

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

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

Thème

Caractérisation moléculaire de Shigatoxines en élevages laitiers (étude préliminaire)

Présenté par : GASSEM Ouahiba

Devant le jury composé de :

FAIDI H	MAA	USDB	Présidente
MOHAMED SAID R	MAA	USDB	Examineur
OUSSADOU L	MAA	USDB	Examineur
BAAZIZE-AMMI D	MAA	USDB	Promotrice
GUETARNI D	Professeur	USDB	Co-promoteur

Promotion, 2011

REMERCIEMENTS

Initialement, ce mémoire n'aurait pas été réalisé sans la bénédiction du Bon Dieu qui nous a permis de s'instruire et qui a récompensé nos prières.

*Ce mémoire a été réalisée au laboratoire de recherche « **ECOQUAPA** » de l'Université SAAD Dahlab-Blida. Et au laboratoire « **Grippe et Virus respiratoire** » de l'institut pasteur d'Algérie (IPA), Annexe Sidi Fredj (Alger).*

Nous tenons précisément à exprimer notre profonde gratitude aux personnes suivantes ;

*J'exprime ma plus profonde reconnaissance à ma promotrice **Madame le docteur Djamil BAAZIZE AMMI**, de l'Université SAAD Dahlab-Blida, Merci à vous pour m'avoir prodigué tous ces précieux conseils techniques et scientifiques. Merci de votre grande patience à mon égard. Je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi.*

*A Monsieur le **Professeur Djamel GUETARNI**, de l'Université SAAD Dahlab-Blida, qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a patiemment conseillé tout au long de la réalisation de ce travail. Qu'il soit assuré de tout mon respect et de toute ma reconnaissance. Qui était toujours présent quand nous avions besoin de lui merci monsieur*

*Mes remerciements s'adressent à Madame **FAIDI** de l'Université, SAAD Dahlab-Blida en reconnaissance de l'honneur qu'elle m'accorde en acceptant de présider notre jury de mémoire.*

*Aux Messieurs **Remdhane MOHAMED SAID** et **OUSSADOU** de l'Université, SAAD Dahlab-Blida. Qui nous ont fait l'honneur d'accepter d'être examinateurs de ce mémoire. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.*

*Remerciements particuliers à tous les stagiaires du laboratoire de recherche « **ECOQUAPA** » avec qui j'ai pu échanger et partager de bons moments tout au long d'une année au laboratoire et en dehors. Je garde d'excellents souvenirs de cette année à partager la même paillasse. Merci pour l'ambiance agréable.*

*A tous ceux qui ont participé à l'avancement de ce travail, et particulièrement à **Monsieur Yahia CHEBLOUNE** pour son intervention efficace dans la réalisation de ce mémoire.*

*A tous les membres de l'équipe de laboratoire « **ECOQUAPA** ». Qui nous ont toujours apporté une aide efficace et un soutien sans faille. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma respectueuse gratitude.*

*Merci à **Monsieur le docteur Fouzi DERRAR** pour m'accueillie au sein du laboratoire de « **Virus et Grippe respiratoire** » de l'IPA annexe Sidi Fredj. Qu'il reçoive ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Un merci particulier à **Kahina IZRI** pour m'avoir guidé à mon arrivée au laboratoire « **Virus et Grippe respiratoire** » et pour tous ses précieux conseils qu'elle m'a prodigué. Tout cela avec beaucoup de patience, de sympathie et de gentillesse.*

*A ceux sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, à **Mes Parents** pour leur soutien indéfectible et l'exemple qu'ils m'ont donné. Et qui n'ont jamais cessé de nous encourager dans les études En nous apportant le soutien moral, financier et matériel, vous avez toujours cru en moi, même s'il m'arrivait de douter, vous m'avez appris que là où le talent ne suffit pas, la détermination et la ténacité sont la clé du succès. Que Dieu vous préserve et Vous prête longue vie.*

*A mes Frères **Abderrahmane** et **Mohamed Islam**. Mes Sœurs, **Cherifa**, **Meriem** et **Zineb** et mon beau-frère **Lotfi** pour leurs soutiens, leurs confiances indéfectibles et pour les bons moments passés ensemble.*

A tous mes collègues de l'option Génétique et Physiologie promotion 2011 qui me sont chers. Merci pour les bons moments passés ensemble.

DEDICACES

A la mémoire de ma grand-mère maternel qui nous a quitté le 22/11/2012. Que Dieu, le miséricordieux vous accueille dans son éternel paradis.

A mon grand-père, qu'il m'appelle toujours le professeur, Il n'a jamais cessé de m'encourager à poursuivre mes études

A mes oncles, tantes, cousins, cousines et mes Amis (es)

Qu'ils trouvent ici toutes mes amicales pensées

A tous mes enseignants (es) de 1^{ière} année primaire jusqu'à de 5^{ième} 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 1^{ière} année primaire jusqu'à de 5^{ième} année universitaire qui me sont chers. Merci pour les bons moments passés ensemble.

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 ses coups de mains et pour ses connaissances.

A toutes les autres personnes que je porte dans mon cœur et qui ont sans le savoir participé de manière considérable à ma réussite

RESUME

Parmi les souches d'*Escherichia coli* productrices de Shigatoxines (STEC), certaines sont responsables de pathologies sévères chez l'Homme. Les ruminants sont un des principaux réservoirs naturels de ces bactéries. Cette étude a eu pour objectif de rechercher les STEC dans les fèces de bovins laitiers au niveau de la wilaya de Blida (Algérie).

L'étude a porté sur 200 échantillons de fèces, prélevés à partir de vaches laitières adultes, appartenant à 27 élevages pris au hasard dans la wilaya de Blida.

Le portage des STEC a été mis en évidence par la recherche des gènes *stx* par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence des gènes *stx* dans 61 prélèvements de fèces (soit un taux de 30,5%) localisés dans 18 élevages (soit une prévalence de 66,67%).

Le profil génétique des prélèvements a montré qu'aucune vache ne portait de STEC ayant le gène *stx2* seul. 51 vaches portaient des STEC ayant le gène *stx1* seul (83,6%) et 10 vaches portaient des STEC ayant les gènes *stx1* et *stx2* simultanément (16,4%). Il est à noter que les échantillons fécaux présentant simultanément les 2 gènes proviennent de 4 exploitations des 18 exploitations positives, soit 22,22%.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons dire que le risque des infections dues aux STEC existe réellement en Algérie.

Mots-clés : STEC, fèces, bovins laitiers, élevage, gènes *stx*, PCR.

ملخص

من بين سلالات *E. coli* المنتجة ل SHIGATOXINES (STEC) بعض منها مسؤول عن أمراض خطيرة تصيب البشر. الحيوانات المجترة هي الحاملة الرئيسية الطبيعية لهذه البكتيريا , وتهدف هذه الدراسة إلى التحقيق في STEC في براز الأبقار الحلوب في البلدة (الجزائر) .

وبحثت الدراسة في 200 عينة من البراز التي جمعت من الأبقار الحلوب اللاتي ينتمين إلى 27 مزرعة تم اختيارهم عشوائيا في البلدة.

وقد تم تسليط الضوء على STEC من خلال البحث عن الجينات *stx* بتطبيق تقنية PCR, واستخدمت النتائج لتسليط الضوء على وجود جينات *stx* في 61 عينة من البراز (بنسبة 30,5%) تقع في 18 مزرعة (بنسبة 66,67%).

لم تظهر أي بقرة تحمل STEC الحاملة للجين *stx2* فقط, 51 بقرة تحمل STEC الحاملة للجين *stx1* فقط (83,6%) و 10 أبقار تحمل STEC الحاملة للجينات *stx1* و *stx2* في وقت واحد (16,4%). تجدر الإشارة إلى أن عينات البراز التي تحمل اثنين من الجينات مستمدة من 4 مزارع من بين 18 مزرعة ايجابية (بنسبة 22,22%).

استنادا إلى النتائج, يمكننا أن نقول أن خطر العدوى بسبب STEC موجود بالفعل في الجزائر.

الكلمات المفتاحية STEC, *stx*, PCR, البراز, منتجات الألبان, الثروة الحيوانية.

SUMMARY

Among strains of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are responsible for some serious diseases in humans. Ruminants are major natural reservoirs of these bacteria. This study was aimed to investigate the STEC in the faeces of dairy cattle at the Blida (Algeria).

The study looked at 200 samples of faeces collected from adult dairy cows belonging to 27 farms randomly selected in Blida.

Porting STEC has been highlighted by their search *stx* genes by PCR (Polymerase Chain Reaction)

The results were used to highlight the presence of *stx* genes in 61 samples of faeces (a rate of 30.5%) located in 18 farms (prevalence of 66.67%).

Genetic profile samples showed no cow was the STEC only *stx2* gene, 51 cows were the STEC only *stx1* gene (83.6%) and 10 cows were STEC *stx1* and *stx2* genes simultaneously (16.4%). It should be noted that fecal samples simultaneously with two genes derived from four (4) farms 18 farms positive or 22.22%.

Based on the results, we can say that the risk of infections due to STEC actually exists in Algeria.

Keywords: STEC, faeces, dairy, livestock, *stx* genes, PCR.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

RESUME

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....1

PARTIE BIBLIOGRAPHIE.....2

CHAPITRE I: DONNEES GENERALES SUR LES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC).....2

1. Taxonomie.....2

1.1. Caractères généraux.....2

1.2. L'espèce *Escherichia coli*(*E.coli*).....2

1.3. Classification des *E.coli* responsables de troubles intestinaux.....3

1.4. Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC).....4

1.5. Origine des *Escherichia coli* Entérohémorragiques (EHEC).....6

CHAPITRE II : LES FACTEURS DE PATHOGENICITE DES STEC.....7

1. Les Shiga-toxines.....7

1.1. Structure des Shiga-toxines.....7

1.2. Mécanisme d'action des Shiga-toxines.....7

1.3. Les gènes *stx*.....8

1.4. Les variants des gènes *stx*.....9

2. Les facteurs d'adhésion.....10

2.1. Facteurs responsables des lésions d'attachement-effacement.....10

2.2. Locus d'effacement des entérocytes (LEE).....11

2.3. Autres facteurs d'adhésion décrits.....11

3. Les facteurs plasmidiques.....12

3.1. L'entérohémolysine.....12

3.2. La sérine protéase EspP.....12

3.3. Autres facteurs plasmidiques.....12

CHAPITRE III: EPIDEMIOLOGIE DES STEC.....13

I. EPIDEMIOLOGIE ANIMALE, ENVIRONNEMENTALE ET ALIMENTAIRE.....13

I.1. Portage animal.....	13
I.1.1. Chez les bovins.....	13
I.1.2. Chez d'autres espèces de ruminants.....	13
I.1.3. Chez les animaux domestiques.....	14
I.1.4. Chez les oiseaux.....	14
I.2. Contamination de l'environnement.....	15
I.3. Contamination de la filière agro-alimentaire.....	15
II. EPIDIMIOLOGIE HUMAINE.....	16
II.1. Modes de transmission autre qu'alimentaire.....	16
II.2. Pathologie Humaine.....	17
CHAPITRE IV : METHODES DE RECHERCHES DES STEC.....	18
1. Méthodes biochimiques de détection des STEC.....	18
1.1. Particularités biochimiques d' <i>E. coli</i> O157 :H7 et des STEC non-O157.....	18
2. Tests immunologiques de détection des STEC.....	19
2.1. Tests immunologiques de détection d' <i>E. coli</i> O157 :H7.....	19
2.2. Tests immunologiques de détection des STEC non-O157.....	20
3. Méthodes génétiques de détection des STEC.....	20
3.1. La P.C.R (Polymerase Chain Reaction).....	20
3.2. L'hybridation ADN/ADN.....	22
V. PARTIE EXPERIMENTALE.....	23
MATERIEL ET METHODES.....	23
Cadre de l'étude.....	23
1. MATERIEL.....	23
1.1. Prélèvements.....	23
1.2. Matériel non biologique.....	24
2. METHODES.....	27
a. Traitement du prélèvement de fèces.....	27
b. Extraction d'ADN et contrôle de la qualité des ADN extraits.....	27
c. Analyse par PCR.....	27
RESULTATS ET DISCUSSION.....	32
RESULTATS.....	32
DISCUSSION.....	40
CONCLUSION.....	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	43
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Pathogénie associée aux six classes d' <i>E. coli</i> responsables de diarrhées.....	3
Figure 02 : Définition et place des STEC et EHEC au sein des <i>E. coli</i>	5
Figure 03 : Les facteurs de virulence.....	12
Figure 04 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines.....	8
Figure 05 : Lésions d'attachement-effacement (A/E) induites par une souche <i>E. coli</i> O157:H7 sur des cellules rectales de mouton.....	10
Figure 06 :VIP test, test immunologique en « 1 étape ».....	19
Figure 07 : Barrettes VIDAS ECO.....	20
Figure 08 : Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction).....	22
Figure 09 : Kit d'extraction d'ADN.....	25
Figure 10 : Thermocycleur Mastercycler gradient.....	26
Figure 11 : Dispositif d'électrophorèse.....	26
Figure 12 : Dispositif de visualisation de migration.....	26
Figure 13 : Traitement des prélèvements de fèces.....	27
Figure 14 : Etapes de l'extraction d'ADN.....	28
Figure 15 : coulage de gel.....	29
Figure 16 : Etapes de la préparation de la cuve à électrophorèse.....	29
Figure 17 : Etapes de dépôt des échantillons.....	30
Figure 18 : Début de la migration.....	30
Figure 19 : Photo du gel de contrôle de la qualité (14 échantillons d'ADN extraits + MT).....	32
Figure 20 : Photo du gel d'électrophorèse des produits PCR pour la recherche de la séquence commune des gènes <i>stx1</i> & <i>stx2</i>	33
Figure 21 :Photo du gel d'électrophorèse des produits PCR pour la recherche de la séquence de gène <i>stx1</i>	36
Figure 22 :Photo du gel d'électrophorèse des produits PCR pour la recherche de la séquence de gène <i>stx2</i>	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principaux critères différentiels de 04 espèces du genre <i>Escherichia</i> (<i>E. coli</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i>).....	2
Tableau II : Prévalence du portage des STEC chez différents types de bovins provenant de diverses exploitations.....	14
Tableau III : Fréquences observées de la contamination de la filière viande bovine par des STEC.....	15
Tableau IV : Fréquences observées de la contamination de la filière lait et fromages par des STEC.....	16
Tableau V : Nombre de prélèvements effectué par élevage.....	24
Tableau VI : Amorces oligonucléotidiques utilisées dans la réaction de PCR.....	25
Tableau VII : Concentrations et volumes des réactifs utilisés dans la PCR.....	31
Tableau VIII : Résultats de la recherche de la séquence commune des gènes <i>stx1</i> & <i>stx2</i>	33
Tableau IX : Résultats des échantillons analysés par rapport à la séquence commune des gènes <i>stx1</i> & <i>stx2</i>	34
Tableau X : Estimation du portage fécal de gènes <i>stx</i> dans chaque élevage Résultats du portage des gènes <i>stx1</i> et <i>stx2</i>	35
Tableau XI : Résultats de la recherche de la séquence de gène <i>stx1</i>	36
Tableau XII : Résultats de la recherche de la séquence de gène <i>stx2</i>	37
Tableau XIII : Résultats du portage des STEC ayant les gènes <i>stx1</i> et <i>stx2</i>	38
Tableau XIV : Traitement des résultats du portage des gènes <i>stx1</i> et <i>stx2</i>	38

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
CT-SMAC	Cefixime-potassium tellurite MacConkey au sorbitol
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
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Entéropathogène
<i>esp</i>	EPEC Secreted Protein
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Entérotoxigène
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 Thrombocytopenique
Rpm	Rotations par minutes
SAA	STEC Autoagglutinating Adhesin
SHU	syndrome hémolytique et urémique
Stt	Shiga-like toxines
SMAC	Mac-conkey au sorbitol
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 vérotoxines

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ceux sont des bactéries fréquemment isolées du tube digestif de la plupart des mammifères et des oiseaux. La majorité des souches d'*E. coli* sont commensales mais certaines ont toutefois été associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales [1,2]. Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme des pathogènes émergents importants pour la santé publique. Ces derniers ne sont connus que depuis 1982, date à laquelle *E. coli* O157 : H7 a été isolée pour la première fois lors d'épidémies de colites hémorragiques aux Etats-Unis liées à la consommation d'hamburgers contaminés [3].

Les STEC ont été depuis mis en cause dans plusieurs épidémies ou cas sporadiques au Canada, au Japon, en Afrique et en Europe consécutifs à la consommation d'aliments contaminés d'origine animale (viande hachée, lait et fromages au lait cru,...) [4,5,6,7,8,9,10,11,12]. Toutefois, l'épidémiologie des infections à STEC a évolué depuis. La consommation de fruits et légumes, l'ingestion d'eau contaminée, le contact avec les animaux et leur environnement ainsi que la transmission inter-humaine sont d'autres modes de transmission de ces infections à l'Homme [13,14,15,16,17,18,19,20]. Le sérotype O157:H7 est le plus communément retrouvé en clinique humaine mais d'autres sérogroupes sont de plus en plus incriminés lors d'épidémies. Selon l'AFSSA (2011), les STEC pathogènes sont les souches appartenant aux sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7 [21].

La pathogénicité des STEC est attribuée aux gènes *stx1* et *stx2* codant les Shiga-toxines (1 et 2), au gène *eae* codant l'intimine et au gène *ehxA* codant l'entérohémolysine. La combinaison de ces gènes augmenterait le risque et la sévérité des infections [22]

Les STEC ont été isolées chez un grand nombre d'espèces animales mais les bovins sont le principal réservoir. Le portage et l'excrétion des STEC par les bovins sont, le plus souvent, asymptomatique et ces derniers ne présentent aucun signe clinique lorsqu'ils les hébergent dans leur tube digestif ; ils sont dits porteurs sains [23,24].

En Afrique du Nord, plus particulièrement en Algérie, le portage des STEC par les bovins et par d'autres animaux est méconnu. Ces germes n'étant pas recherchés, leur implication en tant qu'agents pathogènes peut passer inaperçue. Peu de travaux ont fait l'objet de la recherche de cette bactérie dans les denrées alimentaires [25, 26, 27].

Dans la présente étude, nous nous proposons d'étudier le portage asymptomatique des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) chez les bovins laitiers au niveau des fermes de la wilaya de Blida par la recherche des gènes (*stx1*, *stx2*) au moyen de la technique de PCR à partir de prélèvements de fèces.

CHAPITRE I

DONNEES GENERALES SUR LES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES (STEC)

1. Taxonomie :

1.1. Caractères généraux :

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 [28].

Le genre *Escherichia* regroupe six espèces possédant chacune des caractéristiques biochimiques particulières, permettant de les différencier (Cf. Tableau I) : *E. blattae*, *E. coli*, *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris* [30]. *E. senegalensis* serait une 7ème espèce définie par MBENGUE et al. [31], mais elle n'a pas encore été validée [32].

Tableau I : Principaux critères différentiels de 04 espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*) [29].

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

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

1.2. L'espèce *Escherichia coli* (*E.coli*) :

E. coli a été décrite pour la première fois en 1885 dans des selles de nourrissons par l'Allemand Theodore Escherich [33]. Son nom actuel a cependant été proposé en 1919 par Castellani et Chambers pour reclasser une espèce préalablement connue sous le nom de «*Bacterium coli commune*» [29]. C'est un microorganisme commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud [34]. *E. coli* colonise le tractus gastro-intestinal de l'Homme dès les premières heures de la naissance et persiste dans le côlon toute la vie [12]. Ce microorganisme représente près de 80% de la microflore aérobie du tube digestif, assure avec les autres composants, une barrière de protection de la muqueuse, et peut représenter jusqu'à 97 % des coliformes isolés de fèces humains et 90% de fèces d'animaux [34,35,36]. Bien que la majorité des souches d'*E. coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales très diverses chez l'Homme [1,37]. Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*E. coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont la colonisation des muqueuses, éventuellement l'invasion des cellules, la

multiplication, la résistance aux défenses internes de l'hôte et les dommages à l'hôte. La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche, les modes d'infection et les signes cliniques de l'infection, constitue un moyen de typage d'*E. coli*, que l'on désigne sous le néologisme de pathotype ou pathovar [12].

1.3. Classification des *E. coli* responsables de troubles intestinaux :

Ces souches sont groupées en six classes, ou six « pathovars » selon les signes cliniques engendrés et les facteurs de virulence exprimés (Cf. Figure1). Cette classification est essentiellement utilisée par les médecins [38].

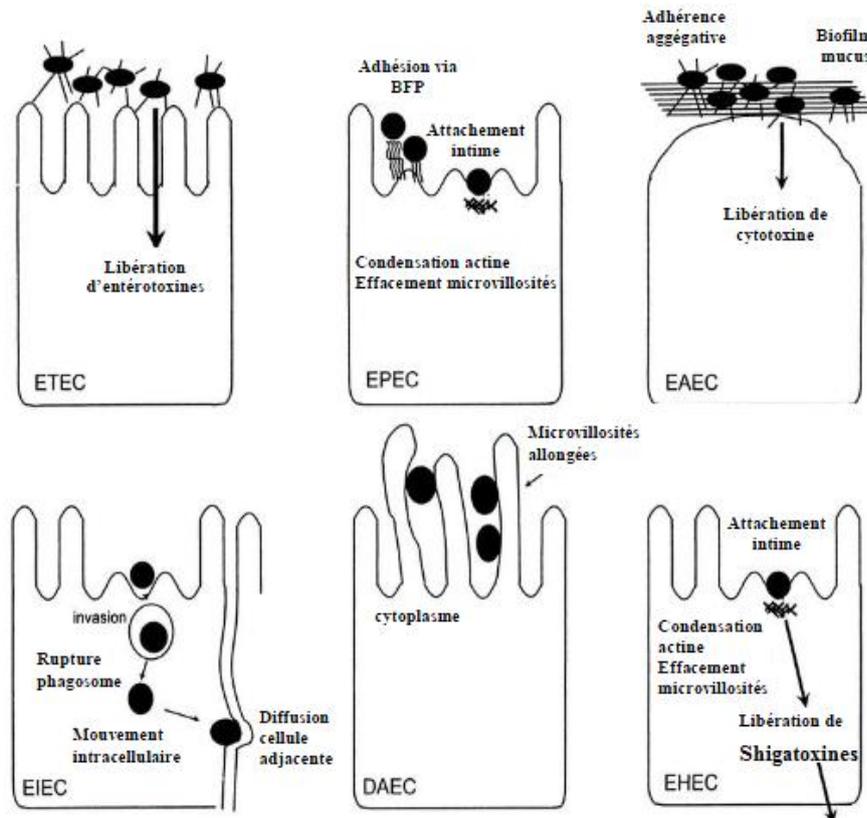


Figure 1 : Pathogénie associée aux six classes d'*E. coli* responsables de diarrhées [39].

