.

**-Levine, M.M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**: 377-389.

**-Lindgren, S.W., Melton, A.R. et O'Brien, A.D.** 1993. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun* **61**: 3832-3842

**-Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. et Karmali, M.** 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**:8834-8839.

**-Lira, W. M., Macedo, C. & Marin, J. M.** (2004). The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J Appl Microbiol* **97**, 861–866.

**-Louise, C.B. et Obrig, T.G.** 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7 derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* **172**: 1397-1401.

**-Madic, J., Vingadassalon, N., De Garam, C. P., Marault, M., Scheutz, F., Brugère, H., Jamet, E. & Auvray, F.** (2009). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2035–2041.

**-Maher M.M., Jordan K.N., Upton M.E. and Coffey A.** (2001). "Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk." *J Appl Microbiol* **90**: 201-207

**-Mailles, A., Mariani-Kurkdjian P., Vernozy-Rozand C., Grimont F., Pihier N., Bingen E., Horen B.,**

**-Mannix, M., Whyte, D., McNamara, E., O Connell, N., Fitzgerald, R., Mahony, M., Prendiville, T., Norris, T., Curtin, A. & other authors.** (2007). Large outbreak of *E. coli* O157 in 2005, Ireland. *Euro Surveill* **12**.

- Marek P., Nair M.K., Hoagland T. and Venkitanarayanan K.** (2004) "Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey." *Int J Food Microbiol* **94**: 1-7.
- Martin, D.R., Uhler, P.M., Okrend, A.J.G., and Chill, J.Y.** (1994) Testing of bob calf fecal swabs for the presence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* **57**: 70-72.
- Matthews, K. R., Murdough, P. A. & Bramley, A. J.** (1997). Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **82**, 197–203.
- Maurer Claire Irène ;** 2009. Contribution à l'étude de l'expression du gène stx2 chez des souches STEC d'origine bovine soumises ou non à des conditions d'induction par l'enrofloxacin.
- Mohammadi,P., Abiri,R.,Rezaei ,M.,Salmanzadeh Ahrabi S.**(2013) **Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran.** *Iranian journal of microbiology* Volume 5 Number 3:233-238
- Montet, M. P., Jamet, E., Ganet, S., Dizin, M., Miszczycha, S., Dunière, L., Thevenot, D. & Vernozzy-Rozand, C.** (2009). Growth and Survival of Acid-Resistant and Non-Acid-Resistant Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains during the Manufacture and Ripening of Camembert Cheese. *Int J Microbiol* 2009, 653481.
- Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B., and Majid, F.** (1993) Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* **111**: 181-187.
- Morgan, G.M., Newman, C., Palmer, S.R., Allen, J.B., Shepherd, W., Rampling, A.M., Warren, R.E., Gross, R.J., Scotland, S.M., and Smith, H.R.** (1988) First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect* **101**: 83-91.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B.,** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
- O'Brien, A. D., LaVeck, G. D., Thompson, M. R. & Formal, S. B.** (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**, 763–769.
- Padola N.L., Sanz M.E., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Etcheverria A.I., Arroyo G.H., Usera M.A., et Parma A. E.** (2004). Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Veterinary Microbiology* **100** : 3-9.
- Paton, A.W., Ratcliff, R.M., Doyle, R.M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J.A., and Paton, J.C.** (1996) Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **34**: 1622-1627.

- Phillips, A.D. et Frankel, G.** 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**: 1496-1500
- Pohl, P.** 1993. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de médecine vétérinaire* **137**:325-333.
- Pradel, N., Boukhors, K., Bertin, Y., Forestier, C., Martin, C. et Livrelli, V.** 2001. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2460-2468.
- Reid S. D., D. J. Betting, and T. S. Whittam.**( 1999.) Molecular Detection and Identification of Intimin Alleles in Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37(8): 2719–2722.
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K. et Whittam, T.S.** 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**: 64-67.
- Reida, P., Wolff, M., Pöhls, H. W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksić, S., Karch, H. & Bockemühl, J.** (1994). An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriol* 281, 534–543.
- 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. et Cohen, M.L.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681-685.
- Roberts, T.A.** (1995) Microbial growth and survival: developments in predictive modelling. *Int. Biodeter. Biodegr.* : 297-309.
- S. Yamasaki, Z. Lin, H. Shirai, A. Terai, Y. Oku, H. Ito, M. Ohmura, T. Karasawa, T. Tsukamoto, H. Kurasono et Y. Takeda.**( 1996.) Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligonucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* **40** : 345-352
- Savoie, F., Rozand, C., Bouvier, M., Gleizal, A. & Thevenot, D.** (2011). Optimized enrichment for the detection of *Escherichia coli* O26 in French raw milk cheeses. *Lett Appl Microbiol* 52, 603–609.
- Schuller, S., Frankel, G. et Phillips, A.D.** 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol* **6**: 289-301.
- Sekiya J.** (1997) "*Escherichia coli* O157:H7 in livestock in Japan." *Rev Sci Tech* **16**: 391-394.
- Siegler, R.L., Obrig, T.G., Pysher, T.J., Tesh, V.L., Denkers, N.D., Taylor, F.B.** (2003). Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **18**(2): 92-96.-

- Silvestro, L., Caputo, M., Blancato, S., Decastelli, L., Fioravanti, A., Tozzoli, R., Morabito, S. & Caprioli, A.** (2004). Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy. *Epidemiol Infect* 132, 915–919.
- Soloaga, A., Veiga, M.P., Garcia-Segura, L.M., Ostolaza, H., Brasseur, R. et Goni,**
- Sperandio, V., Kaper, J.B., Bortolini, M.R., Neves, B.C., Keller, R et Trabulsi, L.R.** 1998. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 133-139.
- Stephan, R. & Untermann, F.** (1999). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxinproducing, *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol* 37, 1570–1572.
- Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K. et O'Brien, A.D.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1.J *Bacteriol* **170**: 1116-1122.
- Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K. et O'Brien, A.D.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**: 135-140.
- Tarr, P.I.** (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* **20**: 1-8; quiz 9-10.
- Trevisani M, Mancusi R, Delle Donne G, Bacci C, Bassi L, Bonardi S.**(2014)Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy. - *Int J Food Microbiol.* ; 184:45-9.
- Vaillant, V., and Espié, E.** (2002) Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines chez les enfants âgés de moins de 15 ans. Etude cas-témoins 2000-2001. Institut de Veille Sanitaire - Saint Maurice, France, pp. 61.
- Vernozy-Rozand, C., and Montet, M.P.** (2001) *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc, pp. 135.
- Vernozy-Rozand, C., Bouvet, J., Montet, M.P., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy-Cruchaudet, C., and Richard, Y.** (2002) Survey of retail raw milk cheeses for Verotoxin producing *E.coli* (VTEC) and *E.coli* O157:H7 in France (Poster). In 102th General Meeting of American Society for Microbiology May, 19-20 Salt-Lake City, USA.
- Wadolowski, E.A., Sung, L.M., Burris, J.A., Samuel, J.E., and O'Brien, A.D.** (1990b) 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.

- Wagner, C. & Hensel, M.** (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* 715, 17–34.
- Wang G., Zhao T. and Doyle M.P.** (1997) "Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk." *J Food Prot* **60**: 610-613.
- Wang, G., and M. P. Doyle.** 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot* **61**:662-667.
- Wang, G., T. Zhao, and M. P. Doyle.** 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **62**:2567-2570.
- Wells J. G., Shipman L.D., Greene K.D., Sowers E.G., Green J.H., Cameron D.N., Downes F.P., Martin M.L., Griffin P.M. Ostroff S.M. et al.** (1991) "Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle." *J Clin Microbiol* **29**:985-989.
- Whipp, S. C., Rasmussen M.A. and Cray W.C. Jr.** (1994) "Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings." *J Am Vet Med Assoc* **204**: 1168-1175.
- Whittam, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I.K., Orskov, F., Orskov, I. et Wilson, R.A.** 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* **61**: 1619-1629.
- Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S. et Kaper, J.B.** 1997. Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett* **156**: 49-53.
- Woodward M.J., Carroll P.J., Wray C.,**( 1992). Detection of entero and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 31, 251-261.
- Zhang W., Bielaszewska M., Kuczius T. and Karch H.** (2002) "Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans." *J Clin Microbiol* **40**: 1441-1446.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Shere, J. et Garber, L.** 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* **61**:1290-1293. (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis." *Lancet* 2(8349): 573.