- **Les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC)** associés aux diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et à la diarrhée du voyageur [1]. Les ETEC possèdent des facteurs de virulence leur permettant de coloniser la muqueuse intestinale [40]. Leur pouvoir pathogène s'explique principalement par la sécrétion des toxines [12]. La contamination se fait essentiellement par les eaux de boisson [38] (Cf. Figure 1).
- **Les *E. coli* Entéropathogènes (EPEC)** sont responsables de gastro-entérites chez les enfants de moins de 3 ans [41]. Lors d'infections, des lésions histopathologiques particulières apparaissent, appelées lésions d'attachement et d'effacement (lésions A/E) [42]. Ce phénotype est caractérisé par l'effacement des microvillosités intestinales et par l'adhésion intime entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes [39] (Cf. Figure 1).
- **Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)** sont responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes chez les jeunes enfants et les immunodéprimés dans les pays en

voie de développement ainsi que dans les pays industrialisés [43]. Une adhésion agrégative en "briques empilées", à l'origine de nécroses au pôle apical des villosités [12] (Cf. Fig.1 page 3).

- **Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)** sont capables de pénétrer dans les cellules épithéliales de la muqueuse colique, de s'y multiplier, puis de se déplacer à travers le cytoplasme de la cellule infectée pour gagner les cellules épithéliales adjacentes en provoquant la mort des cellules infectées et une forte réaction inflammatoire [24]. Ils sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse. [12] (Cf. Fig.1 page 3).
- **Les *E.coli* à adhésion diffuse (DAEC)** sont à l'origine de diarrhées et d'infections urinaires qui peuvent être aqueuses et contenir du mucus [12,38]. L'expression d'une adhésine fimbriale et d'une protéine de membrane externe confère aux bactéries un phénotype d'adhésion « diffuse », sur les lignées cellulaires en culture [44,45] (Cf. Fig. 1 page 3).
- **Les *E.coli* Entérohémorragique (EHEC)** sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique Thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort [3]. Les EHEC qui correspondent aux souches isolées chez les malades possèdent typiquement au moins un gène *stx* (*stx1* ou *stx2*) codant les Shigatoxines ainsi que d'autres facteurs de virulence comme le gène *eae* codant le facteur d'attachement et d'effacement ou le gène *ehxA* codant l'entérohémolysine [3,46,47,48,49]. L'ensemble des souches d'*E. coli* possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des STEC [Shiga-toxin-Producing *E. coli*] (ou VTEC [verotoxin-producing *E. coli*] selon l'ancienne dénomination internationale) [12] (Cf. Fig.1 page 3).

1.4. Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) :

1.4.1. Historique :

En 1982 aux Etats-Unis, deux épidémies de colites hémorragiques sévères, nécessitant une hospitalisation de 70 % des malades, apparurent après la consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'établissements d'une même chaîne de restauration rapide [50]. Les analyses mises en œuvre, d'une part sur les selles des patients et d'autre part sur de la viande de bœuf hachée congelée d'un même lot dont provenaient les hamburgers incriminés, mirent en évidence une souche d'*E.coli* d'un sérotype particulier O157:H7 [50]. Peu de temps après, une étude menée sur les selles d'enfants atteints par un SHU montra la présence d'une toxine, cytotoxique pour les cultures cellulaires Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique), d'où son nom de «vérotoxine», dénommée également «Shiga-toxine» [46,51]. Depuis 1982, de nombreux autres cas d'infections humaines consécutives à la consommation d'aliments contaminés par des STEC ont été rapportés à travers le monde [38]. Notamment, des épidémies importantes sont survenues : à Washington en 1993 (501 malades) liée à la consommation de hamburgers, en Ecosse en 1996 (512 malades) due à la consommation de viande de bœuf et au Japon en 1996 (9451 malades) due à la consommation de radis blanc [50].

1.4.2. Définition :

La dénomination VTEC a été couramment utilisée jusqu'alors; aujourd'hui, la convention internationale de dénomination de ces pathogènes recommande le terme STEC [50]. Les souches dites STEC sont toutes les souches d'*Escherichia coli* ayant un ou plusieurs gènes *stx* codant une toxine particulière, appelée Shiga-like toxines ou vérotoxines [38]. Cette dernière présente de fortes homologies avec la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* de type 1 [52]. Les Shigatoxines sont des exoprotéines cytotoxiques pour les cultures cellulaires Vero [38]. Les STEC présentent de nombreuses différences phénotypiques (présence ou non d'antigènes, de flagelles...) et génétiques principalement au niveau des nombres et types de facteurs de virulence possédés [38]. Il est important de souligner que les STEC ne sont pas tous pathogènes pour l'Homme [23] (Cf. Figure 2).

Dans un avis de l'AFSSA de juillet 2008, et plus récemment, l'avis de janvier 2011 définit comme souches STEC pathogènes, les souches appartenant aux sérotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et O157:H7 et ayant des caractéristiques génétiques particulières (elles doivent posséder au moins deux facteurs de virulence précis : les gènes *stx* et *eae*) [21].

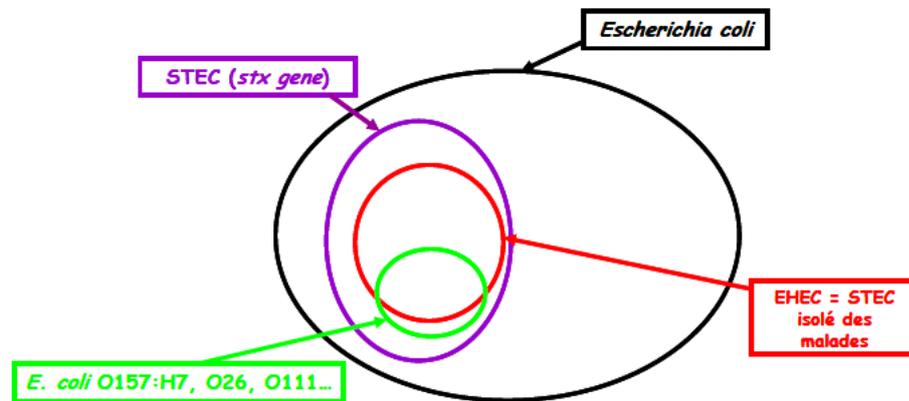


Figure 2 : Définition et place des STEC et EHEC au sein des *E. coli* [53].

1.4.3. Particularités biochimiques :

Les STEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sur un milieu particulier, par contre le sérotype O157:H7 a des particularités biochimiques qui permettent son isolement sur des milieux de culture spécifique [9].

1.4.3.1. Absence de fermentation du sorbitol :

Environ 93 % des souches d'*E.coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures, à l'inverse, *E. coli*O157:H7 ne fermente pas le sorbitol (SOR-) [54,55].

1.4.3.2. Absence de β -glucuronidase :

E. coli O157:H7 se distingue par l'absence de production d'une enzyme qui est commune aux souches d'*E.coli* : la β -glucuronidase [56].

L'association de ces deux particularités biochimique (sorbitol- et β -glucuronidase-) utilisées pour l'identification du sérotype O157:H7 a permis la mise en place de méthodes de détection de plus en plus sensibles [9].

1.4.4. Particularités sérologiques :

D'un point de vue épidémiologique, il est essentiel de pouvoir différencier les isolats d'*E.coli*. Les travaux de Kauffman (1947) ont permis d'établir une première classification d'*E.coli*, fondée sur l'étude des antigènes de surface [57]. Trois antigènes de surface sont décrits et pris en compte [58] :

Les antigènes O somatiques sont de nature lipopolysaccharidique (LPS) et ils forment une partie de la membrane externe de la paroi bactérienne [29,36,59]. 180 antigènes O ont été décrits [36, 59].

Les antigènes K capsulaires correspondent à la capsule polysaccharidique [29,36,59]. On en dénombre 80 [1].

Les antigènes H flagellaires sont de natures protéiques, constitués de flagelline. Cette protéine est présente dans le flagelle qui permet à la bactérie de se déplacer [29,36,57,59]. 56 antigènes sont à ce jour connus [36,57].

La classification des STEC se base sur la détermination :

- Séro groupe, identifié selon l'antigène somatique O.
- Sérotype, identifié au sein du séro groupe sur la base des antigènes H et éventuellement des antigènes K.

Cette classification permet d'obtenir, en considérant les trois antigènes plus de 800 000 sérotypes différents. Actuellement, seulement 2000 sérotypes ont été isolés chez l'Homme, l'animal, dans la nourriture, l'eau ou l'environnement [60,61,62]. Parmi ceux-ci, *E. coli* O157:H7 est le plus étudié [63]. Mais plus de 100 sérotypes non-O157 sont également connus pour être pathogènes et impliqués dans des SHU à l'échelle internationale [64,65].

1.5. Origine des *Escherichia coli* Entérohémorragiques (EHEC) :

Différentes hypothèses ont été développées concernant l'origine des EHEC [12]. La plus probable serait que les EHEC soient un groupe de clones dérivant des EPEC; ceci s'expliquerait par le fait que des gènes comme le gène *eae* auraient été transférés d'une souche pathogène à une souche d'*E.coli* commensale, qui serait devenue à son tour pathogène [66].

L'analyse moléculaire et la comparaison de la distribution des gènes spécifiques de virulence ont montré que les EHEC auraient probablement acquis récemment la plupart de leurs facteurs de virulence par transfert horizontal de matériel génétique [50]. L'explication logique de l'émergence des EHEC comme un agent pathogène majeur serait la présence de ces gènes sur des éléments mobiles, comme les gènes *stx1* et *stx2* situés sur des prophages, le gène *eae* sur un îlot de pathogénicité LEE et les gènes *ehxA* et *katP* sur le plasmide pO157 [12,50,67].

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 [68,69].

CHAPITRE II

LES FACTEURS DE PATHOGENICITE DES STEC

1. Les Shiga-toxines :

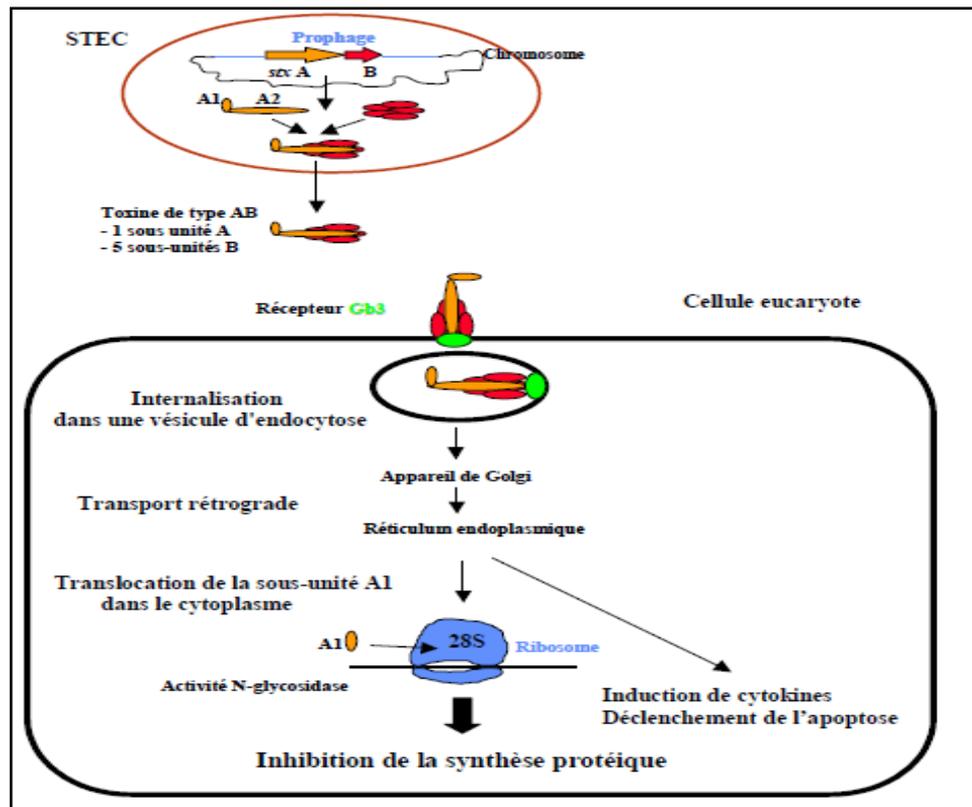
Les souches STEC se caractérisent par la production de cytotoxines inhibant *in vitro* les cellules Vero en stoppant de façon irréversible leur multiplication. Ces toxines sont regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) ou Shiga-like toxines (SlT) étant donné leurs homologues avec la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* de type 1 [52,70]. Des variants de ces toxines ont été très vite identifiés de telle manière que les toxines Stx1 et Stx2 constituent des familles de toxines [71]. (Cf. Fig.03 page 12)

1.1. Structure des Shiga-toxines :

Les Shigatoxines sont des hétéropolymères de 70 kDa formés d'une sous-unité A (possédant l'activité enzymatique) de 33 kDa et de 5 sous-unités B (pour binding ou liaison au récepteur) de 7,7 kDa chacune [72]. La sous-unité A présente une activité de type N-glycosidase sur l'adénosine située en position 2348 de l'ARN ribosomique 28S [73]. Cette activité 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 porté par un bactériophage de type λ -like. Cet opéron est constitué d'un cistron proximal (*stxA*) de 958 pb codant la sous-unité A et d'un cistron distal (*stxB*) de 260 pb, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous-unité B. Ainsi, l'opéron *stx1* code pour la toxine Stx1 et l'opéron *stx2* code pour la toxine Stx2.

1.2. Mécanisme d'action des Shiga-toxines :

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 (galactose- α (1-4)-galactose- β (1-4)-glucosyl-céramide) [74]. 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 est transloquée dans le cytoplasme, exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque la sous-unité 60S du ribosome, conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et par conséquent à la mort cellulaire [75]. En outre, la toxine (et en particulier les sous-unités B) pourrait induire la production de cytokines par les cellules épithéliales intestinales [76,77,78]. (Cf. Figure 04 page 8).



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 04 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines [79].

1.3. Les gènes *stx* :

Deux grandes classes de Shiga-toxines sont aujourd'hui identifiées : les toxines Stx1, et les toxines Stx2. Leurs gènes codant sont notés respectivement *stx1* et *stx2* d'après la convention d'écriture internationale [80]. Les gènes *stx* sont situés sur un opéron généralement porté par un bactériophage de type λ -like. Ce sont des phages lysogènes intégrés dans le chromosome bactérien. Plusieurs phages codant les toxines Stx ont été identifiés [81]. Le phage H-19b codant la toxine Stx1 a été caractérisé chez la souche H19 de sérotype O26:H11, et le phage 933W codant Stx2 a été mis en évidence chez la souche EDL 933 de sérotype O157:H7 [82,83,84].

La comparaison des séquences des Shigatoxines montre que le gène *stx1*, très conservé, est pratiquement identique à celui de *Shigella dysenteriae* de type 1 alors que le gène *stx2* est beaucoup moins conservé ce qui permet de distinguer plusieurs sous-types de *stx2* [52].

Les toxines Stx1 et Stx2 se distinguent par leurs propriétés immunologiques, mais leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. En outre, des études réalisées *in vitro* sur les cellules endothéliales rénales humaines, et *in vivo* sur des modèles animaux ont montré que Stx2 serait 1000 fois plus cytotoxique que la toxine Stx1 [85,86,87]. 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 [88].

1.4. Les variants des gènes *stx* :

Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques des toxines Stx1 et Stx2 ont été décrits [89]. Tous les variants ont les mêmes particularités génétiques que les gènes de référence, *stx1* et *stx2*. Il n'est donc pas rare, suite à l'insertion de plusieurs phages dans le chromosome bactérien, d'observer des souches possédant plusieurs variants [38].

Les souches STEC peuvent produire une seule toxine (Stx1 ou Stx2), ou les deux Stx1 et Stx2 (souche EDL 933) ou encore deux toxines Stx2 différentes [90].

1.4.1. Les toxines Stx1 :

Elles sont neutralisées par les anticorps dirigés contre la toxine de *Sh. Dysenteriae* I avec laquelle elles présentent 99 % d'homologie [52,80,83]. Leurs variants sont au nombre de 6, les plus fréquents étant *stx1*, *stx1c* et *stx1d* [12,23].

Le variant *stx1* représente le variant de référence ou variant "sauvage" correspondant aux gènes de la souche de référence EDL933 [83].

Le variant *stx1c*, tout d'abord mis en évidence chez des souches d'origine ovine, et a été retrouvé plus tardivement, chez des souches humaines [91,92]. Chez l'Homme, il est associé à des cas de diarrhées sans complication, ou bien n'entraîne aucun symptôme. Les pourcentages d'identité avec le gène *stx1* sont respectivement de 97 et 95 % pour les séquences des gènes *stxA* et *stxB* [25]. Ce variant est fréquemment détecté dans les sérotypes O146:H21 et O128:H2 isolés chez les ovins et chez l'Homme [93].

Le variant *stx1d* a été mis en évidence chez une souche d'origine bovine [94]. Les régions codant les sous-unités A et B possédait 93 et 92 % d'identité respectivement avec la séquence de *stx1* [25].

1.4.2. Les toxines Stx2 :

Elles possèdent 56 % d'homologie avec la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* [52]. Les souches productrices de Stx2 sont plus virulentes et ont été très souvent associées aux formes graves d'infections (SHU et PTT) [95]. Au sein de cette classe, 11 variants sont à l'heure actuelle différenciés [96,97,98].

Le variant *stx2e* est l'opéron "sauvage" correspondant aux gènes de la souche de référence EDL933 [83].

Le variant *stx2e* est quant à lui retrouvé presque exclusivement dans les souches d'origine porcine (associées à l'œdème du porc). La toxine Stx2e possède 94% et 78% d'homologie avec Stx2 au niveau des sous-unités A et B respectivement [99,100]. Ce variant se lie à un récepteur différent du Gb3, le globotétraoysl céramide Gb4 chez le porc [101].

Le variant *stx2d* semblant associé aux souches d'origine ovine [102,103]. Les toxines Stx2d sont le plus souvent associées à des souches isolées d'humains n'ayant pas développé de pathologies graves [104]. Les gènes codants les sous-unités A et B présentent respectivement 95 % et 88% d'homologie avec *stx2* [25].

Le variant *stx2c* est de plus grande importance clinique et biologique chez l'Homme. La toxine Stx2c diffère de la toxine Stx2 au niveau de la sous-unité B. Ils ont été mis en évidence dans la souche d'EHEC O91:H21 isolée d'un patient atteint d'un SHU [105].

Le variant *stx2f* présente 70,6 % et 98 % d'identité respectivement avec les gènes codants les sous-unités A et B du gène *stx2e*. Les souches possédant *stx2f* sont retrouvées exclusivement dans des fèces de pigeons [106,107]. Ces souches ne sont que faiblement pathogènes pour l'Homme [104].

Le variant *stx2g*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, présente 63 et 94,9% d'identité avec les gènes codants les sous unités A et B respectivement [25].

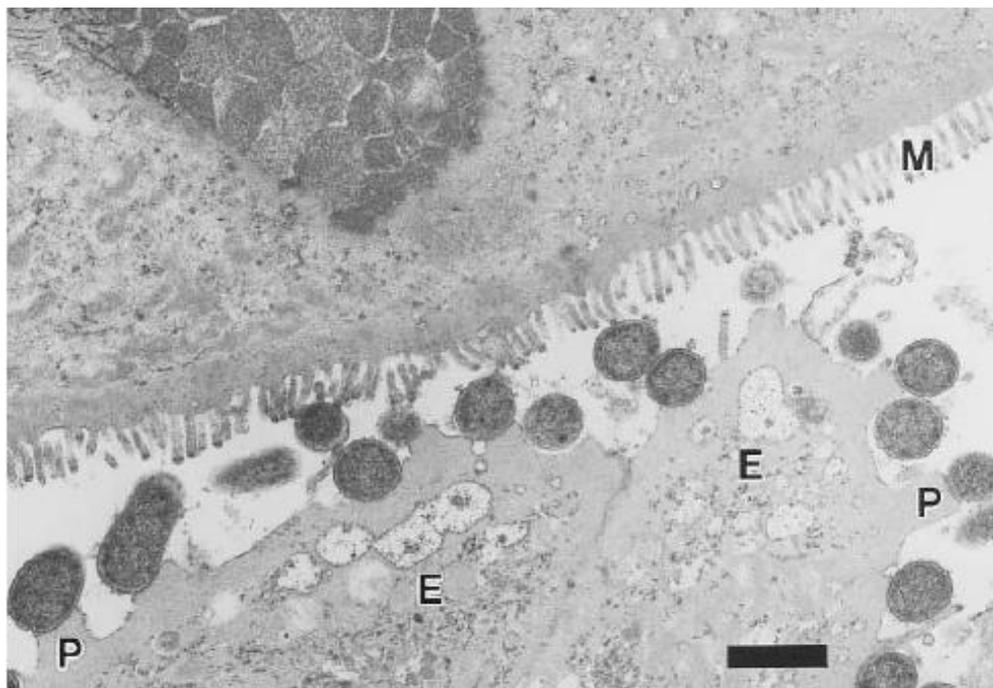
Le variant *stx2NV206*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, présente des pourcentages d'identité compris entre 94,5 à 99 % au niveau du gène *stx2Aet* 81,5 à 96 % avec *stx2B*. A ce jour, aucune étude concernant la fréquence d'identification ou le pouvoir pathogène de ce variant n'a été menée [25].

2. Les facteurs d'adhésion :

Les facteurs d'adhésion semblent être des éléments majeurs de la pathogénicité. De nombreuses études ont été réalisées *in vitro* et *in vivo* afin de connaître les différents facteurs responsables de mécanismes d'adhésion [108]. (Cf. Fig.03 page 12)

2.1. Facteurs responsables des lésions d'attachement-effacement :

L'adhésion de certaines souches de STEC au tube digestif s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes dites d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum [26]. Les lésions A/E, d'abord décrites chez les EPEC, se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal dans la zone de contact entre la bactérie et la cellule cible [93]. Formation d'un piédestal, constitué d'actine cellulaire, sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon très étroite (Figure 05). La forte diminution du nombre de microvillosités assurant un rôle de réabsorption de l'eau au niveau de l'intestin va alors entraîner l'apparition de symptômes diarrhéiques [26].



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

Figure 05 : Lésions d'attachement-effacement (A/E) induites par une souche *E. coli* O157:H7 sur des cellules rectales de mouton, au microscope électronique [110].

2.2. Locus d'effacement des entérocytes (LEE) :

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

- le gène *eae* (*E.coli* attaching and effacing) code une protéine de surface de 94 kDa appelée intimine qui a pour rôle d'adhérer intimement à l'entérocyte [111].
- le gène *tir* code le récepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated Intimin Receptor). Il s'agit d'une protéine de 78 kDa, introduite dans le cytoplasme de la cellule eucaryote infectée grâce à un système de sécrétion de type III [112].
- les gènes *esp* (EPEC Secreted Protein) codent pour une seringue moléculaire (*espA*, *espB*, *espD*) qui permettent l'entrée d'effecteurs moléculaires (Tir, map, *espF*, *espG*, *espH*...) à travers la membrane plasmique de la cellule hôte sans l'intervention de récepteurs spécifiques [50].

L'ensemble de ces gènes sont portés par un îlot de pathogénicité particulier : le LEE situé sur le chromosome. Ces îlots de pathogénicité sont définis comme suit :

- ils sont généralement absents des bactéries non pathogènes appartenant à la même espèce ;
- ils sont constitués d'un groupe de gènes de virulence dont des gènes codant des toxines, des adhésines et des systèmes d'export de facteurs de virulence ...
- leur pourcentage G+C est différent de celui du reste du chromosome;
- ils portent des gènes codant des intégrases d'origine phagique, des transposases. La présence de ces gènes suggère un système d'intégration de l'ADN étranger par l'intermédiaire de phages, de plasmides... [67].

Le LEE, n'est pas indispensable à la pathogénicité d'une souche, mais cette dernière sera plus facilement et d'autant plus pathogène si elle le possède [113].

2.3. Autres facteurs d'adhésion décrits :

Chez les STEC, différents phénotypes d'adhésion ont été observés. Des facteurs d'adhésion ont été partiellement caractérisés chez certaines souches, d'autres sont encore sujets à discussion :

- Iha (Iron-homologue adhesin) est une protéine de membrane externe de 67 kDa, identifiée chez certains STEC. Elle confère un phénotype d'adhésion diffuse sur cellules HeLa aux *E. coli* O157:H7 et à certains STEC *eae*-négatifs tels que les souches de sérotype O113:H21 [114].
- Deux protéines de membrane externe de 94 kDa et 8 kDa ont été impliquées dans l'adhésion de souches O157:H7 et O26:H11 aux cellules épithéliales intestinales (INT407) et au caecum de poulet [115,116].
- Une adhésine SAA (STEC Autoagglutinating Adhesin) qui est une protéine de surface de 516 acides aminés, a été décrite chez des souches STEC LEE-négatifs de sérotypes O113:H21, O48:H21, O91:H21 isolées de cas de SHU [117].
- Le gène *efa1* coderait un facteur d'adhésion potentiel chez les EHEC LEE-positifs [118].
- L'opéron *lpf* (long polar fimbriae) semble impliqué dans l'adhésion des souches O157:H7 mais aussi non-O157 [119,120].
- D'autres adhésines ont été décrites dans des souches STEC ne possédant pas l'îlot de pathogénicité LEE, telles que des protéines de liaison aux immunoglobulines (EibG) [120,121].

3. Les facteurs plasmidiques :

Des facteurs de virulence potentiels ont été décrits sur le plasmide pO157 chez des STEC appartenant au sérotype O157:H7 (Cf. Figure 03).

3.1 L'entérohémolysine :

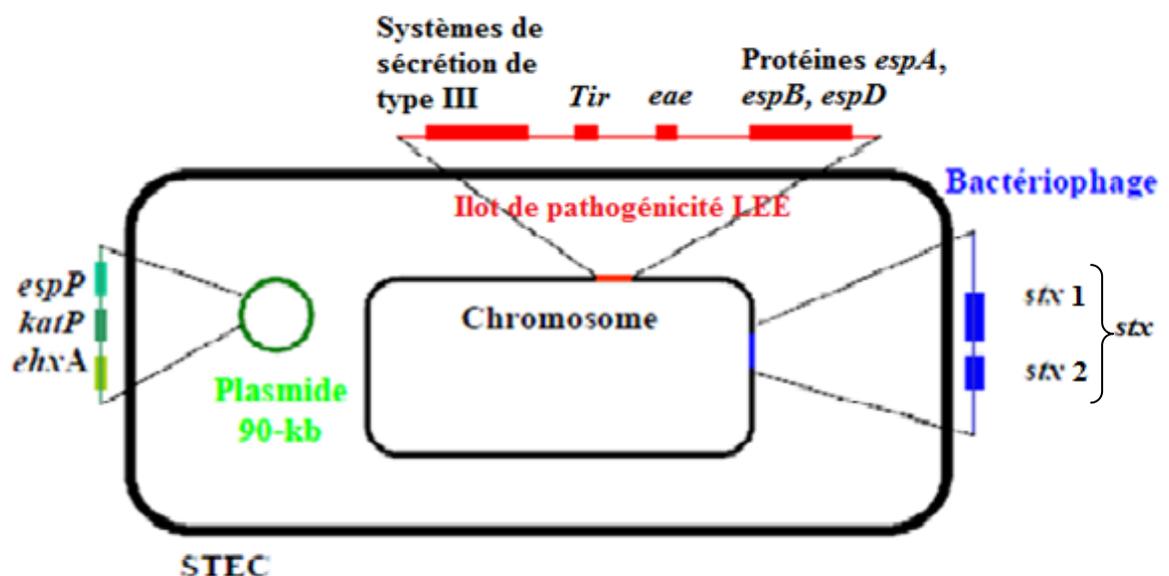
L'entérohémolysine E-hlyA a été mise en évidence chez les STEC en 1988 [122]. La protéine E-hlyA est codée par le gène *ehxA* [48]. L'activité cytolytique de la toxine E-hlyA est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane cytoplasmique et à former des pores, engendrant ainsi une lyse osmotique des cellules [123,124]. Elle permettrait notamment de stimuler le développement des cellules bactériennes grâce au fer libéré suite à la lyse des hématies.

3.2 La sérine protéase EspP :

La sérine protéase EspP clive le facteur humain V de coagulation, la pepsine A et elle influe sur la colonisation de l'intestin des veaux [125,126]. Elle est suspectée de jouer un rôle dans la pathogénie. La dégradation du facteur V contribuerait au développement des colites hémorragiques observées chez les patients.

3.3 Autres facteurs plasmidiques :

D'autres facteurs plasmidiques pourraient jouer un rôle dans la pathogénie: la catalase peroxydase périplasmique KatP de 82 kDa [127]. Par ailleurs, le gène *astA* codant l'entérotoxine East1 a été identifié chez de nombreuses souches STEC [127,128,129,130]. Cette toxine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse.



Les gènes codant les principaux facteurs de virulence connus sont portés par les éléments mobiles du génome: les gènes codant les toxines Stx (*stx1*, *stx2*) par des bactériophages, les gènes codant les fonctions d'A/E par l'îlot de pathogénicité LEE ; les gènes *espP*, *katP*, *ehxA* sont plasmidiques.

Figure 03 : Les facteurs de virulence [50].

CHAPITRE III

EPIDEMIOLOGIE DES STEC

I. EPIDEMIOLOGIE ANIMALE, ENVIRONNEMENTALE ET ALIMENTAIRE

I.1. Portage animal :

Le tractus digestif des ruminants est un important réservoir des STEC. Les *E. coli* O157 ont été isolés chez les bovins, les ovins, les caprins, les zébus, les daims, les porcins, les animaux de compagnie, les mouettes et les pigeons. D'autres sérotypes pathogènes pour l'Homme ont été isolés des matières fécales d'ovins et de bovins tels: O26:H11; O103:H2; O11:NM; O113:H21 [131].

I.1.1. Chez les bovins :

Les bovins sont considérés comme le réservoir principal de STEC [132]. Les taux de prévalence en STEC chez les bovins en élevages sont très élevés. 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 [133]. (Cf. Tableau II page 14)

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.

De même, 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 [155]. 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 [134]. Les données concernant les STEC responsables de diarrhée chez le veau sont rares. Ils appartiennent aux sérotypes O8 :H8; O20 :H19 ; O113 :H21. Ce dernier a été impliqué dans des cas de SHU chez l'Homme [156].

I.1.2. Chez d'autres espèces de ruminants :

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 par différents auteurs, entre 63 % et 66,6 % chez les moutons et entre 45 % et 56,1 % chez les chèvres [143,157]. D'une manière générale, les sérotypes détectés lors de ces études sont O91:NM, O128:H2 et O146:H21 [25].

En 2001, une étude portant ainsi sur 1623 fèces d'ovins, a révélé la présence de STEC porteurs de facteurs de virulence sur 85% des agneaux et 95% des moutons testés [158]. Parmi les souches isolées, 47,5% des STEC possédaient les gènes *stx1*, *stx2* et *ehxA*. Les ovins australiens semblent être porteurs de souches STEC possédant le variant *stx2d*[103]. Les buffles, les ruminants sauvages, les daims et autres gibiers sont également de potentiels réservoirs pour ce groupe de pathogènes. Le portage des STEC par ces animaux sauvages favorise la propagation et la dissémination de ces germes dans l'environnement.

Tableau II: Prévalence du portage des STEC chez différents types de bovins provenant de diverses exploitations

	Pays	Types de bovins	Fréquence%	Référence
STEC	Etats-Unis	Vaches laitières	8,4	[134,135]
		Génisse et Veaux	19	
		Bovins à l'herbe	4 à 15	
	Brésil	Bovins laitiers	49 à 82	[136,137]
		Bovins à viande	53	
	Australie	Bovins laitiers	16,7	[138,139]
		Bovins à viande	2,1	
	Japon	Veaux	46	[140]
		Génisse	66	
		Bovins laitiers	25,7 à 69	
	Inde	Bovins à Viande	10,5	[141]
	Ouganda	Zébus	28,3	[142]
	Allemagne	Bovins	21 à 63,2	[81,143,144]
		Bovins laitiers	18	
Canada	Bovins laitiers	0 à 60 et 0,5 à 11,1	[145,146,147]	
	Veaux	0 à 100		
Royaume-Uni	Vaches laitières	16,1	[148,149]	
	Bovins à viande	25,2		
France	Bovins à Viande	70,1	[150,151]	
	Bovins laitiers	91		
Espagne	Bovins laitiers	84	[152]	
Danemark	Bovins laitiers	6,3	[153]	
Nouvelle-Zélande	Bovins laitiers	27,3	[154]	

I.1.3. Chez les animaux domestiques :

Les STEC O157 ont été isolés chez des 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 ont également été cités comme étant susceptibles d'héberger des STEC [143]. En France, une étude menée sur le portage fécal n'a pas permis la détection d'*E.coli* O157:H7 parmi 182 porcs mais la prévalence a pu être estimée à 31% [159]. Au niveau des abattoirs le portage fécal des porcs testés varie de 0,2 % à 2 % en Europe, Japon et aux Etats-Unis et de 8 à 10 % en Amérique du Sud [131].

I.1.4. Chez les oiseaux :

Il existe très peu d'études permettant de préciser la prévalence en STEC dans les élevages de volailles. Le portage est probablement fécal, le taux de contamination des fèces varie de 0% en Allemagne à 9,6% en Slovaquie [143,160]. Cette dernière étude a révélé la présence d'*E.coli* O157:H7, et 19 des souches isolées produisaient les toxines Stx1 et Stx2. Ces pathogènes ont été isolés dans les sous-produits de volailles et dans le contenu intestinal de dindes. D'autres études expérimentales ont montré que les STEC colonisent parfaitement le caecum de poussins pendant de longues périodes [131, 161].

Le pigeon semble être un réservoir de souches STEC possédant le variant *stx2f* [107].

I.2. Contamination de 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 [12].

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. En outre, les STEC semblent pouvoir survivre et conserver leur capacité de virulence après survie pendant plusieurs semaines dans l'environnement de la ferme (abreuvoir, fumier et lisier), dans les sols et dans les eaux [23,162,163,164].

I.3. Contamination de la filière agro-alimentaire :

Plusieurs épidémies liées aux STEC ont été reliées à la consommation de denrées animales ou d'origine animale et végétale. La viande de bœuf, le lait et les produits laitiers, les fruits et les jus de fruits ainsi que les légumes crus (salade, radis, épinards, oignons, etc) font partie des aliments actuellement majoritairement incriminés [165,166,167,168,169,170]. Le risque de contamination des denrées d'origine animale est fonction de l'importance du portage animal, mais également du respect des procédures d'hygiène appliquées à la ferme (notamment pendant la traite), en abattoir et dans les ateliers de transformation [12].

Les tableaux III, IV présentent des données générales quant aux fréquences observées de produits contaminés par des STEC dans différents pays.

Tableau III: Fréquences observées de la contamination de la filière viande bovine par des STEC.

	Pays	Aliment	Fréquence %	Référence
STEC	Thaïlande	Bœuf cru	8,6	[171]
	Canada	Bœuf cru	2,4 à 36	[172,173]
	Royaume-Uni	Bœuf haché cru	13	[145,174]
		Saucisse de bœuf crue	17	
		Beef burger cru	22	
		Steak haché	0,44	
	Etats-Unis	Bœuf cru	2,8 à 23	[175,176,177]
		Veau cru	63	
Foie de veau cru		0,2		
France	Bœuf cru	0,1 à 11	[150,178]	
Hollande	Bœuf cru	0,4	[179]	
	Steak haché	0,7		

Tableau IV : Fréquences observées de la contamination de la filière lait et fromages par des STEC.

	Pays	Aliment	Fréquence %	Référence
STEC	France	Lait cru	21,5	[178,180]
		Fromages au lait cru	13 à 30,5	
		Fromages au lait pasteurisé	8,9	
	Allemagne	Lait cru	3,9	[181]
		lait cru certifié	2,1	
	Holland	Lait cru	0	[182]
	Angleterre	Lait cru	0	[183,184]
		Fromages au lait cru	0	
Italie	Lait cru	0	[185]	
Etats-Unis	Lait cru	0,75 à 10	[175,182]	

Les fruits et légumes peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol [28].

Aux Etats-Unis, une épidémie liée à la consommation d'épinards contaminés par *E. coli* O157:H7 a causé la mort de trois personnes [187]. Et du cidre non pasteurisé a également été la cause de plusieurs épidémies, l'origine d'une contamination fécale par des bovins a été suspectée [13,188].

En Espagne, 200 échantillons de légumes de différentes origines ont été analysés. Un seul échantillon de laitue (0,6%) était positif [189].

II. EPIDEMIOLOGIE HUMAINE :

II.1. Modes de transmission autre qu'alimentaire :

Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'Homme autre qu'alimentaire sont la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux.

II.1.1. Transmission inter-humaine :

Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire [190,191]. La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades.

Une transmission de personne à personne, par contact rapproché avec une ou des personnes ayant eu de la diarrhée, a été observée en milieu familial ou dans des collectivités : crèches, maisons de retraite ou institutions médico-sociales [192,193,194,195,196,197]. 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.

II.1.2. 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'infection et d'épidémies à *E. coli* O157 [198,199,200].

L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans un lac, ou dans une autre étendue d'eau naturelle ou dans une piscine a souvent été incriminée [201,202,203,204,205,206]. La bactérie est capable de survivre dans l'eau de boisson et/ou l'eau de baignade pendant plusieurs semaines [207].

II.1.3. Transmission par le contact avec les animaux de ferme et leur environnement :

La transmission d'infections à *E. coli* O157 à l'Homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors d'investigations de cas isolés, d'études de cas sporadiques et lors d'épidémies [208,209,210,211,212,213,214]. Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *E. coli* O157 est plus élevé dans les populations vivant en contact permanent avec les animaux [215]. Par exemple, chez les éleveurs anglais, la séroprévalence à O157 varie de 1,6% à 5% [216].

II.2. PATHOLOGIE HUMAINE :

Les STEC sont à l'origine de symptômes cliniques variés : diarrhée non sanglante, colite hémorragique, Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU), particulièrement chez l'enfant (<3ans) et le sujet âgé (>65ans), ou Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte [217].

- **La colite hémorragique :** principale manifestation clinique de l'infection à *E. coli* O157:H7 [177,217]. Elle se définit par des crampes abdominales, une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante chez un patient généralement apyrétique ou subfébrile [177]. La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués [217]. La période d'incubation de 2 à 10 jours [177,201] et l'évolution est généralement favorable en quelques jours. Il n'existe pas de traitement spécifique d'une nutrition parentérale est mise en route jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé du patient [218].

- **Le Syndrome Hémolytique et Urémique :** Le SHU est défini par la survenue simultanée d'une anémie hémolytique microangiopathique, d'une thrombopénie et d'une atteinte rénale. Il est la cause principale des insuffisances rénales aiguës chez l'enfant de moins de trois ans [219]. L'intervalle entre le début de la diarrhée et les premiers signes de SHU est en moyenne de quatre jours, variant de un à dix jours [220]. D'autres organes peuvent être atteints, le tube digestif (colite hémorragique, nécrose colique), le pancréas (pancréatite, diabète sucré transitoire ou définitif), le système nerveux central (convulsions, coma,...) et le foie (cytolyse, hépatomégalie) [221]. Il n'existe pas de traitement spécifique. Toutefois, un traitement symptomatique précoce et rigoureux a une importance capitale.

- **Le Purpura Thrombotique Thrombocytopénique :** Le PTT est un syndrome caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë [222]. La durée du PTT est habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais il peut parfois se prolonger pendant des mois. Quand la maladie progresse, elle peut toucher le système nerveux central et les reins. Des signes neurologiques (confusion, délire et troubles de conscience) sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale [50].

CHAPITRE IV

METHODES DE RECHERCHE DES STEC

Les STEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite d'avoir recours à différentes méthodes de détection. Elles sont des méthodes immunologiques, des systèmes rapides de détection immunologiques comme les méthodes ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [223] et des méthodes génétiques, la méthode Polymerase Chain Reaction (PCR) avec utilisation d'amorces spécifiques des gènes *stx*.

1. Méthodes biochimiques de détection des STEC :

1.1. Particularités biochimiques d'*E. coli* O157:H7 et des STEC non-O157

La plupart des réactions biochimiques d'*E. coli* O157:H7 sont typiques des *E. coli* à l'exception de la fermentation du sorbitol et de l'activité β -glucuronidase [79]. *E. coli* O157:H7 ne fermente pas le sorbitol (SOR-) d'où l'utilisation de la gélose Macconkey au sorbitol (SMAC) [50] et ne produit pas de β -glucuronidase active [54,55]. Cependant différentes études ont rapporté la fermentation du sorbitol en 24 heures et l'activité β -glucuronidase par O157:H7 impliquées dans des cas d'infections de SHU et d'épidémies d'origine alimentaire [224,225,226,227,228,229]

Les STEC non-O157 n'ont pas de caractéristiques biochimiques communes permettant leur isolement sur un milieu particulier. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose «entérohémolysine». Les colonies présentant une hémolyse caractéristique doivent toutes être confirmées comme STEC par mise en évidence du gène codant les Shigatoxines [230]. De ce fait, la recherche de STEC non O157 nécessite souvent d'utiliser directement la méthode de "Polymerase Chain Reaction" (PCR).

Il est à noter que des billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre d'autres sérotypes de STEC (O26, O111, O118, O91, O145) ont été développées (Dynabeads, Invitrogen). Enfin, les méthodes biochimiques sont intéressantes et fondamentales pour la détection d'*E. coli* O157:H7 mais restent inadaptées à la détection des souches «mutantes» du sérotype O157:H7 et à la détection des STEC non-O157 [50].

2. Tests immunologiques de détection des STEC :

2.1. Tests immunologiques de détection d'*E. coli* O157:H7 :

Des tests immunologiques très spécifiques et sensibles utilisant des anticorps dirigés contre l'antigène O157 sont utilisés pour la détection des *E. coli* O157 dans les aliments et / ou dans les échantillons environnementaux. Ils nécessitent une étape d'enrichissement. Les tests existants sur le marché sont nombreux. Ils comprennent des tests conventionnels ELISA en microplaques, des systèmes immunologiques en une étape et des systèmes complètement automatisés.

2.1.1. Systèmes immuno-chromatographiques et systèmes ELISA :

Ces méthodes donnent un résultat en 15 minutes (tests immunochromatographiques) ou en 2 heures (système ELISA en microplaques) après une phase d'enrichissement d'une durée de 24 heures [50].

- Tests immunochromatographiques : Le kit consiste en un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques d'*E.coli* O157:H7, un puits pour l'échantillon et une fenêtre de test et de contrôle. L'échantillon est placé dans le puits, puis diffuse le long de la membrane jusqu'à la zone test contenant l'anticorps anti-O157. L'apparition d'une ligne colorée dans la fenêtre test après 10 à 20 minutes indique un résultat positif signant la présence probable d'*E. coli* O157 dans l'aliment (Cf. Figure 06).