## ANNEXE 1

### Matériels de laboratoire

#### Le petit matériel

##### Matériels de prélèvement :

Boîtes stériles de 60ml étiquetées

##### Laboratoire de microbiologie :

Centrifugeuse

Vortex

Autoclave

Bec-bunsen

Four pasteur

Réfrigérateur à 4°C

Congélateur à 20°C

Agitateur magnétique

Barreau magnétique

Portoirs

Boîtes stériles de 60ml

Gants

Tubes stériles de 15ml

##### Réactifs :

Phosphaate Buffered Saline (PBS) à pH=7.4

Trypto-caséine Soja (TSB)

InstaGene™ Matrix 20ml

##### Laboratoire de virus et grippe respiratoire

Gants

Eppendorfs de 2ml et 1.5ml.

Hotte PCR HEPA/UV3

Hotte à flux laminaire-MSA advantage™

Centrifugeuse à éppendorf

Micropipettes réglables (2-20µl, 20 à 200µl, 200à1000µl).

Embouts de 10,100 et 1000µl

Tubes de 0.2 et 0.5ml

Réfrigérateur à +4°C.

Congélateur à -20°C

Vortex

Bain marie

Portoirs

Ethanol

Eau distillé stérile

Gaze hydrophiles

Alcool

Agarose

Elenmeyer

TAE1x (Tampon Tri-acétate EDTA)

## ANNEXE02

Tableau des résultats

	Date de prélèvements	laiterie	Nbre de vache L	Commune	Résultat de la PCR		
					stx1	stx2	eae
.1	17.02.2013	Laiterie 1	7	Blida	-	-	-
.2	17.02.2013	Laiterie 1	7	Oued el-alayag	-	-	-
.3	17.02.2013	Laiterie 1	11	Ain-roumana	-	-	-
.4	17.02.2013	Laiterie 1	36	Beni tamou	-	-	-
.5	17.02.2013	Laiterie 1	14	Oued el-alayag	-	-	-
.6	17.02.2013	Laiterie 1	17	Cheraga	-	-	-
.7	17.02.2013	Laiterie 1	8	Cheffa	-	-	-
.8	17.02.2013	Laiterie 1	14	Ain roumana	-	-	+
.9	17.02.2013	Laiterie 1	5	larbaa	-	-	-
.10	17.02.2013	Laiterie 1	14	Ain roumana	-	-	-
.11	17.02.2013	Laiterie 1	10	Oued el-alayag	-	-	-
.12	17.02.2013	Laiterie 1	65	Tipaza (hadjout)	-	-	+
.13	17.02.2013	Laiterie 1	3	Cheraga	-	+	-
.14	17.02.2013	Laiterie 1	8	Beni tamou	-	-	-
.15	04.03.2013	Laiterie2	NI	Beni tamou	-	-	-
.16	04.03.2013	Laiterie2	22	Cheffa	-	-	-
.17	04.03.2013	Laiterie2	5	Cheffa	-	-	-
.18	04.03.2013	Laiterie2	9	Mouzaia	-	-	-
.19	04.03.2013	Laiterie2	12	Mouzaia	-	-	-
.20	04.03.2013	Laiterie2	9	Ain roumana	-	-	-
.21	04.03.2013	Laiterie2	15	Mouzaia	-	-	-
.22	04.03.2013	Laiterie2	14	Mouzaia	-	-	-
.23	04.03.2013	Laiterie2	15	Cheffa	-	-	-
.24	06.03.2013	Laiterie2	54	Larbaa	-	-	-
.25	06.03.2013	Laiterie2	4	Ouled yaich	-	-	+
.26	06.03.2013	Laiterie2	14	Eucalyptus	-	-	-
.27	06.03.2013	Laiterie2	12	Eucalyptus	-	-	-
.28	06.03.2013	Laiteire2	12	Larbaa	-	-	+
.29	14.03.2013	Laiterie2	17	Beni mered	-	-	-
.30	14.03.2013	laiterie2	10	Beni tamou	-	-	-
.31	17.03.2013	Laiterie2	7	Blida	-	-	-
.32	17.03.2013	Laiterie2	7	Cheffa	-	-	-
.33	17.03.2013	Laiteire2	6	Blida	-	-	-