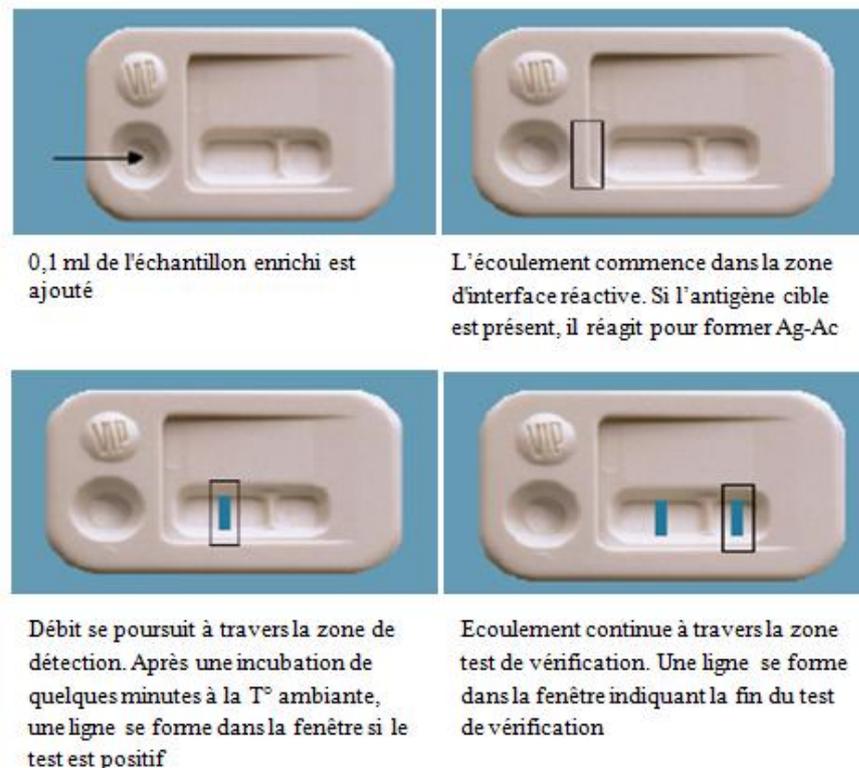


Figure 06: VIP test, test immunologique en « 1 étape ».

- Systèmes ELISA : les anticorps spécifiques d'*E. coli* O157 sont fixés au fond des puits de microplaques. L'échantillon est déposé dans ces puits. Après incubation et une série de lavage, un anticorps révélateur anti-O157 est ajouté pour détecter le couple anticorps-bactérie. Ce deuxième anticorps est couplé à une enzyme qui permet une révélation colorimétrique.

2.1.2. Système automatisés :

L'éventail des méthodes immunologiques complètement automatisées est beaucoup plus restreint.

Le VIDAS ECO (Biomérieux) consiste en un kit qui permet la détection entièrement automatisée d'*E. coli* O157 après une phase d'enrichissement de 24 heures. Le principe de ce kit est celui d'un système ELISA. L'enrichissement très sélectif basé sur un bouillon CT-SMAC permet de réduire le nombre de faux positifs. Ce kit est composé de 2 éléments prêts à l'emploi : un cône à usage unique, servant à la fois de phase solide et de système de pipetage, dont la face interne est recouverte d'anticorps anti-O157, et une barrette contenant les solutions de lavage et de révélation (Cf. Fig. 07 page 20). L'échantillon alimentaire est placé dans la barrette subite des cycles d'aspiration-refoulement. Les *E. coli* O157:H7 présentes dans le bouillon sont captés par les anticorps du cône. Les éléments

restés libres sont éliminés grâce à plusieurs lavages. En phase finale, des anticorps révélateurs anti-O157 sont aspirés dans le cône. Ces anticorps sont marqués à la phosphatase alcaline, enzyme qui permet la révélation colorimétrique interprétée par l'appareil VIDAS.

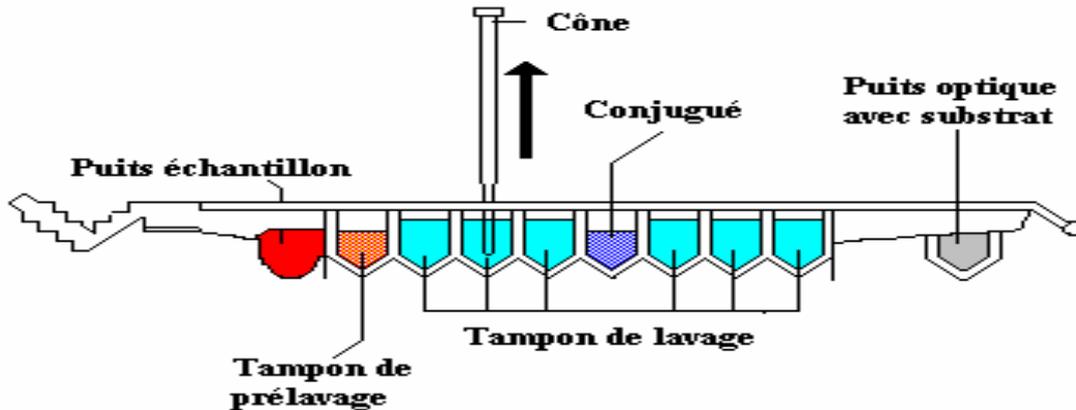


Figure 07: Barrettes VIDAS ECO [53].

2.2. Tests immunologiques de détection des STEC non-O157 :

La détection de la production de Shigatoxines se fait essentiellement par la mise en évidence du pouvoir cytopathogène des Shigatoxines sur les lignées cellulaires Vero [231]. Ainsi peuvent être testés des échantillons fécaux, des cultures bactériennes et des aliments [232]. Les bactéries se multiplient en bouillon trypticase soja, les surnageants de cultures sont ajoutés à la lignée cellulaire Vero. Ces dernières prennent une forme ronde et se détachent les unes des autres en présence de Shigatoxines. La croissance des STEC dans des milieux dépourvus de fer permet d'augmenter la production des toxines Stx1 mais pas des Stx2 [70]. Pour confirmer que l'effet cytopathogène exercé sur les cellules Vero est effectivement dû aux Shigatoxines, il faut réaliser des tests de neutralisation en utilisant des anticorps dirigés contre les Stx1 et les Stx2 [233].

Des kits ELISA permettant la détection des Shigatoxines dans les matières fécales sont commercialisés et peuvent être utilisés dans les laboratoires de diagnostic classique [145,234,235].

3. Méthodes génétiques de détection des STEC :

La détection des gènes *stx* (*stx1* et/ou *stx2*) s'effectue soit directement sur le génome total de la bactérie isolée par hybridation, soit après amplification d'une partie des gènes recherchés par PCR, par PCR ELISA ou par PCR en temps réel [236,237,238]. Ces méthodes restent les méthodes par excellence pour la détection des STEC puisque la seule caractéristique commune à l'ensemble des STEC est, par définition, la présence d'un gène *stx*.

3.1. La P.C.R (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acide nucléique doit s'y associer afin de servir d'amorce. Cette amorce, de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier, est un oligonucléotide synthétique d'une

longueur de 17 à 30 bases. Son association à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin. Elle peut être réalisée à partir de l'ADN d'une culture pure, de matrices alimentaires ou de matières fécales. L'application peut être effectuée directement après enrichissement ou après isolement des souches sur milieu spécifique. La PCR est très sensible et spécifique. Grâce à cette technique, l'ADN est amplifié à un niveau suffisant même lorsque le nombre de bactéries dans l'échantillon est très faible [239].

La PCR consiste en une succession cyclique de trois étapes (Cf. Fig. 08 page 22). Le milieu réactionnel tamponné comprend tous les éléments indispensables : les précurseurs trinucleotidiques (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation Mg^{2+} , l'ADN polymérase et les amorces. A ce milieu est ajouté l'ADN extrait du milieu biologique à étudier [240].

- Première étape : dénaturation thermique. Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogènes.
- Deuxième étape : hybridation des amorces(ou *annealing*). Le milieu réactionnel contient deux amorces, chacune complémentaire d'un des brins. Celles-ci déterminent les bornes de la séquence à amplifier.
- Troisième étape : extension des amorces. Une ADN polymérase (la Taq polymérase) allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée.

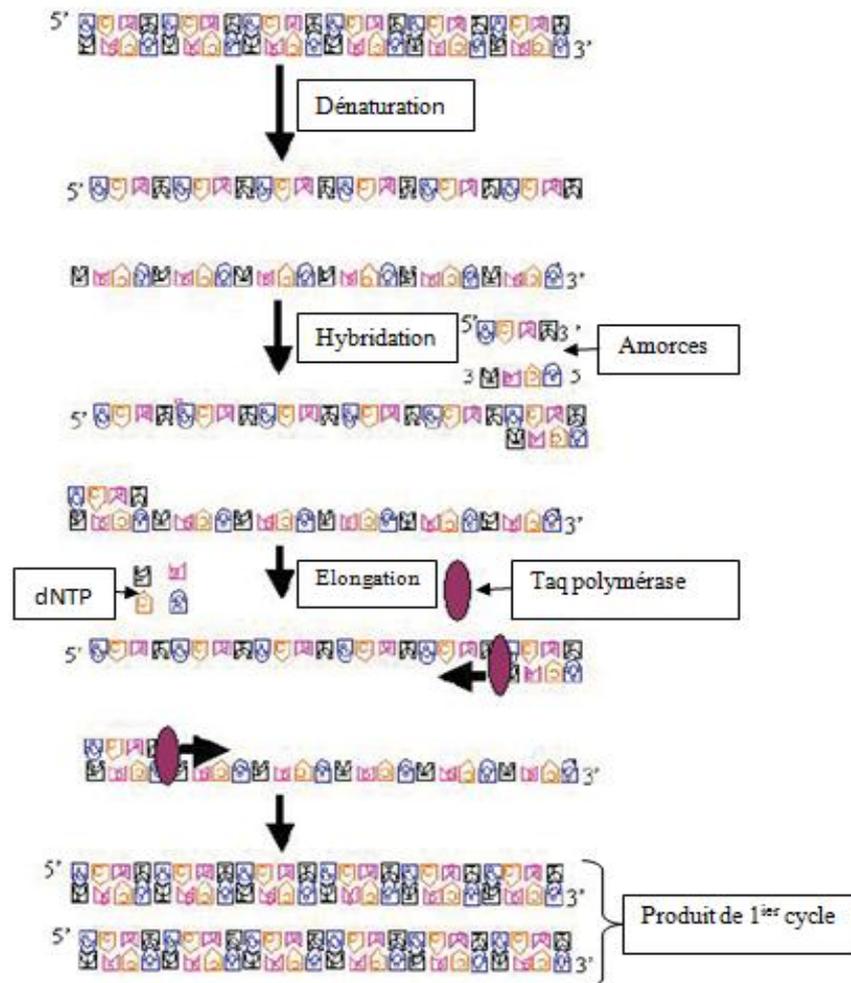
Un nouveau cycle commence par la succession de ces trois étapes. A chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence cible.

Les méthodes génétiques sont, la plupart du temps, basées sur la recherche des gènes *stx* par PCR [239] et les amorces conseillées ont été décrites par Lin *et al.* [241]. L'utilisation de la PCR pour détecter les STEC s'est développée au cours des 10 dernières années mais le premier système a été mis au point dès 1989 par Karch et Meyer avec des amorces "dégénérées" (mélange de plusieurs amorces) permettant d'amplifier *stx1* et *stx2* [242]. Les amplifiats obtenus étaient identifiés par hybridation avec des sondes spécifiques complémentaires d'une partie de la séquence amplifiée.

Plusieurs matrices (viande de bœuf, viande de porc, lait de chèvre, fèces de bœuf et fèces de porc) contenant différentes souches de STEC ont été testées. Toutes les souches de STEC, appartenant à 50 sérotypes différents, ont pu être détectées avec la méthode de READ *et al.*, [243].

Néanmoins, tous les protocoles de PCR appliqués sur les aliments se heurtent au problème lié à la présence d'inhibiteurs de la polymérase. Pour éviter cela, il est alors nécessaire d'isoler les bactéries ou d'extraire leur ADN [244,245].

Plusieurs auteurs ont décrit des systèmes de détection des STEC faisant appel aux techniques récentes de PCR en temps réel. Cette dernière permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent (fluorochrome) du produit de la PCR. L'appareil de PCR en temps réel mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Les données concernant la quantité du produit amplifié sont enregistrées "en temps réel". Ces méthodes présentent de plus l'avantage d'être quantitatives, sensibles, spécifiques et rapides.



Il s'agit d'une réaction en trois étapes. (i) Dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin par la chaleur (ii) Hybridation des amorces par diminution de la température sous leur température d'hybridation (iii) Elongation des amorces par une ADN polymérase thermostable. Ce processus peut subir une "cyclisation" qui traduit par une augmentation exponentielle du nombre de molécules d'ADN amplifiées.

Figure 08 : Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction) [238]

3.2. L'hybridation ADN/ADN:

Le principe de la méthode repose sur la propriété qu'ont les chaînes d'acides nucléiques simple brin de ne s'hybrider qu'avec des fragments de séquences complémentaires. Elle utilise également la propriété de l'ADN à se fixer sur des supports membranaires de nitrocellulose. Cette technique consiste à immobiliser l'ADN génomique dénaturé de la colonie à étudier sur une membrane et d'utiliser en solution des sondes marquées spécifiques des gènes recherchés (*stx1*, *stx2*, ...).

Karch et Meyer [242] ont utilisé 4 oligonucléotides correspondant à 4 régions différentes du gène *stx1* et un oligonucléotide dérivé du gène *stx2* d'une souche de *E. coli* O157:H7. Cinquante isolats appartenant à 5 sérotypes différents de STEC ont été détectés par hybridation sur colonie. Les 4 sondes dérivées de *stx1* ont toutes hybridé avec les souches qui synthétisaient Stx1 seule et les souches du sérotype O157:H7, coexprimant Stx1 et Stx2. Ces résultats suggèrent que les régions choisies pour la fabrication des sondes étaient très conservées entre souches. Cette méthode d'hybridation sur colonie pourrait donc servir de test spécifique et sensible avec possibilité de diagnostic.

V. PARTIE EXPERIMENTALE

La présente étude a porté sur le portage asymptomatique des Shigatoxines chez le bovin pour cela nous avons adopté une démarche comportant deux volets, à savoir :

1. L'extraction d'ADN à partir de prélèvements de fèces
2. Caractérisation des gènes de Shigatoxines par PCR.
 - a. Caractérisation de la séquence commune des gènes *stx1* et *stx2* comme méthode de screening ;
 - b. Caractérisation des gènes *stx1* et *stx2*

MATERIEL ET METHODES

Cadre de l'étude :

L'étude s'est déroulée durant la période de mai 2011 à juin 2012. Le travail expérimental a été réalisé au laboratoire de recherche « ECOQUAPA » de la faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques de l'université Saad Dahlab-Blida et au laboratoire « Gripes et virus respiratoires » de l'institut pasteur d'Algérie (IPA), Annexe Sidi Fredj (Alger).

1. MATERIEL :

1.1. Prélèvements:

La présente étude a porté sur 200 échantillons de fèces prélevés à partir de vaches laitières adultes appartenant à 27 fermes de la wilaya de Blida (Cf. Tableau V page 24).

Les prélèvements de fèces, réalisés par une équipe des vétérinaires selon le protocole décrit par Raynaud et Heuchel [246], ont été conditionnés dans des pots stériles d'une capacité de 60 ml et transportés sous froid au laboratoire pour traitement. Le détail de protocole est rapporté en annexe (Cf. annexe 1).

Tableau V : nombre de prélèvements effectué par élevage.

N° ordre	Codification des élevages	Nombre de vaches prélevées	Localité
.1	F2	15	Soumaa
.2	F9	3	Beni Mered
.3	F10	8	Beni Mered
.4	F11	8	O.E.A
.5	F12	5	O.E.A
.6	F13	6	Boufarik
.7	F14	8	Soumaa
.8	F15	6	Blida
.9	F16	8	Blida
.10	F17	5	Blida
.11	F18	4	Chiffa
.12	F19	6	Boufarik
.13	F20	5	Boufarik
.14	F21	24	O.E.A
.15	F22	24	Ain Roumana
.16	F23	3	Chebli
.17	F24	3	Chebli
.18	F25	8	Chebli
.19	F26	4	Chebli
.20	F27	6	Chebli
.21	F28	10	Boufarik
.22	F29	4	Chebli
.23	F30	5	Bouinan
.24	F31	8	Bouinan
.25	F32	8	Bouinan
.26	F33	3	Bouinan
.27	F34	3	Chebli
Total	27	200	

1.2. Matériel non biologique :

1.2.1. Kit d'extraction d'ADN :

Nous avons utilisé le kit d'extraction d'ADN QIAamp® DNA Stool comportant :

- 50 colonnes QIAamp,
- 200 tubes collecteurs de 2 ml,
- Une boîte de 50 comprimés InhibitEX,
- Les tampons ASL, AL, AW1, AW2, AE et
- La protéinase K.



Figure 09 : Kit d'extraction d'ADN (photo originale)

1.2.2. 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, nous avons utilisé les amorces produites par Eurogentec (France) rapportées dans le tableau VI.

Tableau VI : Amorces oligonucléotidiques utilisées dans la réaction de PCR.

Facteur de virulence	Séquence (5' – 3')	Taille du produit (pb)	REF
<i>stx1</i> & <i>stx2</i>	GAG-CGA-AAT-AAT-TTA-TAT-GTG TGA-TGA-TGG-CAA-TTC-AGT-AT	518	[140,247]
<i>stx1</i>	AGA-GCG-ATG-TTA-CGG-TTT-G TTG-CCC-CCA-GAG-TGG-ATG	388	[248,249]
<i>stx2</i>	TGG-GTT-TTT-CTT-CGG-TAT-C GAC-ATT-CTG-GAC-TCT-CTT	807	[248,249]

1.2.3. 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
- MgCl₂, 25mM
- dNTP (10mM)
- Taq polymérase (5U/μl)

1.2.4. Petit matériel et équipements de laboratoire :

1.2.4.1. Petit matériel :

Nous avons utilisé les équipements du laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire. Les appareils, les réactifs utilisés dans le présent travail sont rapportés en annexe (Cf. annexe 2)

1.2.4.2. Thermocycleur :

Nous avons utilisé le thermocycleur « Mastercycler gradient (EPPENDORF) » pour la PCR.



Figure 10 : Thermocycleur Mastercycler gradient (photo originale)

1.2.4.3. 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 11 : Dispositif d'électrophorèse (photo originale)

1.2.4.4. 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 12 : Dispositif de visualisation de migration (photo originale)

2. METHODES :

La démarche expérimentale adoptée a comporté trois étapes, à savoir :

- a. Traitement du prélèvement de fèces.
- b. Extraction d'ADN et contrôle de la qualité des ADN extraits
- c. Analyse par PCR.

a. Traitement du prélèvement de fèces :

- Peser 25g de fèces dans un pot stérile de 100 ml
- Ajouter 100 ml de PBS à pH 7,4 (phosphate buffered saline)
- Vortexer 1 min
- Filtrer une première fois le mélange à travers une gaze hydrophile stérile
- Filtrer une deuxième fois la suspension à travers un papier filtre de porosité = $0,45\mu\text{m}$ (Cf. Fig. 13).
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 min puis
- Laver le culot avec du PBS à pH 7,4
- Reprendre cette opération deux fois de suite.
- Congeler le culot ainsi obtenu pour l'extraction d'ADN.



Figure 13 : Traitement des prélèvements de fèces (photo originale)

b. Extraction d'ADN et contrôle de la qualité des ADN extraits :

• Extraction :

L'extraction d'ADN a été réalisée sous hotte à flux laminaire dans un box dédié à l'extraction sur les recommandations du protocole du kit QIAamp® DNA Stool (Qiagen) à partir du culot de centrifugation.

- Ajouter 1,4 ml de tampon ASL au culot de fèces traité et vortexer pendant 1 min continuellement jusqu'à homogénéisation complète de l'échantillon. (Cf. photo 1 fig. 14 page 28)
- Transférer le mélange dans un microtube de 2 ml.
- Chauffer 5 min à 70°C pour augmenter le rendement en ADN (3 à 5 fois) et faciliter la lyse des bactéries.
- Vortexer 15 sec et centrifuger à 13200 rpm pendant 1 min.

- Récupérer 1,2 ml de surnageant et déposer dans un tube de 2 ml stérile et ajouter un (1) comprimé d’InhibitEX à chaque échantillon et vortexer immédiatement jusqu’à complète dissolution. (Cf. photo 2 Fig. 14)
- Incuber la suspension à température ambiante pendant 1min afin de permettre aux inhibiteurs de se fixer sur l’InhibitEX.
- Centrifuger l’échantillon à 13200 rpm pendant 3 min
- Transférer tout le surnageant dans un tube de 1,5 ml stérile puis centrifuger à 13200 rpm pendant 3 min.
- Déposer 15 µl de Protéinase K dans un nouveau tube de 1,5ml, ajouter 200µl du surnageant ainsi obtenu précédemment puis ajouter 200 µl de tampon AL et vortexer le tout pendant 15 sec et mettre à incuber à 70°C pendant 10 min.
- Après incubation, ajouter 200µl d’éthanol à 96% au lysat et vortexer.
- Identifier la colonne QIAamp, la placer dans un tube collecteur de 2 ml puis déposer la totalité du lysat obtenu dans la colonne. Fermer le capuchon et centrifuger à 13200 rpm pendant 1 min. (Cf. photo 3 Fig. 14)
- Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube de 2 ml puis jeter le tube collecteur contenant l’effluent et ajouter 500µl de tampon AW1 puis centrifuger à 13200 rpm pendant 1 min.
- Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml puis jeter le tube contenant l’effluent, ajouter 500 µl de tampon AW2 puis centrifuger à 13200 rpm pendant 3 min (Cf. photo 4 Fig. 14)
- Mettre la colonne QIAamp dans un tube stérile de 1,5 ml, déposer directement au centre de la colonne 200µl de tampon AE et incuber à température ambiante pendant 1 min puis centrifuger à 13200 rpm pendant 1 min.
- L’ADN ainsi extrait est réparti en aliquotes puis stockés au froid.

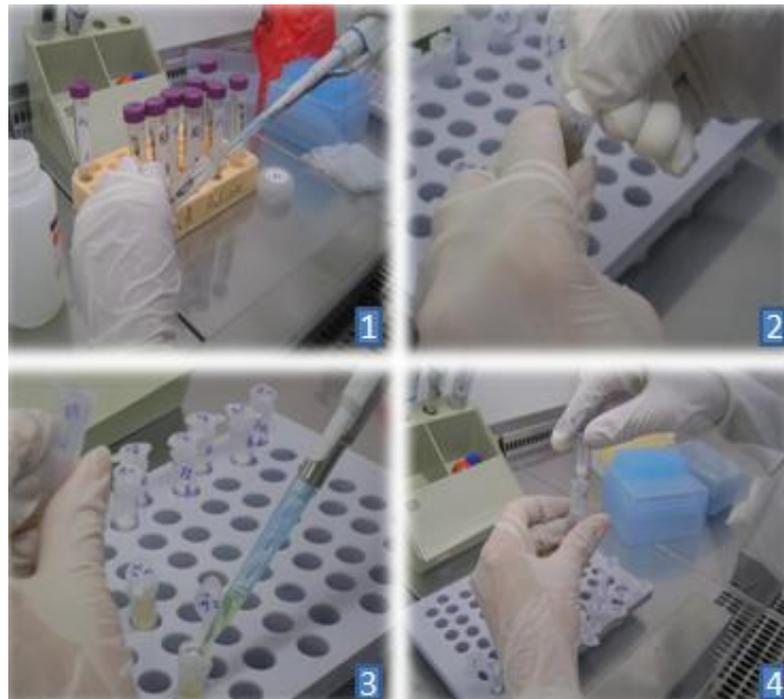


Figure 14 : Etapes de l’extraction d’ADN (photo originale)

- **Contrôle de la 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 directement dans un Erlenmeyer
- Mesurer 100 ml de TAE et le verser dans le récipient
- Mélanger et chauffer au four à micro-onde : porter à ébullition et arrêter plusieurs fois jusqu'à ce que la solution soit limpide
- Laisser refroidir sur la pailleuse jusqu'à pouvoir toucher le récipient sans se brûler
- Couler le tout dans le support de coulage et le laisser solidifier. (Cf. Fig. 15)
- Retirer le ruban adhésif



Figure 15 : coulage de gel

- **Préparation de la cuve à électrophorèse :(Figure 16)**

- Disposer le gel (toujours sur son support) dans la cuve de migration, les puits du coté de la cathode (pole -).
- Remplir la cuve de tampon TAE jusqu'à recouvrir le gel.
- Retirer les peignes doucement et bien verticalement.

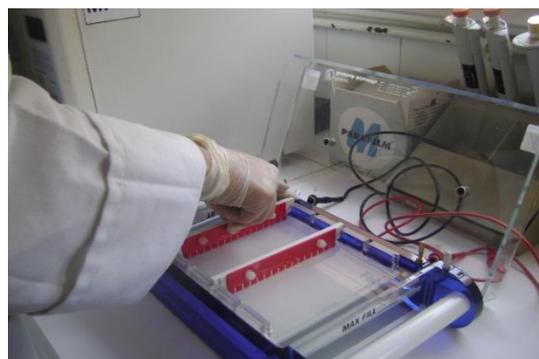


Figure 16 : Etapes de la préparation de la cuve à électrophorèse

○ **Dépôt des échantillons : (Figure 17)**

- Préparer un plan de dépôt
- Déposer 5 μ l de MT additionné de 2 μ l de tampon de chargement (TC) et 15 μ l de chaque échantillon à analyser additionné de 2 μ l de tampon dans les puits correspondants.
- Remettre le couvercle de la cuve



Figure 17 : Etapes de dépôt des échantillons

○ **Electrophorèse :(Figure 18)**

- Brancher les électrodes au générateur de courant
- Faire migrer à 100 volts pendant 30 à 45 min ; vérifier que le courant passe et que l'électrophorèse se réalise bien nous observons l'émission de bulles au niveau des électrodes. A ce moment les ADN vont se déplacer à travers les mailles de l'agarose
- A la fin de la migration, éteindre le générateur, retirer les électrodes, retirer le couvercle pour saisir délicatement le support de migration.
- Introduire le gel toujours sur sans support dans un bain de BET à 10mg/ml et laisser le prendre 20min.

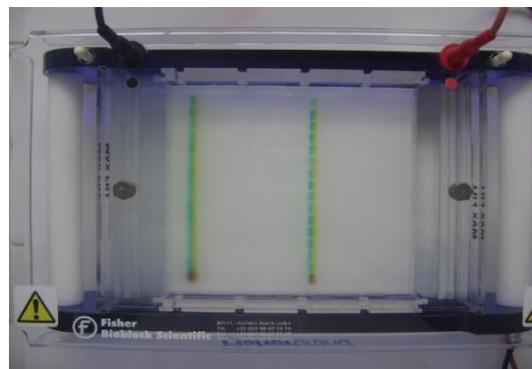


Figure 18 : Début de la migration

○ **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 MT moléculaire.

c. Analyse par PCR :

La PCR a été réalisée sous hotte PCR HEPA/UV3 dans un box dédié à la préparation du Mix.

L'échantillon à analyser par PCR a été traité comme suit :

- Dans chaque tube de réaction PCR (cône Eppendorf de 0,2ml), déposer 10 µl 5X Green or Colorless Go taq Flexi Buffer (1X), 3 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µl de dNTP (0,2 mM), 1 µl de l'amorce 1 (0,4 µM), 1 µl de l'amorce 2 (0,4 µM), 23,70 µl d'eau distillée stérile, 0,3 µl de Taq polymérase (Go Taq DNA Polymerase) (5U/µl), soit 40 µl du Mix et rajouter :
 - 10µl d'ADN de chaque échantillon à analyser pour un volume final de 50µl.
 - 10µl d'ADN de la souche de référence 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 VII.

Tableau VII : Concentrations et volumes des réactifs utilisés dans la PCR

Réactifs	Volume final (µl)	Concentration Finale
5X Green or Colorless Go Taq® Flexi Buffer ¹	10	1X
MgCl ₂ , 25mM ¹	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	

¹Décongeler complètement et vortexer soigneusement avant utilisation

L'amplification a été réalisée selon le programme suivant :

- 1 cycle de dénaturation à 94°C pendant 3 min,
- 35 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant 90 sec,
- 35 cycles d'hybridation à 59°C pendant 90 sec,
- 35 cycles d'élongation à 72°C pendant 120 sec,
- 1 cycle d'élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Détection des produits d'amplification par électrophorèse :

Les produits finaux de la PCR seront détectés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% comme rapporté précédemment (Cf. paragraphe contrôle de la qualité des ADN extraits).

Les échantillons sont en premier analysés pour la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2*, les échantillons positifs sont ensuite analysés pour la recherche des gènes *stx1* et *stx2* séparément.

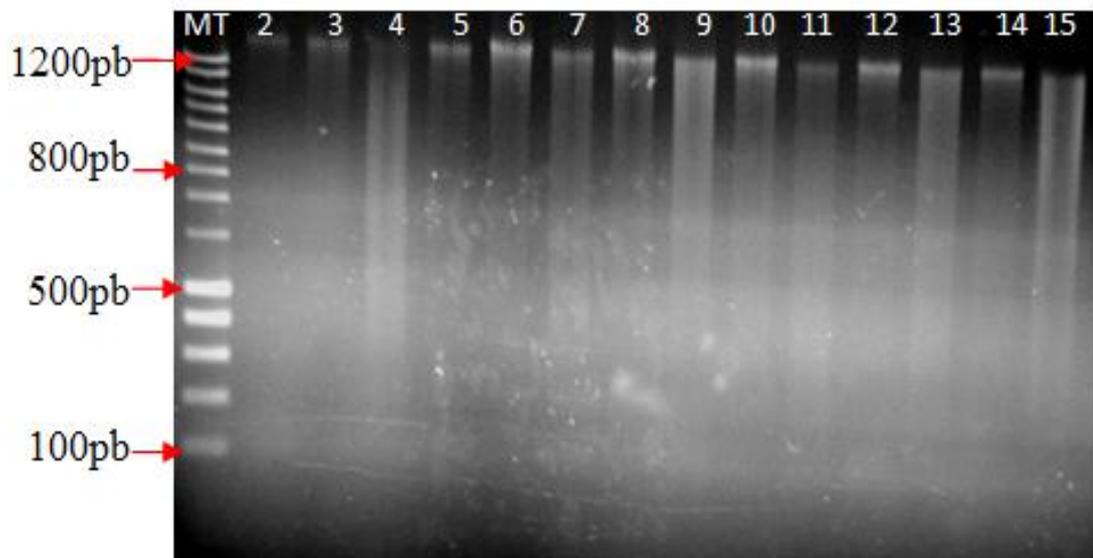
RESULTATS ET DISCUSSION

1. RESULTATS :

Le traitement des prélèvements de fèces a permis l'obtention de 200 éluas (ADN).

1. Contrôle de la qualité d'ADN :

La qualité des ADN extraits est observée sur les profils électrophorétiques des gels d'électrophorèse (Cf. photo 19).



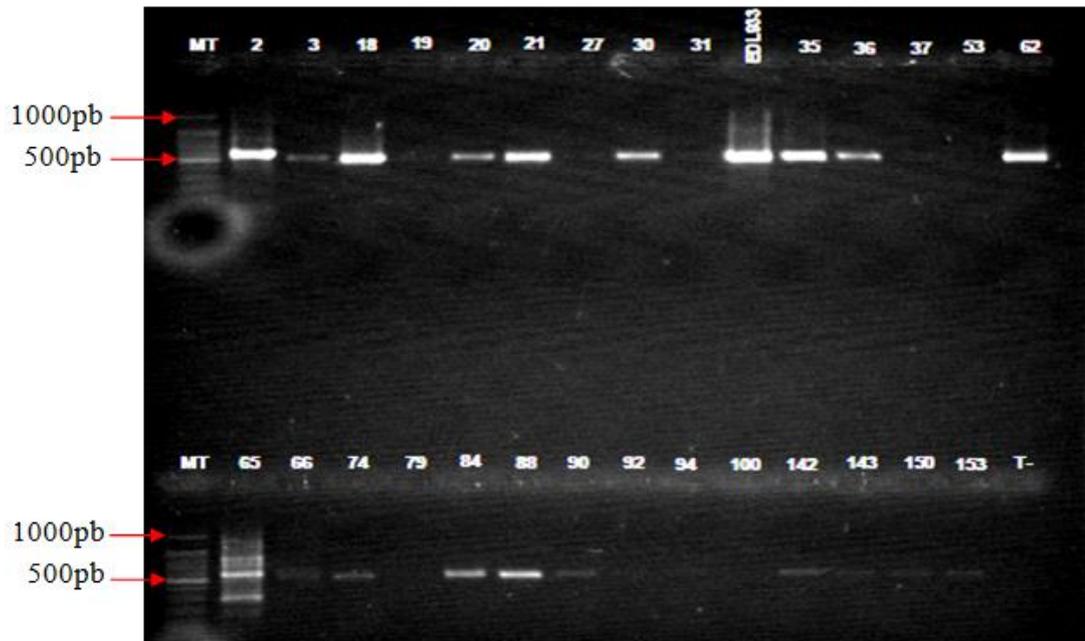
MT : marqueur de taille ; de 2 à 15 : échantillons analysés

Figure 19 : Photo du gel de contrôle de la qualité (14 échantillons d'ADN extraits + MT) (photo originale).

Les profils électrophorétiques obtenus sur les différents gels sont révélateurs de la bonne qualité des ADN extraits.

2. Recherche de la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2* :

Le résultat de la recherche de la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2*, sur les produits de PCR, est rapporté sur les gels d'électrophorèse (Cf. Figure 20 page 33)



MT : marqueur de taille; T- : témoin négatif (Blanc); EDL933 : témoin positif; autres puits : produits PCR.

Figure 20 : Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2* (photo originale).

Les profils électrophorétiques correspondant à la migration des produits PCR montrent la présence d'une bande à 518 pb chez le témoin positif et l'absence de bande chez le témoin négatif. La présence d'une bande à 518 pb dans les produits PCR correspondant aux échantillons analysés révèle la présence du gène recherché et l'échantillon est considéré comme positif.

Les résultats de la recherche de la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2* pour les 200 échantillons analysés sont rapportés en annexe 03. La synthèse de ces résultats est rapportée dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats de la recherche de la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2*.

	Séquence du gène commun <i>stx1</i> & <i>stx2</i>	
	Présence	Absence
Echantillons analysés n=200	61	139
%	30,5	69,5

D'après ces résultats ; il en ressort que 30,5% des prélèvements ont révélé la présence de la séquence commune.

Le traitement des résultats par élevage est rapporté dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats des échantillons analysés par rapport à la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2*

N° ordre	Codification des élevages	Nombre de vaches prélevées	Portage de la séquence commune des gènes <i>stx1</i> & <i>stx2</i>		Elevage	
			Vache positive	Vache négative	positif	négatif
1	F2	15	7	8	+	
2	F9	3	2	1	+	
3	F10	8	6	2	+	
4	F11	8	4	4	+	
5	F12	5	4	1	+	
6	F13	6	0	6		-
7	F14	8	4	4	+	
8	F15	6	5	1	+	
9	F16	8	5	3	+	
10	F17	5	0	5		-
11	F18	4	4	0	+	
12	F19	6	0	6		-
13	F20	5	1	4	+	
14	F21	24	5	19	+	
15	F22	24	1	23	+	
16	F23	3	0	3		-
17	F24	3	0	4		-
18	F25	8	4	4	+	
19	F26	4	2	2	+	
20	F27	6	0	6		-
21	F28	10	1	9	+	
22	F29	4	4	0	+	
23	F30	5	1	4	+	
24	F31	8	1	7	+	
25	F32	8	0	8		-
26	F33	3	0	3		-
27	F34	3	0	3		-
Total	27	200	61	139	18	09
	%		30,5	69,5	66,67	33,3

Le traitement des résultats montrent que :

- 61 échantillons de fèces se sont révélés positifs à la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2*, soit une prévalence de 30,5% de vache porteuse de STEC ;
- 18 élevages comportent au moins une (01) vache porteuse de STEC, soit une prévalence de 66,67%.

- **Portage intra-élevage :**

Le traitement des résultats pour chaque élevage est rapporté dans le tableau n° X.

Tableau X : Estimation du portage fécal de gènes *stx* par élevage.

N° ordre	Codification des élevages	Nombre de vaches prélevées	Nombre des cas positifs	%
1	F2	15	7	46,67
2	F9	3	2	66,67
3	F10	8	6	75
4	F11	8	4	50
5	F12	5	4	80
6	F14	8	4	50
7	F15	6	5	83,33
8	F16	8	5	62,5
9	F18	4	4	100
10	F20	5	1	20
11	F21	24	5	20,83
12	F22	24	1	4,17
13	F25	8	4	50
14	F26	4	2	50
15	F28	10	1	10
16	F29	4	4	100
17	F30	5	1	20
18	F31	8	1	12,5
19 à 27		43	0	0

Il en ressort ce qui suit :

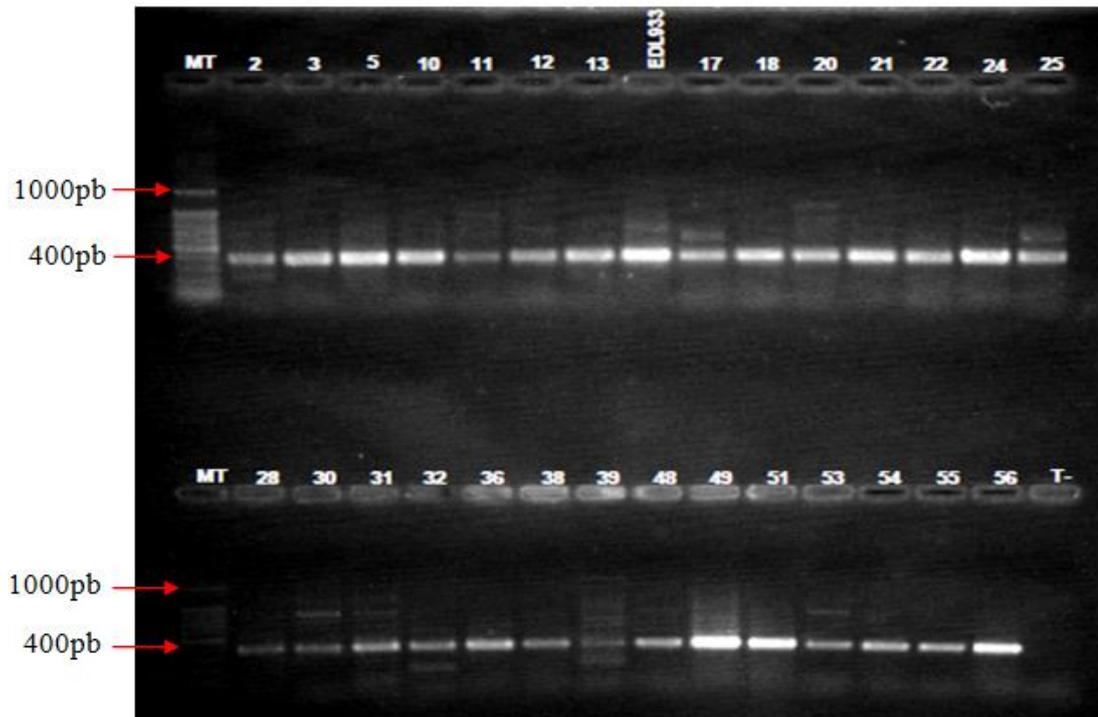
- Neuf (09) élevages se sont révélés négatifs car ne comportant aucun animal positif sur les animaux prélevés, soit un taux de portage nul (0%).
- Dix huit (18) élevages se sont révélés positifs et comportent au minimum un (01) animal positif, soit un taux de portage variant de 4,17 à 100%.

3. Recherche des gènes *stx1* et *stx2* séparément :

Sur les 61 échantillons positifs pour la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2*, nous avons recherché les gènes *stx1* et *stx2* séparément.

- **Portage du gène *stx1* :**

Le résultat de la recherche de la séquence du gène *stx1*, sur les produits de PCR, est rapporté sur les gels d'électrophorèse (Cf. Figure 21 page 36)



MT : marqueur de taille ; T- : témoin négatif; EDL933 : témoin positif; Les autres numéros correspondent tous aux échantillons positifs pour le gène *stx1*

Figure 21 : Photo du gel d'électrophorèse de deux séries de produits PCR pour la recherche de la séquence de gène *stx1* (photo originale).

Les profils électrophorétiques correspondant à la migration des produits PCR montrent la présence d'une bande à 388 pb chez le témoin positif et l'absence de bande chez le témoin négatif. La présence d'une bande à 388 pb dans les produits PCR correspondant aux échantillons analysés révèle la présence du gène recherché et l'échantillon est considéré comme positif.

Les résultats de l'analyse par PCR pour la recherche de la séquence de gène *stx1* sont rapportés dans le tableau XI

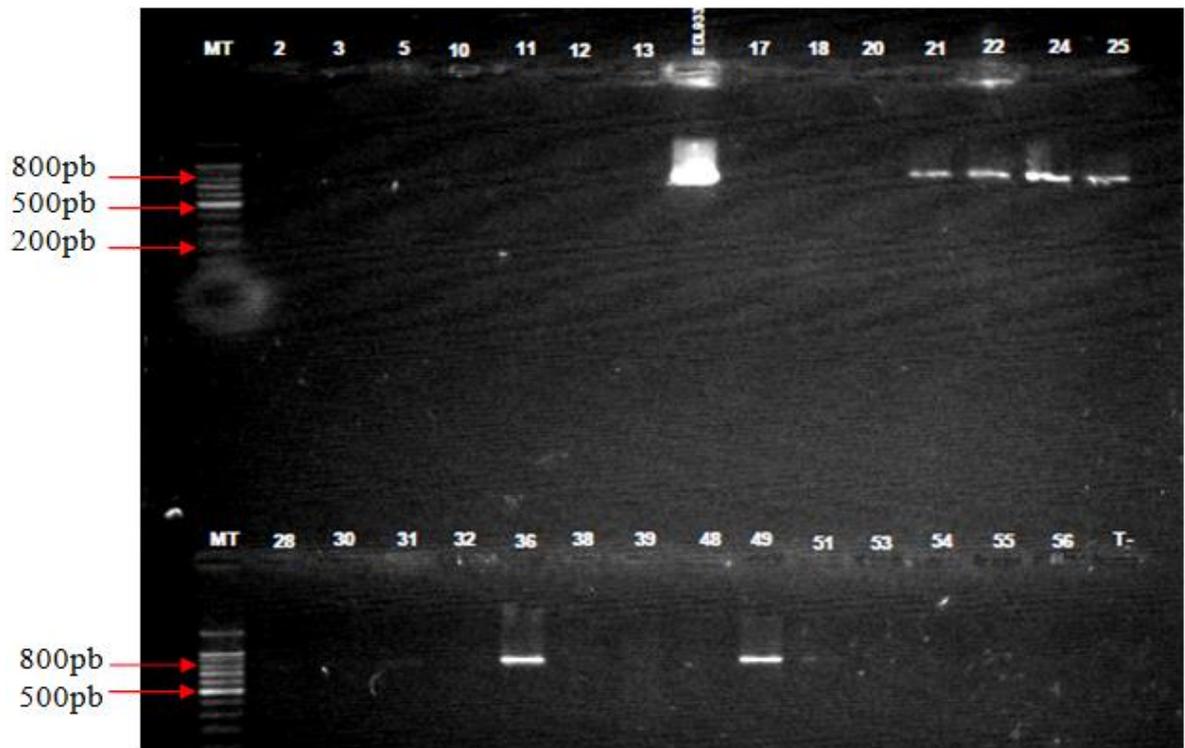
Tableau XI : Résultats de la recherche de la séquence du gène *stx1*.

	Séquence du gène <i>stx1</i>	
	Présence	Absence
Echantillons analysés n=61	61	00
%	100	00

La totalité des échantillons, dépistés positifs (n=61) pour la séquence commune (*stx1* & *stx2*), analysés ont révélé la présence du gène *stx1*.