.34	17.03.2013	<b>Laiterie2</b>	8	Blida	-	-	-
.35	17.03.2013	<b>Laiterie2</b>	13	Blida	-	-	-
.36	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	2	Boufarik	-	-	-
.37	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	6	Boufarik	-	-	-
.38	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	5	Boufarik	-	-	-
.39	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	9	Boufarik	-	-	-
.40	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	1	Boufarik	-	-	-
.41	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	6	Boufarik	-	-	-
.42	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	2	Boufarik	-	-	+
.43	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	4	Boufarik	-	-	-
.44	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	9	Boufarik	-	-	-
.45	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	7	Boufarik	-	-	+
.46	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	3	Boufarik	-	-	-
.47	14.04.2013	<b>Laiterie3</b>	3	Boufarik	-	-	-
.48	14.04.2013	<b>Laiterie1</b>	8	Oued el-alayag	-	-	-
.49	14.04.2013	<b>Laiterie1</b>	NI	Oued el-alayag	-	-	-
.50	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	17	Zéralda	-	-	-
.51	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	7	Blida	-	-	-
.52	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	9	Blida	-	-	-
.53	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	52	Zéralda	-	-	-
.54	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	6	Blida	-	-	-
.55	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	5	Blida	-	-	-
.56	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	15	Htatba	-	-	-
.57	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	17	Koléa	-	-	-
.58	02.06.2013	<b>Laiterie4</b>	7	Blida	-	-	-
.59	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.60	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.61	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.62	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.63	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.64	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.65	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.66	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.67	16.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Guerwaw	-	-	-
.68	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	18	Cheffa	-	-	-
.69	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	7	Cheffa	-	-	-
.70	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	22	Cheffa	-	-	-
.71	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	5	Cheffa	-	-	-
.72	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	19	Cheffa	-	-	-
.73	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	24	Cheffa	-	-	-
.74	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	5	Cheffa	-	-	-
.75	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	11	Cheffa	-	-	-

.76	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	10	Cheffa	-	-	-
.77	23.06.2013	<b>Laiterie6</b>	18	Cheffa	-	-	-
.78	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Beni tamou	-	-	-
.79	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Beni tamou	-	-	-
.80	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Beni tamou	-	-	-
.81	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Beni tamou	-	-	-
.82	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Beni tamou	-	-	-
.83	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Ben saleh	-	-	-
.84	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Ben saleh	-	-	-
.85	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Ben saleh	-	-	-
.86	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Ben saleh	-	-	-
.87	26.06.2013	<b>Laiterie5</b>	NI	Ben saleh	-	-	-
.88	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.89	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.90	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.91	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.92	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.93	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.94	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.95	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.96	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.97	26.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.98	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.99	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.100	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.101	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.102	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.103	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.104	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.105	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.106	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.107	30.06.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.108	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.109	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.110	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.111	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.112	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.113	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.114	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.115	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.116	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-
.117	03.07.2013	<b>Laiterie6</b>	NI	Cheffa	-	-	-