- **Portage du gène *stx2* :**

Le résultat de la recherche de la séquence du gène *stx2*, sur les produits de PCR, est rapporté sur les gels d'électrophorèse (Cf. Figure 22 page 37).



MT : marqueur de taille ; T- : témoin négatif ; EDL933 : témoin positif ; Les numéros 21, 22, 24, 25, 36 et 49 correspondent aux échantillons positifs portant le gène *stx2*.

Figure 22: 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 et l'absence de bande chez le témoin négatif. La présence d'une bande à 807 pb dans les produits PCR correspondant aux échantillons analysés révèle la présence du gène recherché et l'échantillon est considéré comme positif.

Les résultats de l'analyse par PCR pour la recherche de la séquence de gène *stx2* sont rapportés dans le tableau XII:

Tableau XII : Résultats de la recherche de la séquence du gène *stx2*.

	Séquence du gène <i>stx2</i>	
	Présence	Absence
Echantillons analysés n=61	10	51
%	16,4	83,6

Sur les 61 échantillons dépistés positifs pour la séquence commune (*stx1* & *stx2*) analysés, seuls 10 ont présenté le gène *stx2* (soit un taux de 16,4%).

Le traitement des résultats du portage des STEC comportant les gènes *stx1* et *stx2* à l'échelle individuelle (vache) est rapporté dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Résultats du portage des STEC ayant les gènes *stx1* et *stx2*

N° ordre	Codification élevages	Vaches prélevées (n)	vaches positives (n)	Portage du gène <i>stx1</i> seul		Portage du gène <i>stx2</i> seul		Portage des gènes <i>stx1</i> et <i>stx2</i>	
				(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
1	F2	15	7	7	100	0	0	0	0
2	F9	3	2	2	100	0	0	0	0
3	F10	8	6	1	16,7	0	0	5	83,3
4	F11	8	4	4	100	0	0	0	0
5	F12	5	4	2	50	0	0	2	50
6	F14	8	4	2	50	0	0	2	50
7	F15	6	5	5	100	0	0	0	0
8	F16	8	5	5	100	0	0	0	0
9	F18	4	4	4	100	0	0	0	0
10	F20	5	1	1	100	0	0	0	0
11	F21	24	5	5	100	0	0	0	0
12	F22	24	1	1	100	0	0	0	0
13	F25	8	4	4	100	0	0	0	0
14	F26	4	2	2	100	0	0	0	0
15	F28	10	1	1	100	0	0	0	0
16	F29	4	4	3	75	0	0	1	25
17	F30	5	1	1	100	0	0	0	0
18	F31	8	1	1	100	0	0	0	0
Total	18	200	61	51	-	0	-	10	-
%	-	-	-	-	83,6	-	0	-	16,4

Il en ressort que :

- Aucune vache ne porte de STEC ayant le gène *stx2* seul (0%),
- Cinquante et une (51) vaches portent des STEC ayant le gène *stx1* seul, soit une prévalence de 83,6%.
- Dix (10) vaches portent des STEC ayant les gènes *stx1* et *stx2* simultanément, soit une prévalence de 16,4%.

L'interprétation du portage des STEC ayant les gènes *stx1* et *stx2* à l'échelle élevage est rapporté dans le tableau n° XIV.

Tableau XIV : Traitement des résultats du portage des gènes *stx1* et *stx2*.

Gènes		Elevages	
<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	Nombre	%
+	+	4	22,22
+	-	14	77,78
-	+	0	0

+ : présence du gène; - : absence du gène.

Il en ressort que :

- Quatorze (14) élevages comportent des animaux porteurs des STEC ayant le gène *Stx1* seul, soit un taux de 77,78%.
- Aucun élevage ne comporte d'animaux porteurs des STEC ayant le gène *stx2* seul.
- Quatre (04) élevages comportent des animaux porteurs des STEC ayant les deux gènes (*stx1* et *stx2*), soit un taux de portage de 22,22%.

2. DISCUSSION :

La recherche de la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2* à partir des 200 échantillons de fèces de vaches laitières adultes a révélé un taux de portage individuel de STEC de 30,5%. Sur les 27 élevages testés de la wilaya de Blida, 18 ont au moins une vache porteuse STEC ayant le gène *stx*, soit une prévalence de 66,67%.

En effet, les ruminants sont un réservoir reconnu de STEC et le portage est le plus fréquemment asymptomatique, ce qui rend très difficile le diagnostic des bovins porteurs. Quoique la présence de STEC chez les bovins ait été rapportée dans le monde entier (Etats-Unis, Canada, Brésil, Australie, Japon, Inde, Ouganda et Europe), les données sont nombreuses et varient selon les études. Les différences observées sont fonction du choix des exploitations, des animaux, des fréquences et des méthodes de prélèvements et de recherche.

En Europe, les travaux de Loukiadis [24] rapportent une prévalence moyenne de 15,6% entre 1986 et 2002 avec un taux de portage de STEC qui varie entre 2,8% et 75%, respectivement au Royaume-Uni et en Norvège [250,251]. Cependant, en France Raynaud et Heuchel [246] rapportent une prévalence de portage de 40% chez les veaux et 32% chez les vaches où 91% des exploitations étudiées ont eu au moins une fois une vache ou un veau porteur de STEC tandis qu'en Allemagne, Andrea et *al.*, [252], rapportent une prévalence de 24,7% de vaches laitières testées positives pour le gène *stx*.

Dans les autres régions du monde, le portage asymptomatique des STEC est de 16,7% chez les vaches en Australie [253] ; de 46%, 66% et 69%, respectivement chez les veaux, les génisses et les vaches au Japon [140] ; de 28,3% chez le zébu en Ouganda [142]; de 72,7% et 82,2%, respectivement chez les vaches et les buffles au Bangladesh [254] et de 14% chez les vaches au Pérou [255] tandis que Moreira et *al.*, [137] ont rapporté que 95% des 60 petites fermes laitières testées au Brésil avaient des animaux porteurs de STEC

Le traitement des résultats a révélé un taux de portage nul dans neuf élevages car ne comportant aucun animal excréteur et un portage intra troupeau variant de 4,17% à 100% dans les dix huit élevages comportant au moins un animal positif. En effet, un taux de portage de 84% avec une proportion d'animaux excréteurs par troupeau variant de 0 à 63% a été rapporté par Blanco et *al.*, [256] et de 0 à 100% par Blanco et *al.*, [257] et Fremaux [23].

Le profil génétique de portage obtenu pour les vaches excrétrices de STEC (positives pour la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2*) a montré qu'aucune vache ne porte des STEC ayant le gène *stx2* seul. Cinquante et une (51) vaches (soit 83,6%) portent des STEC ayant le gène *stx1* seul et dix (10) vaches (soit 16,4%) portent des STEC ayant les gènes *stx1* et *stx2* simultanément. De plus, nous avons constaté que le portage des STEC ayant les deux (2) gènes simultanés est circonscrit à quatre (4) exploitations seulement (soit 22,22%). Nos résultats s'avèrent particuliers par rapport aux travaux de la littérature portant sur le même thème par le faible taux de portage du gène *stx2*. En effet, des proportions variant de 23 à 25% et 60 à 86%, respectivement ont été rapporté pour le portage des STEC ayant les gènes *stx1* et *stx2* et le gène *stx2* seul par Rogerie et *al.*, [258], Raynaud et Heuchel [246] et Fremaux et *al.*, [151]. Cette fréquence plus élevée du gène *stx2* dans les fèces des vaches adultes a été relevée dans différentes études. En effet, le *stx2* est dominant chez les adultes alors que le *stx1* l'est en revanche chez les jeunes [246].

Selon Boerlin et *al.*, [88], 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.*, [259] 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.

La prévalence de l'excrétion fécale exprimée à l'échelle individu (30,5%) ou élevages (66,67%) peut varier pour diverses raisons. Selon Raynaud et Heuchel [246], la prévalence des STEC par exploitation peut être appréciée plus précisément lorsqu'on a recours à deux prélèvements de fèces plutôt qu'un seul. En effet, de nombreux auteurs ont montré qu'un seul prélèvement négatif ne permet pas de conclure que l'animal n'est pas ou ne sera pas excréteur [260,261,262]. L'intermittence ou même le caractère ponctuel de l'excrétion ainsi que l'effet saison ont été mis en évidence par Heuvelink et *al.*, et Van Donkersgoed et *al.*, [182,263]. De plus, l'existence d'animaux dits super-excréteurs (Supershedders) semble être en relation avec les variations de l'excrétion fécale des STEC [264] et contribueraient ainsi à leur dissémination dans l'environnement et à la transmission de souches entre individus d'un même troupeau (80% des cas) [265].

Ce portage constitue une réelle menace car il représente un véritable danger pour le consommateur. En effet, de nombreuses études ont rapporté des épidémies d'infection dues à ces germes dans le monde. *E. coli* O157 a été incriminé dans une épidémie survenue au Swaziland (Afrique) en 1982 [266]. Depuis, ce pathogène a été isolé à partir d'échantillons de patients atteints de diarrhées au Cameroun [267,268], en Côte d'Ivoire [269], au Kenya [270], au Gabon [271], au Nigeria [272], en République Centrafricaine [267], au Congo [267] et en Afrique du Sud [273,274].

Quoique les STEC soient considérées comme des maladies transmises par l'alimentation, plus de 30% des infections sont transmises par contact entre Hommes, avec des animaux ou par l'eau [275,276]. De plus, bien que le principal vecteur de ces germes soit la viande, d'autres aliments ont également été mis en cause [189,277,278]. Au Nord de l'Afrique, la contamination des denrées alimentaires par les STEC a été rapportée en Egypte [279], en Tunisie [280] et au Maroc [281]. En Algérie, la présence des STEC, particulièrement *E. coli* O157:H7 a été mise en évidence sur des carcasses bovines et ovines avec des prévalences de 7,8% et 7,26%, respectivement par Chahed [25] et Ferhat [26] et dans la viande congelée importée avec une prévalence de 0,44% par Barka et Kihel [27].

CONCLUSION

La présente étude a permis la mise en évidence le portage asymptomatique des STEC en élevages laitiers de la wilaya de Blida ; ces derniers sont un réservoir important des STEC potentiellement pathogènes.

L'importance du portage asymptomatique au niveau des matières fécales peut être une réelle source de contamination pour l'Homme (contamination de la viande, du lait et les produits dérivés) et l'environnement (contamination de l'eau, les pâturages). Par conséquent, le risque des infections dues aux STEC existe réellement.

Toutefois, il est à noter que la proportion du gène *stx2*, particulièrement pathogène, soit faible par rapport au gène *stx1* d'une part, et que celle de l'association des gènes *stx1* & *stx2* est non négligeable, d'autre part.

En Algérie, des études complémentaires doivent être menées en santé publique pour mesurer l'impact des STEC sur l'Homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Levine, M.M.** (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* **155**: 377-389.
- [2] **Pohl, P.** (1993) Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de médecine vétérinaire* **137**:325-333.
- [3] **Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E. S., Johnson, L.M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. and Cohen, M. L.** (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* **308**: 681-685.
- [4] **Stevenson, J. and Hanson, S.** (1996) Outbreak of *Escherichia coli* O157 phage type 2 infection associated with eating precooked meats. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **6**: R116-118.
- [5] **Tilden, J., Jr., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J. and Morris, J.G., Jr.** (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health.* **86**: 1142-1145.
- [6] **Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D.H., Hancock, D.D., Balan, V.K., Zhao, T. and Doyle, M.P.** (1997) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *Jama.* **277**: 1229-1231.
- [7] **Martinez, A., Oliva, J.M., Panella, E., Hernandez-Pezzi, G. and Soler, P.** (2001) Outbreak of *E.coli* O157:H7infection in Spain. *Eurosurveillance Weekly.* **5**: 1.
- [8] **Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M., et Vaillant, V.** (2002) Les toxi infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire **23/2002**: 105-109.
- [9] **Vernozy-Rozand, C. et Montet, M.P.** (2001) *Escherichia coli* O157:H7. Editions *TEC&DOC Lavoisier.* 135p.
- [10] **Rabatsky-Ehr, T., Dingman, D., Marcus, R., Howard, R., Kinney, A. and Mshar, P.** (2002) Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut. *Emerg Infect Dis.* **8**: 525-527.
- [11] **Werber, D., Behnke, S.C., Fruth, A., Merle, R., Menzler, S., Glaser, S., Kreienbrock L, Prager R, Tschäpe H, Roggentin P, Bockemühl J, Ammon A** (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany: different risk factors for different age groups. *Am. J. Epidemiol.* **165**: 425-434.
- [12] **Montet, M. P.** (2009) Contamination des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France, et importance de l'acido-résistance des souches. *Th. École Pratique des Hautes Études.* p. 7-10.

- [13] **Besser, R.E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G., and Griffin, P.M.** (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA*. **269**: 2217-2220.
- [14] **Tamblyn, S., deGrosbois, J., Taylor, D., and Stratton, J.** (1999) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with unpasteurized non-commercial, custom-pressed apple cider--Ontario, 1998. *Can Commun Dis Rep*. **25**: 113-117.
- [15] **Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. and Calderon, R.L.** (2000) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill Summ*. **49**: 1-21.
- [16] **Wachtel, M.R., Whitehand, L.C. and Mandrell, R.E.** (2002) Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J Food Prot*. **65**: 18-25.
- [17] **Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A. and Beach, M.J.** (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ*. **53**: 23-45.
- [18] **Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. and Swerdlow, D.L.** (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis*. **11**: 603-609.
- [19] **Gough, J.M., Conlan, L.L., Denman, S.E., Krause, D.O., Smith, W.J., Williamson, M.A. and McSweeney, C.S.** (2006) Screening of bacteria from the cattle gastrointestinal tract for inhibitory activity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, O111:H-, and O26:H11. *J Food Prot*. **69**: 2843-2850.
- [20] **Food Safety Network** (2006) Outbreaks of foodborne illness linked to fresh lettuce and spinach since 1993--Update Dec 13. *Food Safety Network 2007*.
- [21] **Bouvier, M.** (2011) Mise au point de méthodes de détection des souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC). *École Pratique des Hautes Études*. 3-16.
- [22] **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.
- [23] **Fremaux, B.** (2007) Écologie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les effluents d'élevages bovins et le sol. In.: *Université Claude Bernard Lyon1*, pp. 320.
- [24] **Loukiadis, E.** (2007) Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC). *Université Toulouse III – Paul Sabatier (U.F.R S.V.T)*. 21- 118.
- [25] **Chahed, A.** (2006) Prévalence et caractérisation de souches d'*Escherichia coli* O157 productrices de Shigatoxines isolées de denrées alimentaires d'origine animale en Belgique et en Algérie. *Th. Université de Liege*. 37- 58

- [26] **Ferhat, L.** (2008) Recherche et caractérisation des souches d'*Escherichia coli* O157 isolées à partir des carcasses ovines provenant de deux abattoirs de la wilaya d'Alger. *Th. Ecole nationale vétérinaire d'El Harrach-Alger*. p 15-101.
- [27] **Barka, M. S. and Kihel, M.** (2010) Prevalence of *Escherichia coli* Enterohemorrhagic O157:H7 in Frozen Bovine Meat in Algeria. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. **5** (2): 183-187.
- [28] **Le Minor, L., Popoff, M.Y. and Bockemuhl, J.** (1990) Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. **141**: 1173-1177.
- [29] **Grimont, P.** (1987) Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect (Numéro spécial)*: 6-10.
- [30] **Garrity, G. M., Winters, M., Kuo, A. W. and Searles, D.B.** (2002) *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*. Bergey's manual of systematic bacteriology, Springer-Verlag NY.
- [31] **Mbengue, M., Tine, E., Assih, E., Casalot, L., Drancourt, M., Labat, M. and Samb, A.** *Escherichia senegalensis* sp. nov., an aromatic-degrading facultative-anaerobic bacterium isolated from tropical millet brans. *Unpublished*.
- [32] **Casalot L., Mbengue M., Cayol J.L.** Submitted (13-JAN-2003) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Université de Provence et de la Méditerranée, Laboratoire de Microbiologie IRD, Case 925, 163 Avenue de Luminy, Marseille, Cedex 09 13288, France.
- [33] **Escherich, T.** (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr Med*. **3**:515,522, 547-554.
- [34] **Greatorex, J.S. and Thorne, G.M.** (1994) Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *Journal of Clinical Microbiology*. **32**: 1172-1178.
- [35] **Pourcher, A. M.** (1991) Contribution à l'étude de l'origine (humaine ou animale) de la contamination fécale des eaux de surface. In. Lille: Université des sciences et techniques de Lille Flandres Artois, pp. 176.
- [36] **Ghebru, H.** (1988) Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. *Mémoire de maîtrise et Sciences Vétérinaires en Microbiologie Immunologie, Nantes*.
- [37] **Pohl, P., Lintermans, B., Mainil, J. and Deprez, P.** (1989) Production de vérocytotoxine par les *Escherichia coli* du porc. *Annales de Médecine Vétérinaire*. **133**: 31-38.
- [38] **Bérardin, M.** (2005) Caractérisation de souches de *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) isolés de fromages au lait cru français et génotypage des variants *stx* d'une collection de *Escherichia coli* O157:H7. *Th. Ecole pratique des hautes études*. P 6-7.
- [39] **Nataro, J.P. and Kaper, J.B.** (1998) Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. **11**: 142-201.
- [40] **Cassels, F. J., Wolf, M. K.** (1995) Colonization factors of diarrheogenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol* **15**:214-226.

- [41] **Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. and 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.
- [42] **Andrade, J.R., Da Veiga, V.F., De Santa Rosa, M.R. and Suassuna, I.** (1989) An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **28**: 49-57.
- [43] **Kaper, J. B.** (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *Inter. J. Med. Microbiol.* **295**: 355-356.
- [44] **Benz, I., Schmidt, M.A.** (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol. Microbiol.* **6**: 1539-1546.
- [45] **Cookson, S.T., Nataro, J.P.** (1996) Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb Pathol.* **21**: 421-434.
- [46] **Konowalchuk, J., Speirs, J. I. and Stavric, S.** (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **18**:775-779.
- [47] **Levine, M.M. and Edelman, R.** (1984) Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews.* **6**: 31-51.
- [48] **Karch, H., Russmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A. and Heesemann, J.** (1995) Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol.* **33**: 1602-1605.
- [49] **Schmidt, H., Beutin, L. and Karch, H.** (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055-1061.
- [50] **AFSSA.** (2003) Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC). 27-120.
- [51] **Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. and Lim, C.** (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **1**: 619-620.
- [52] **Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D.** (1988) Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol.* **170**: 1116- 1122.
- [53] **Vimont, A.** (2007) Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). 34-116.
- [54] **Neaves, P., Deacon, J and Bell, C.** (1994) A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK Dairy Industry. *Int Dairy J.* **4**:679-696.
- [55] **Tesh, V. L., Samuel, J.E., Perera, L.P., Sharefkin, J. B and O'Brien, A. D.** (1991) Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **164**:344-352.

- [56] **Killian, M., Bullow, P.** (1976) Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I. Detection of bacterial glycosidases. *Actua. Pathol. Microbiol. Scand. Sect.*, **B 84**: 245-251.
- [57] **Orskov, F., Orskov, I.** (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.*, **38**: 699-704.
- [58] **Kauffmann, F.** (1947) Review, The serology of the *coli*. group. *J. Immunol.* **57**: 71-100.
- [59] **Gyles, C. L.** (1994) *Escherichia coli* in domestic animals and humans. *Cab international* 649 pages.
- [60] **Doyle, M. P. and Schoeni, J. L.** (1987) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* **53**(10): 2394-6.
- [61] **Muniesa, M. and Jofre, J.** (1998) Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl Environ Microbiol* **64**(7): 2443-8.
- [62] **Mora, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M.P., Dhabi, G., Echeita, A., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J.** (2005) Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res. Microbiol.*
- [63] **Maurer, C. I.** (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. *Th. Université Claude Bernard – Lyon I.* p 21-22.
- [64] **Hussein, H. S.** (2006) Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J. Anim. Sci.*
- [65] **Johnson, K.E., Thorpe, C. M. and Sears, C. L.** (2006) The Emerging Clinical Importance of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* **43**: 1587-1595.
- [66] **Whittam, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I.K., Orskov, F., Orskov, I., and Wilson, R.A.** (1993) Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect. Immun.* **61**: 1619-1629.
- [67] **Mainil, J.** (2003) Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives de *Escherichia coli* : les adhésines et facteurs de colonisations, *Ann, Méd, Vét.* **147** : 105-126
- [68] **Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S., and 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.
- [69] **Sperandio, V., Kaper, J.B., Bortolini, M.R., Neves, B.C., Keller, R., and 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.

- [70] **O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R. and Formal, S.B.** (1982) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* **146**: 763-769.
- [71] **Mainil, J.** (1999) Shiga/Verocytotoxins and Shiga verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.* **30**: 235-257.
- [72] **Paton, J. C., Paton, A.W.** (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 450-479.
- [73] **Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., and Igarashi, K.** (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* **171**: 45-50.
- [74] **Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. and Karmali, M.** (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* **262**: 8834-8839.
- [75] **Lea, N., Lord, J.M. and 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 (Pt 5)**: 999-1004.
- [76] **Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T. and Acheson, D.W.** (1999) Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* **67**: 6670-6677.
- [77] **Thorpe, C.M., Smith, W.E., Hurley, B.P. and Acheson, D.W.** (2001) Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun.* **69**: 6140-6147.
- [78] **Yamasaki, C., Natori, Y., Zeng, X.T., Ohmura, M., Yamasaki, S., and Takeda, Y.** (1999) Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. *FEBS Lett.* **442**: 231-234.
- [79] **Pradel, N.** (2001) *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines: étude épidémiologique, recherché des caractéristiques des souches pathogènes par comparaison moléculaire et hybridation soustractive. *Th: Université d'Auvergne*: 187p.
- [80] **Calderwood, S.B., Akeson, D.W.K., Keusch, G.T., Barrett, T.J. and Griffin, P.M.** (1996) Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* **62**: 118-119.
- [81] **Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H. A, and Whittam, T.S.** (1997) Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxin in separate populations of cattle and sheep. *Applied and Environmental Microbiology.* **63**: 2175-2180.
- [82] **Smith H.W., Green P. and Parsell Z.** (1983) Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J Gen Microbiol* **129**: 3121-3137.
- [83] **Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K. and 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.

[84] **Ackermann, H.W., and Dubow, M.S.** (1987) Viruses of Prokariotes. In Vol II-Natural groups of bacteriophages. Boca Raton: *CPC Press*, pp. 96.

[85] **Louise, C.B. and Obrig, T.G.** (1995) Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7 derived Shigalike toxin II with human renal endothelial cells. *Journal of Infectious diseases.* **172**: 1397-1401.

[86] **Lindgren, S.W., Melton, A.R. and 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.

[87] **Wadolowski, E.A., Sung, L.M., Burris, J.A., Samuel, J.E. and O'Brien, A.D.** (1990) Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shigalike toxin type II. *Infect Immun.* **58**: 3959-3965.

[88] **Boerlin, P.** (1999) Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Life. Sci.* **56**: 735-741.

[89] **Beutin, L., Steinruck, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G. and Appel, B.** (2007) Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shigatoxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 630-639.

[90] **Karmali, M.A.** (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* **2**: 15-38.

[91] **Paton, A.W., Beutin, L. and Paton, J.C.** (1995) Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. *Gene* **153**: 71-74.

[92] **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.

[93] **Koch, C., Hertwig, S., Lurz, R., Appel, B., Beutin, L.** (2001) Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the stx1OX3 gene which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3992-3998.

[94] **Burk, C., Dietrich, R., Açar, G., Moravek, M., Bülte, M. and Märtlbauer, E.** (2003) Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT: H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* **41**: 2106-2012.

[95] **Ostroff, S.M., Kobayashi, J.M., Lewis, J.H.** (1989) Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. *JAMA*, **262**, 355-359.

[96] **Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V. and Martin, C.** (2001) Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* **39**: 3060-3065.

- [97] **Brett, K.N., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J. and Djordjevic, S.P.** (2003) Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb subtypes. *J Clin Microbiol.* **41**: 2716-2722.
- [98] **Leung, P.H., Peiris, J.S., Ng, W.W., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A. and Yam, W.C.** (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 7549-7553.
- [99] **Weinstein, D.L., Jackson, M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K. and O'Brien, A.D.** (1988) Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* **170**: 4223-4230.
- [100] **Gannon, V.P., Teerling, C., Masri, S.A. and 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.
- [101] **DeGrandis, S., Law, H., Brunton, J., Gyles, C., and Lingwood, C.A.** (1989) Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J. Biol. Chem.* **264**: 12520-12525.
- [102] **Cornick, N.A., Booher, S.L., Casey, T.A., and Moon, H.W.** (2000) Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 4926-4934.
- [103] **Ramachandran, V., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M. J., Djordjevic, S. P.** (2001) The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1932-1937.
- [104] **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.
- [105] **Ito, H., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y. and Nishibuchi, M.** (1990) Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog.* **8**: 47-60.
- [106] **Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H. and Karch, H.** (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1205-1208.
- [107] **Morabito, S., Dell'omo, G., Agrimi, U., Schmidt, H., Karch, H., Cheasty, T., Caprioli, A.** (2001) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet. Microbiol.* **82**: 275-283.
- [108] **Paton, A. W., Voss, E., Manning, P.A. and Paton, J.C.** (1997) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Infect Immun.* **65**:3799-3805.
- [109] **Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B.** (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **60**: 3953-3961.
- [110] **Wales, A.D., Pearson, G. R., Skuse, A. M., Roe, J. M., Hayes, C. M., Cookson, A. L. and Woodward, M. J.** (2001) Attaching and Effacing Lesions Caused by

Escherichia coli O157:H7 in Experimentally Inoculated Neonatal Lambs. *J Med Microbiol.* **50**: pp 752-8.

[111] **Jerse, A. E., and Kaper, J.B.** (1991) The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun.* **59**:4302-4309.

[112] **Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. and Finlay, B.B.** (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell.* **91**: 511-520.

[113] **Schmidt, H., Rüssman, H., Schwarzkopf, A., Aleksic, S., Heesemann, J. and Karch H.** (1994) Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Zentralbl Bakteriolog.* **281**: 201-213.

[114] **Tarr, P.I., Bilge, S.S., Vary, J. C., Jr., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., Baylor, M.R. and Besser, T.E.** (2000) *Iha*: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun.* **68**: 1400-1407.

[115] **Sherman, P., Cockerill, F., 3rd, Soni, R. and Brunton, J.** (1991) Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to epithelial cells. *Infect Immun.* **59**: 890-899.

[116] **Zhao, S., Meng, J., Doyle, M.P., Meinersman, R., Wang, G., and Zhao, P.** (1996) A low molecular weight outer-membrane protein of *Escherichia coli* O157:H7 associated with adherence to INT407 cells and chicken caeca. *J Med Microbiol* **45**: 90-96.

[117] **Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., and Paton, J.C.** (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* **69**: 6999-7009.

[118] **Nicholls, L., Grant, T. H., Robins-Brown, R. M.** (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, **35**, 275-88.

[119] **Torres, A.G., Giron, J.A., Perna, N.T., Burland, V., Blattner, F.R., Avelino-Flores, F. and Kaper, J.B.** (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* **70**: 5416-5427.

[120] **Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L.** (2002) Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **70**: 6761-6769.

[121] **Carney, E., O'brien, S.B., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., Duffy, G.** (2006) Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiol.* **23**: 52-9.

[122] **Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Orskov, I. and Orskov, F.** (1988) Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg [A]* **267**: 576-588.

- [123] Soloaga, A., Veiga, M.P., Garcia-Segura, L.M., Ostolaza, H., Brasseur, R. and Goni, F.M. (1999) Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol.* **31**: 1013-1024.
- [124] Pradel, N., Bertin, Y., Martin, C. Livrelli, V. (2008) Molecular analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl Environ Microbiol.* **74**(7): 2118-28.
- [125] Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol.* **24**: 767-778.
- [126] Dziva, F., Mahajan, A., Cameron, P., Currie, C., McKendrick, I.J., Wallis, T.S., Smith, D.G., Stevens, M.P. (2007) EspP, a Type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* **271**(2):258-64.
- [127] Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H. (1996) KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology.* **142** (Pt 11): 3305- 3315.
- [128] Bonardi, S., Maggi, E., Pizzin, G., Morabito, S. and Caprioli, A. (2001) Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol.* **66**: 47-53.
- [129] Iyoda, S., Tamura, K., Itoh, K., Izumiya, H., Ueno, N., Nagata, K., Togo, M., Terajima, J. and Watanabe, H. (2000) Inducible stx2 phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86: HNM isolated from patients. *FEMS Microbiol Lett.* **191**: 7-10.
- [130] Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M. and Fasano, A. (1996) Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enterotoxigenic *E. coli*. *J Infect Dis.* **173**: 1019-1022.
- [131] Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., Oswald, E. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* **36**: 289-311.
- [132] Whipp, S.C., Rasmussen, M.A., Cray, W.C.J.R. (1994) Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **204**: 1168-1175.
- [133] Hussein, H. S., Bollinger, L. M. (2005) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J. Food Prot.* **68**: 2224-2241.
- [134] 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.

- [135] **Thran, B. H., Hussein, H.S., Hall, M.R. and Khaiboullina, S.F.** (2001) Shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J Food Prot.* **64**:1613-1616.
- [136] **Cerqueira, A. M., Guth, B.E., Joaquim, R.M. and Andrade, J.R.** (1999) High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol.* **70**:111-121.
- [137] **Moreira, C.N., Pereira, M.A., Brod, C.S., Rodrigues, D.P., Carvalhal, J.B., Aleixo, J.A.** (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol.* **93**: 179-183.
- [138] **Cobbold, R. and Desmarchelier, P.** (2001) Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. *Vet Microbiol.* **79**: 323-335.
- [139] **Hornitzky, M.A., Vanselow, B.A., Walker, K., Bettelheim, K.A., Corney, B., Gill, P., Bailey, G. et Djordjevic, S.P.** (2002) Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 6439-6445.
- [140] **Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. and Yamamoto, K.** (2001) Prevalence and characteristics of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 484-489.
- [141] **Pal, A., Ghosh, S., Ramamurthy, T., Yamasaki, S., Tsukamoto, T., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B. and Takeda, Y.** (1999) Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. *Indian J Med Res.* **110**: 83-85.
- [142] **Kaddu-Mulindw, D., Aisu, T., Gleier, K., Zimmermann, S. and Beutin, L.** (2001) Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int. J. Food Microbiol.* **66**:95-101.
- [143] **Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F.** (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2483-2488.
- [144] **Zschock, M., Hamann, H.P., Kloppert, B. and Wolter, W.** (2000) Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol.* **31**: 203-208.
- [145] **Chapman, P. A., Siddons, C.A., Wright, D.J., Norman, P., Fox, J. and Crick, E.** (1992) Cattle as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet Rec.* **131**: 323-324.
- [146] **Clarke, R.C., Wilson, J.B., Read, S.C., Renwick, S., Rahn, K., Johnson, R.P., Alves, D., Karmali, M.A., Lior, H., McEwen, S.A., Spika, J., and Gyles, C.S.** (1994) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain: preharvest and processing perspectives. In Recent Advances in VTEC Infections. Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Bergamo, Italy. *Elsiever Science.* pp 17-24.

- [147] **Rahn, K., Renwick, S.A., Johnson, R.P., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Alves, D., McEwen, S., Lior, H., Spika, J.** (1997) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol Infect.* **119**(2): 251-9.
- [148] **Chapman, P. A., Siddons, C.A., Gerdan Malo, A.T. and Harkin, M.A.** (1997) A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect.* **119**(2): 245-50.
- [149] **Pearce, M.C., Jenkins, C., Vali, L., Smith, A.W., Knight, H.I., Cheasty, T., Smith, H.R., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E., Amyes, S.G., Frankel, G.** (2004) Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 1708-1716.
- [150] **Pradel, N., De Champs, C., Palcoux, J.B., Sirot, J., Forestier, C., Joly, B., Scheutz, F. and Livrelli, V.** (2000) Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region. *Arch Pediatr.* **7 Suppl 3**: 544s-550s.
- [151] **Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L., and Vernozzy-Rozand, C.** (2006) Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet. Microbiol.* **117**:180-191.
- [152] **Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Gonzalez, E. A., Mora, A., Prado, C., Fernandez, L., Rio, M., Ramos, J. and Alonso, M. P.** (1996) Prevalence and Characteristics of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Verotoxin- Producing *E. coli* in Healthy Cattle. *Epidemiol Infect.* **117**: pp 251-7.
- [153] **Rugbjerg, H., Nielsen, E.M. and Andersen, J.S.** (2003) Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known infected Danish dairy herds. *Prev Vet Med.* **58**: 101-113.
- [154] **Meyer-Broseta, S., Bastian, S.N., Arne, P.D., Cerf, O. and Sanaa, M.** (2001) Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health.* **203**:347-361.
- [155] **Zhao, T., Doyle, M.P., Shere, J., Garber, L.** (1995) Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1290-1293.
- [156] **Mainil, J. G., Daube, G.** (2005) Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1332-1344.
- [157] **Randall, L. P., Wray, C., McLaren, I. M.** (1997) Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces. *Vet. Rec.* **140**:112-115.
- [158] **Djordjevic, S. P., Hornitzky, M. A., Bailey, G., Gill, P., Vanselow, B., Walker, K., Bettelheim, K. A.** (2001) Virulence properties and serotypes of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *J. Clin Microbiol.* **39**: 2017-2021.
- [159] **Bouvet, J., Montet, M.P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V. and Vernozzy-Rozand, C.** (2002) Effects of slaughter processes

on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* **77**:99-108.

[160] **Pilipcinec, E., Tkacikova, L., Naas, H.T., Cabadaj, R. and Mikula, I.** (1999) Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol (Praha).* **44**: 455-456.

[161] **Beery, J.T., Doyle, M.P. and Schoeni, J.L.** (1985) Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol.* **49**: 310-315.

[162] **Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M.P.** (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 2567-2570.

[163] **Wang, G. and Doyle, M.P.** (1998) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot.* **61**: 662-667.

[164] **Fenlon, D. R., Ogden, I.D., Vinten, A. and I. Svoboda, I.** (2000) The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 149S-156S.

[165] **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.

[166] **Breuer, T., Benkel, D.H., Shapiro, R.L., Hall, W.N., Winnett, M.M., Linn, M.J., Neimann, J., Barrett, T.J., Dietrich, S., Downes, F.P., Toney, D.M., Pearson, J.L., Rolka, H., Slutsker, L., and Griffin, P.M.** (2001) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis.* **7**: 977-982.

[167] **Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K., and Slutsker, L.** (1999) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med.* **159**: 1758-1764.

[168] **Infectious Agents Surveillance Center** (1996) Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection, 1996, Japan. *Infect Agents Surveill Rep.* **17**: 180-181.

[169] **Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., and Yanagawa, H.** (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol.* **150**: 787-796.

[170] **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* O 157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect.* **101**: 83-91.

[171] **Suthienkul, O., Brown, J.E., Seriwatana, J., Tienthongdee, S., Sastravaha, S. and Echeverria, P.** (1990) Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. *Appl Environ Microbiol.* **56**: 1135-1139.

- [172] **Read, S.C., Gyles, C.L., Clarke, R.C., Lior, H., and McEwen, S.** (1990) Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol Infect.* **105**: 11-20.
- [173] **Sekla, L., Milley, D., Stackiw, W., Sisler, J., Drew, J. and Sargent, D.** (1990) Verotoxin-producing *Escherichia coli* in ground beef--Manitoba. *Can Dis Wkly Rep.* **16**:103-105.
- [174] **Willshaw, G. A., Smith, H.R., Roberts, D., Thirlwell, J., Cheasty, T. and Rowe, B.** (1993) Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. *J Appl Bacteriol.* **75**:420-426.
- [175] **Padhye, N. V. and Doyle, M.P.** (1991) Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 2693-2698.
- [176] **Samadpour, M., Ongerth, J.E., Liston, J., Tran, N., Nguyen, D., Whittam, T.S., Wilson, R.A. and Tarr, P.I.** (1994) Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol.* **60**:1038-1040.
- [177] **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.
- [178] **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. In 102th General Meeting of American Society for Microbiology May, 19-20 Salt-Lake City, USA.
- [179] **Heuvelink, A. E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Beumer, R.R. and De Boer, E.** (1999) Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J. Food. Prot.* **62**:1115-1122.
- [180] **Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J.** (2001) Comparison between a PCR-ELISA test and the Vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 809-818.
- [181] **Klie, H., Timm, M., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K.W. and H. Steinruck.** (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.
- [182] **Heuvelink, A., Bleumink, B., Biggelaar, F.V.D., Giffel, M.T., Beumer, R. and De Boer, E.** (1998) Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. *J Food Prot.* **61**:1597-1601.
- [183] **Mechie, S. C., Chapman, P.A. and Siddons, C.A.** (1997) A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiol Infect.* **118**:17-25.
- [184] **Coia, J.E., Johnston, Y., Steers, N.J., Hanson, M.F.** (2001) A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int. J. Food Microbiol.* **66**: 63-9.

- [185] **Massa, S., Goffredo, E., Altieri, C. and Natola, K.** (1999) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 degrees C. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:89-92.
- [186] **Murinda, S. E., Nguyen, L.T., Ivey, S.J., Gillespie, B.E., Almeida, R.A., Draughon, F.A. and Oliver, S.P.** (2002) Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12- month survey of dairy farms in east Tennessee. *J. Food. Prot.* **65**:752-759.
- [187] **Jay, M.T., Cooley, M., Carychao, D., Wiscomb, G.W., Sweitzer, R.A., Crawford-Miksza, L., Farrar, J.A., Lau, D.K., O'Connell, J., Millington, A., Asmundson, R.V., Atwill, E.R. and Mandrell, R.E.** (2007) *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 1908-1911.
- [188] **Cody, S. H., Glynn, M. K., Farrar, J. A., Cairns, K. L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A. S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G. and Vugia, D.J.** (1999) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann. Intern. Med.* **130**:202-209.
- [189] **Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., Alonso, M.P., Llovo, J., Bernárdez, M.I., Blanco, E.J., Blanco, M., Blanco, J.** (2011) Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int. Microbiol.***14**:121-141.
- [190] **Griffin, P. M.** (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Infectious of the Gastrointestinal Tract/ Ed. par Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press, p. 739-758.
- [191] **Stephan, R. and Untermann, F.** (1999) Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol.* **37**:1570-1572.
- [192] **Allaby, M.A. and Mayon-White, R.** (1995) *Escherichia coli* O 157: outbreak in a day nursery. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **5**: R4-6.
- [193] **Ludwig, K., Ruder, H., Bitzan, M., Zimmermann, S., and Karch, H.** (1997) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in a large family. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **16**: 238-241.
- [194] **Boudailliez, B., Berquin, P., Mariani-Kurkdjian, P., Ilef, D., Cuvelier, B., Capek, I., Tribout, B., Bingen, E. and Piussan, C.** (1997) Possible person-to-person transmission of *Escherichia coli* O111 associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* **11**: 36-39.
- [195] **Swerdlow, D.L. and Griffin, P.M.** (1997) Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet.* **349**: 745-746.
- [196] **Al-Jader, L., Salmon, R.L., Walker, A.M., Williams, H.M., Willshaw, G.A. and Cheasty, T.** (1999) Outbreak of *Escherichia coli* O157 in a nursery: lessons for prevention. *Arch Dis Child.* **81**: 60-63.
- [197] **Vaillant, V., et 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.

[198] **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.

[199] **Holme, R.** (2003) Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol.* **47**: 1-6.

[200] **Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T.** (2005) Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005. *Euro Surveill.* **10**: E051222-051223.

[201] **Brewster, D.H., Brown, M.I., Robertson, D., Houghton, G.L., Bimson, J. and Sharp, J.C.** (1994) An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect.* **112**: 441-447.

[202] **Hildebrand, J.M., Maguire, H.C., Holliman, R.E. and Kangesu, E.** (1996) An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun Dis Rep CDR Rev.* **6**: R33-36.

[203] **Cransberg, K., van den Kerkhof, J.H., Banffer, J.R., Stijnen, C., Wernars, K., van de Kar, N.C., Nauta, J. and Wolff, E.D.** (1996) Four cases of hemolytic uremic syndrome--source contaminated swimming water? *Clin Nephrol.* **46**: 45-49.

[204] **Ackman, D., Marks, S., Mack, P., Caldwell, M., Root, T. and Birkhead, G.** (1997) Swimming associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect.* **119**: 1-8.

[205] **Paunio, M., Pebody, R., Keskimaki, M., Kokki, M., Ruutu, P., Oinonen, S., Vuotari, V., Siitonen, A., Lahti, E. and Leinikki, P.** (1999) Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect.* **122**: 1-5.

[206] **Friedman, M.S., Roels, T., Koehler, J.E., Feldman, L., Bibb, W.F. and Blake, P.** (1999) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin Infect Dis.* **29**: 298-303.

[207] **Wang, G., and Doyle, M.P.** (1998) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot.* **61**: 662-667.

[208] **Trevena, W.B., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Domingue, G. and Wray, C.** (1999) Transmission of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection from farm animals to humans in Cornwall and west Devon. *Commun Dis Public Health.* **2**: 263-268.

[209] **Milne, L.M., Plom, A., Strudley, I., Pritchard, G.C., Crooks, R., Hall, M., Duckworth, G., Seng, C., Susman, M.D., Kearney, J., Wiggins, R.J., Moulds, M., Cheasty, T. and Willshaw, G.A.** (1999) *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health.* **2**: 22-26.

[210] **Beutin, L., Bulte, M., Weber, A., Zimmermann, S., and Gleier, K.** (2000) Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*

(VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiol Infect.* **125**: 47-54.

[211] **O'Brien, S.J., Adak, G.K. and Gilham, C.** (2001) Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg Infect Dis.* **7**: 1049-1051.

[212] **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.

[213] **Heuvelink, A.E., Van Heerwaarden, C., Zwartkruis-Nahuis, J.T., Van Oosterom, Edink, K., Van Duynhoven, Y.T., De Boer, E.** (2002) *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect.* **129**: 295-302.

[214] **Ihekweazu, C., Carroll, K., Adak, B., Smith, G., Pritchard, G. C., Gillespie, I. A., Verlander, N. Q., Harvey-Vince, L., Reacher, M., Edeghere, O., Sultan, B., Cooper, R., Morgan, G., Kinross, P. T. N., Boxall, N. S., Iversen, A. and Bickler, G.** (2012) Large outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in visitors to a petting farm in South East England, 2009. *Epidemiol Infect.* **140(8)**: 1400–1413.

[215] **Evans, J., Chalmers, R.M., Chart, H., Salmon, R.L., Kench, S.M., Coleman, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P., Sillis, M., Thomas, D.R.** (2000) Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. *Eur J Epidemiol.* **16**: 885-889.

[216] **Chalmers, R. M., Salmon, R.L., Evans, J., Chart, H., Kench, S. M., Colemean, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P. and Sillis, M.** (1999) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC): risk factors in the farming environment. Second International Symposium of the European study Group on EHEC (Brussels). *Acta Clinica Belgica.* **54**: 37.

[217] **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.

[218] **Acton, D.F. and Gregorich, L.J.** (1995) The Health of our Soils: Toward sustainable agriculture in Canada. *Agriculture and Agri-Food Canada.*

[219] **Nathanson, S.** (2007) Savoir penser à un syndrome hémolytique et urémique (SHU) Diagnosis of Hemolytic uremic syndrome. *Archives de pédiatrie.* **14** : 501–503.

[220] **Niaudet, P.** (2008) Syndrome hémolytique et urémique chez l'enfant. *Néphrologie et Thérapeutique.* **4**: 34-40

[221] **Siegler R.** (1994) Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr.* **125**:511-8.

[222] **Hofmann, S. L.** (1993) Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci.* **306**: 398-406.

- [223] **Vimont, A., Vernozy-Rozand. and Delignette-Muller.** (2006) Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Letters in Applied Microbiol.* **42**:102-108.
- [224] **Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B. and Majid, F.** (1993) Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect.* **111**:181-187.
- [225] **Moxley, R. A. and Francis, D.H.** (1986) Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun.* **53**:339-346.
- [226] **Wilson, J. B., McEwen, S. A., Clarke, R. C., Leslie, K. E., Wilson, R.A., Waltner-Toews, D. and Gyles, C.L.** (1992) Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. *Epidemiol Infect.* **108**:423-439.
- [227] **Gunzer, F., Bohm, H., Russmann, H., Bitzan, M., Aleksic, S. and Karch, H.** (1992) Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* **30**:1807-1810.
- [228] **Karch, H., Bielaszewska, M.** (2001) Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: H- Strains: Epidemiology, Phenotypic and Molecular Characteristics, and Microbiological Diagnosis, *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2043-2049.
- [229] **Ammon, A., Petersen, L.R. and Karch, H.** (1999) A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157. *Journal of Infectious Diseases.* **179**: 1274-1277.
- [230] **Beutin, L., Zimmermann, S. and Gleier, K.** (1996) Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2812 - 2814.
- [231] **Richardson, S. E., Karmali, M. A., Becker, L. E. and Smith, C. R.** (1988) The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol.* **19**: 1102-1108.
- [232] **Rowe, P. C., Orrbine, E., Ogborn, M., Wells, G.A., Winther, W., Lior, H., Manuel, D. and McLaine, P.N.** (1994) Epidemic *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and hemolytic-uremic syndrome in a Canadian inuit community: intestinal illness in family members as a risk factor. *J Pediatr.* **124**:21-26.
- [233] **Scotland, S. M., Rowe, B., Smith, H.R., Willshaw, G.A. and Gross, R.J.** (1988) Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J Med Microbiol.* **25**:237-243.
- [234] **Beutin, L., Montenegro, M.A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J. Zimmermann, S. and Stephan, R.** (1989) Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with entérohémolysine production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2559-64
- [235] **Keene, W. E., McAnulty, J.M., Williams, L.P., Hedberg, K. and D. W. Fleming, D. W.** (1993) A two-restaurant outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis associated

with the consumption of mayonnaise. In The Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **33**:354.

[236] **Mainil, J., Jacquemin, E.R., Kaeckenbeek, A.E., Pohl, P.H.** (1993) Association between the effacing (eae) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am. J. Vet. Res.* **54**: 1064-1068.

[237] **Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science.* **239**: 487-91.

[238] **China, B., Ghafir, Y., Daube, G.** (2002) Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.* **147** : 99-109.

[239] **Bouvet, J., et Vernozzy-Rozand, C.** (2000) Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxiques (STEC) et d'*E. coli* O157:H7 dans les aliments. *Rev Med Vet.* **151**:907-914.

[240] Livre Principes de biologie moléculaire en biologie clinique (2006) *Elsevier SAS.* Tous droits réservés. **10**: 232-233.

[241] **Lin, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S. and Takeda, Y.** (1993) Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* **37**: 543-548.

[242] **Karch, H. and Meyer, T.** (1989) Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-liketoxin-producing *Escherichia coli*, *Journal of Clinical Microbiology.* **27 (6)**: P. 1180-1186.

[243] **Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S., Hii, J., McEwen, S., and Gyles, C.L.** (1992) Polymerase chain reaction for detection of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food source. *Mol Cell Probes.* **6**: 153-161.

[244] **Chen, J., Johnson, R. and Griffiths, M.** (1998) Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**: 147-152.

[245] **Gilgen, M., Hubner, P., Hofelein, C., Luthy, J., and Candrian, U.** (1998) PCR-based detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beef. *Res Microbiol* **149**: 145-154.

[246] **Raynaud, S., et Heuchel, V.** (2005) Surveillance et maîtrise de la prévalence du portage des *Escherichia coli* productrice de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins-Recherche des moyens de prévention de la contamination du lait cru à la production. Département Technique d'Élevage et Qualité Service Lait. 5-18.

[247] **Yamasaki, S., Lin, Z., Shirai, H., Terai, A., Oku, Y., Ito, H., Ohmura, M., Karasawa, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H. and Takeda, Y.** (1996) Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligonucléotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* **40**:345-352.

- [248] **China, B., Pirson, V., Mainil, J.**, (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3462-3465.
- [249] **Carneiro, L.A.M., Lins, M.C., Garcia, F.R.A., Silva, A.P.S., Mauller, P.M., Alves, G.B., Rosa, A.C.P., Andrade, J.R.C., Freitas-Almeida, A.C., Queiroz, M.L.P.** (2006) Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology.* **108**: 15-21.
- [250] **Wray, C., McLaren, I. M. and Carroll, P. J.** (1993) *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *Vet Rec.* **133**:439-442.
- [251] **Urdahl, A. M., Beutin, L., Skjerve, E., Zimmermann, S. and Wasteson, Y.** (2003) Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. *J Appl Microbiol.* **95**:92-101.
- [252] **Menrath, A., Wieler, L.H., Heidemanns, K., Semmler, T., Fruth, A., Kemper, N.** (2010) Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors. *Menrath et al. Gut Pathogens.* **2**:7.
- [253] **Cobbold, R. and Desmarchelier, P.** (2000) A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Veterinary Microbiology.* **71**: 125-137.
- [254] **Islam, M.A., Mondol, A.S., De Boer, E., Beumer, R.R., Zwietering, M.H., Talukder, K.A. and Heuvelink, A.E.** (2008) Prevalence and Genetic Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Slaughtered Animals in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology.* **74**(17): 5414–5421.
- [255] **Rivera, F. P., Sotelo, E., Morales, I, Menacho, F., Medina, A. M., Evaristo, R., Valencia, R., Carbajal, L., Ruiz, J., Ochoa, T. J.** (2012) Short communication: Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle and pigs in Lima, Peru. *Journal of dairy science.* **95** (3):1166-1169.
- [256] **Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Gonzalez, E.A., Alonso, M.P., Maas, H., Jansen, W.H.** (1996) Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *Eur J Epidemiol.* **12**: 13-9.
- [257] **Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Mora, A., Prado, C., Alonso, M.P., Mourino, M., Madrid, C., Balsalobre, C., JuaÑez, A.** (1997) Distribution and characterization of faecal verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Vet. Microbiol.* **54**: 309-319.
- [258] **Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubois, P., Lange, M.** (2001) Characterisation of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *Int. J. Food Microbiology.* **63**: 217-223.
- [259] **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.

- [260] Garber, L.P., Wells, S.J., Hancock, D.D., Doyle, M.P., Tuttle, J., Shere, J.A., Zhao, T. (1995) Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **207**:46–49.
- [261] Faith, N.G., Shere, J.A., Brosch, R., Arnold, K.W., Ansay, S.E., Lee, M.S., Luchansky, J.B., Kaspar, C.W. (1996) Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1519-1525.
- [262] Robinson, S.E., Wright, E.J., Hart, C.A., Bennett, M. and French, N.P. (2004) Intermittent and persistent shedding of *Escherichia coli* O157 in cohorts of naturally infected calves. *J Appl Microbiol.* **97**: 1045-1053.
- [263] Van Donkersgoed, J., Berg, J., Potter, A., Hancock, D., Besser, T., Rice, D., LeJeune, J. and Klashinsky, S. (2001) Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *Can Vet J.* **42**: 714-720.
- [264] Matthews, L., Mckendrick, I.J., Ternent, H., Gunn, G.J., Synge, B. and Woolhouse, M.E. (2006) Super-Shedding cattle and the transmission dynamic of *Escherichia coli* O157. *Epidemie Infect.* **134**: 131-142.
- [265] Matthews, L., Low, J.C., Gally, D.L., Pearce, M.C., Mellor, D.J., Heesterbeek, J.A., Chase-Topping, M., Naylor, S.W., Shaw, D.J., Reid, S.W., Gunn, G.J. and Woolhouse, M.E. (2006) Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implication for control. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**: 547-552.
- [266] Isaäcson, M., Canter, P.H., Effler, P., Arntzen, L., Bomans, P., Heenan, R. (1993) Haemorrhagic colitis epidemic in Africa. *Lancet.* 341: 961.
- [267] Germanii, Y., Soro, B., Vohito, M., Morel, O., Morvan, J. (1997) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in Central African Republic. *Lancet.* 349: 1670.
- [268] Germanii Y, Cunin P, Tedjouka E, Ncharre CB, Morvan J, Martin P. (1998) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in Ngoila (Cameroon) during an outbreak of bloody diarrhoea. *Lancet.* **22**: 625-626.
- [269] Dadie, A., Karou, T., Adom, N., Kette, A., Dosso, M. (2000) Isolation of enteric pathogenic agents in Cote d'Ivoire: *Escherichia coli* O157:H7 and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Bull Soc of Pathol Exot.* **93**: 95- 96.
- [270] Sang, W.K., Saidi, S.M., Yamamoto, H., Ezaki, T., Iida, T., Yoh, M. (1996) Haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 in Kenya. *J Trop Pediatric.* **42**:118-119.
- [271] Presterl, E., Zwick, R.H., Reichmann, S., Aichelburg, A., Winkler, S., Kremsner, P.G., et al. (2003) Frequency and virulence properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* **69**: 406-410.
- [272] Olorunshola, I.D., Smith, S.T., Coker, A.O. (2000) Prevalence of enterohaemorrhagic O157:H7 in patients with diarrhea in Lagos Nigeria. *APMIS.* **108**: 761-763.
- [273] Browning, N.G., Botha, J., Sacho, H., Moore, P.J. (1990) *Escherichia coli* O157:H7 haemorrhagic colitis. Report of the first South African case. *South Afric Surgical J.* **28**: 28-29.

- [274] **Effer, E., Isaacson, M., Arntzen, L., Heenan, R., Canter, P., Barrett, T.** (2001) Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157:H7 in Africa. *Emerg Infect Dis.* **7**: 812-819.
- [275] **Bolduc, D., Srour, L.F., Sweet, L., Neatby, A., Galanis, E., Isaacs, S. and Lim, G.** (2004) Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Can Commun Dis Rep.* **30**: 81-88.
- [276] **Strachan, N.J., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M. and Ogden, I.D.** (2006) *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol.* **112**: 129-137.
- [277] **Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J.E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J.M.** (2006) Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int J Food Microbiol.* **107**:212-217.
- [278] **Caro, I., Mateo, J., García-Armesto, M.R.** (2007) Phenotypical characteristics of Shiga-like toxin *Escherichia coli* isolated from sheep dairy products. *Lett Appl Microbiol.* **45**:295-300.
- [279] **Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S.** (1996) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. *Inter J Food Microbiol.* **29**: 423-426.
- [280] **Al-Gallas, N., Ben Aissa, R.R., Attia Annabi, Th., Bahri, O., Boudabous, A.** (2002) Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. *Food Microbiology.* **19(4)**: 389-398.
- [281] **Benkerroum N, Bouhlal Y, El Attar A, Marhaben A.** (2004) Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in selected dairy and meat products marketed in the City of Rabat, Morocco. *J Food Prot.* **67(6)**:1234-1237.

Annexe 01

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT DES BOUSES PAR PRELEVEMENT RECTAL :

- Technique de prélèvement (décrite pour une personne droitère) :
- Porter un gant de fouille à chaque bras
- Prendre le flacon dans la main gauche, dévisser le bouchon avec la main droite puis le prendre dans la main gauche, face concave contre le corps du flacon
- Prélever une poignée de matières fécales dans le rectum (plus de 25g) avec la main droite et remplir le flacon aux 2/3
- Enlever le gant de la main droite et replacer le bouchon sur le flacon avec cette même main
- Enlever le gant de la main gauche
- Essuyer le flacon puis le placer sur un portoir ou dans un carton, en prenant soin de vérifier son identification

Annexe 02

Matériels de laboratoire

Le petit matériel

Matériels de prélèvement :

Boîtes stériles de 60 ml étiquetés

Gants

Blouse propre

Boots

Matériels de laboratoire :

Laboratoire de microbiologie :

Centrifugeuse

Autoclave

Balance

Bec bunsen

Four pasteur

Réfrigérateur à 4°C

Congélateur à -20°C

Vortex

Agitateur magnétique

Barreau magnétique

Portoirs

Boîtes en plastique stériles de 60 et 100 ml

Gants

Gaze hydrophile

Entonnoirs en verre stériles

Papiers filtres

Cuillères en plastiques à usage unique

Tubes stériles de 15 ml

Réactifs :

Phosphate Buffered Saline (PBS) à pH= 7,4.

Laboratoire de virus et grippe respiratoire :

Hotte PCR HEPA/UV3

Hotte à flux laminaire MSC-avantage™

Centrifugeuse à eppendorf

Gants

Micropipettes réglables (2-20µl ; 20 à 200µl ; 200 à 1000µl)

Embouts de 100 et 1000µl

Eppendorfs de 2 ml et 1,5 ml

Tubes de 0,2 et 0,5 ml

Réfrigérateur à +4°C
Congélateur à -20°C
Vortex
Bain-marie
Portoirs
Ethanol
Eau distillée stérile
Gaze hydrophile
Alcool
Agarose
Elenmeyer
TAE1x (Tampon Tris-acétate EDTA)

ANNEXE 03

Tableau : Résultats de la recherche de la séquence commune des gènes *stx1* & *stx2* pour les 200 échantillons analysés.

N° d'ordre	N° de ferme	N° d'échantillon	N° de vache	Préparation d'échantillon	Extraction d'ADN	PCR		
						<i>stx1</i> & <i>stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
1	2	1	75055	+	+	-	-	-
2		2	3485	+	+	+	+	-
3		3	3454	+	+	+	+	-
4		4	56104	+	+	-	-	-
5		5	79605	+	+	+	+	-
6		6	05671	+	+	-	-	-
7		7	12734	+	+	-	-	-
8		8	30371	+	+	-	-	-
9		9	19145	+	+	-	-	-
10		10	69522	+	+	+	+	-
11		11	12739	+	+	+	+	-
12		12	59424	+	+	+	+	-
13		13	46496	+	+	+	+	-
14		14	89751	+	+	-	-	-
15		15	37491	+	+	-	-	-
16	9	1	NI. 6990	+	+	-	-	-
17		2	NI. 6847	+	+	+	+	-
18		3	NI.0880	+	+	+	+	-
19	10	1	NI	+	+	+	+	+
20		2	NI 7934	+	+	+	+	-
21		3	NI 1828	+	+	+	+	+
22		4	NI 4950	+	+	+	+	+
23		5	NI 6122	+	+	-	-	-
24		6	NI 5220	+	+	+	+	+
25		7	NI 4880	+	+	+	+	+
26		8	NI 5838	+	+	-	-	-
27	11	1	NI. n° 1	+	+	-	-	-
28		2	NI. n° 2	+	+	+	+	-
29		3	NI. n° 3	+	+	-	-	-
30		4	NI. n° 4	+	+	+	+	-
31		5	NI. n° 5	+	+	+	+	-
32		6	NI. n° 6	+	+	+	+	-
33		7	NI. n° 7	+	+	-	-	-
34		8	NI. n° 8	+	+	-	-	-
35		1	NI6122	+	+	+	+	+
36		2	NI	+	+	+	+	+

37	12	3	NI. n° 9	+	+	-	-	-
38		4	NI. n°10	+	+	+	+	-
39		5	NI. n°11	+	+	+	+	-
40	13	1	6114	+	+	-	-	-
41		2	6448	+	+	-	-	-
42		3	8953	+	+	-	-	-
43		4	1	+	+	-	-	-
44		5	2	+	+	-	-	-
45		6	3	+	+	-	-	-
46	14	1	85199	+	+	-	-	-
47		2	12549	+	+	-	-	-
48		3	03986	+	+	+	+	-
49		4	19480	+	+	+	+	+
50		5	8721	+	+	-	-	-
51		6	15065	+	+	+	+	+
52		7	43644	+	+	-	-	-
53		8	51349	+	+	+	+	-
54	15	1	6090 NI	+	+	+	+	-
55		2	79 NI	+	+	+	+	-
56		3	95 809NI	+	+	+	+	-
57		4	3G02	+	+	-	-	-
58		5	07003	+	+	+	+	-
59		6	49905NI	+	+	+	+	-
60	16	1	68 NI	+	+	-	-	-
61		2	686382NI	+	+	+	+	-
62		3	88 NI	+	+	+	+	-
63		4	2180	+	+	-	-	-
64		5	01 NI	+	+	-	-	-
65		6	21HO	+	+	+	+	-
66		7	8021	+	+	+	+	-
67		8	03 NI	+	+	+	+	-
68	17	1	01 NI	+	+	-	-	-
69		2	02 NI	+	+	-	-	-
70		3	04 NI	+	+	-	-	-
71		4	0030NI	+	+	-	-	-
72		5	1657	+	+	-	-	-
73	18	1	62_788	+	+	+	+	-
74		2	104	+	+	+	+	-
75		3	050_03	+	+	+	+	-
76		4	040_01	+	+	+	+	-
77	19	1	10004 NI	+	+	-	-	-
78		2	07022 NI	+	+	-	-	-
79		3	10014 NI	+	+	-	-	-
80		4	09001 NI	+	+	-	-	-
81		5	09012 NI	+	+	-	-	-
82		6	05001 NI	+	+	-	-	-
83		1	00001	+	+	-	-	-

84	20	2	04001	+	+	+	+	-
85		3	08002	+	+	-	-	-
86		4	08005	+	+	-	-	-
87		5	06002	+	+	-	-	-
88	21	1	9239NI	+	+	+	+	-
89		2	06025NI	+	+	-	-	-
90		3	7327	+	+	+	+	-
91		4	03019NI	+	+	+	+	-
92		5	7344NI	+	+	-	-	-
93		6	06163NI	+	+	+	+	-
94		7	9800NI	+	+	-	-	-
95		8	09010NI	+	+	-	-	-
96		9	7343NI	+	+	-	-	-
97		10	08013NI	+	+	-	-	-
98		11	04109NI	+	+	-	-	-
99		12	704313NI	+	+	-	-	-
100		13	4377NI	+	+	-	-	-
101		14	6825NI	+	+	-	-	-
102		15	2957NI	+	+	-	-	-
103		16	9236NI	+	+	+	+	-
104		17	06040NI	+	+	-	-	-
105		18	9239NI	+	+	-	-	-
106		19	09003NI	+	+	-	-	-
107		20	04089NI	+	+	-	-	-
108		21	2254NI	+	+	-	-	-
109		22	7826NI	+	+	-	-	-
110		23	09307NI	+	+	-	-	-
111		24	7326	+	+	-	-	-
112	22	1	5706	+	+	-	-	-
113		2	31458	+	+	-	-	-
114		3	08003	+	+	-	-	-
115		4	08038	+	+	-	-	-
116		5	74307	+	+	-	-	-
117		6	3499	+	+	-	-	-
118		7	NI	+	+	-	-	-
119		8	8850587	+	+	-	-	-
120		9	90917	+	+	-	-	-
121		10	94050	+	+	-	-	-
122		11	57719	+	+	-	-	-
123		12	87332	+	+	-	-	-
124		13	93256	+	+	-	-	-
125		14	NI	+	+	-	-	-
126		15	2706	+	+	-	-	-
127		16	91175	+	+	-	-	-
128		17	86017	+	+	-	-	-
129		18	70629	+	+	-	-	-
130		19	08003	+	+	-	-	-

131		20	3156847	+	+	-	-	-
132		21	0506	+	+	+	+	-
133		22	32660	+	+	-	-	-
134		23	NI	+	+	-	-	-
135		24	NI	+	+	-	-	-
136	23	1	05002	+	+	-	-	-
137		2	06001	+	+	-	-	-
138		3	NI	+	+	-	-	-
139	24	1	571	+	+	-	-	-
140		2	501	+	+	-	-	-
141		3	NI	+	+	-	-	-
142	25	1	59804	+	+	+	+	-
143		2	NI	+	+	+	+	-
144		3	9010	+	+	-	-	-
145		4	9008	+	+	-	-	-
146		5	4227	+	+	+	+	-
147		6	7265	+	+	-	-	-
148		7	7474	+	+	-	-	-
149		8	5406	+	+	+	+	-
150	26	1	601	+	+	+	+	-
151		2	801	+	+	-	-	-
152		3	612	+	+	-	-	-
153		4	NI	+	+	+	+	-
154	27	1	2140	+	+	-	-	-
155		2	2141	+	+	-	-	-
156		3	2473	+	+	-	-	-
157		4	2474	+	+	-	-	-
158		5	4145	+	+	-	-	-
159		6	5	+	+	-	-	-
160	28	1	0610	+	+	+	+	-
161		2	0620	+	+	-	-	-
162		3	0805	+	+	-	-	-
163		4	0831	+	+	-	-	-
164		5	0852	+	+	-	-	-
165		6	0612	+	+	-	-	-
166		7	0841	+	+	-	-	-
167		8	0630	+	+	-	-	-
168		9	0800	+	+	-	-	-
169		10	0650	+	+	-	-	-
170	29	1	09112	+	+	+	+	+
171		2	09184	+	+	+	+	-
172		3	09181	+	+	+	+	-
173		4	08131	+	+	+	+	-
174	30	1	36713	+	+	-	-	-
175		2	05407	+	+	-	-	-
176		3	23612	+	+	-	-	-

177		4	2314	+	+	+	+	-
178		5	21670	+	+	-	-	-
179	31	1	NI	+	+	+	+	-
180		2	NI	+	+	-	-	-
181		3	NI	+	+	-	-	-
182		4	NI	+	+	-	-	-
183		5	NI	+	+	-	-	-
184		6	NI	+	+	-	-	-
185		7	NI	+	+	-	-	-
186		8	NI	+	+	-	-	-
187	32	1	6184	+	+	-	-	-
188		2	8104	+	+	-	-	-
189		3	8201	+	+	-	-	-
190		4	7481	+	+	-	-	-
191		5	06085	+	+	-	-	-
192		6	8181	+	+	-	-	-
193		7	5532	+	+	-	-	-
194		8	5388	+	+	-	-	-
195	33	1	401	+	+	-	-	-
196		2	NI	+	+	-	-	-
197		3	0412	+	+	-	-	-
198	34	1	1827	+	+	-	-	-
199		2	0745	+	+	-	-	-
200		3	4532	+	+	-	-	-

NI non identifié