



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية.

Département des Sciences Biologiques



# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

## Intitulé

***MISE EN POINT DES METHODES DE DETECTION  
D'ESCHERICHIA COLI PRODUCTRICE DE SHIGA-TOXINE***

**Présenté par :**

Melle. ADDA Sara  
Melle. MADOUY Yousra

**Devant le jury :**

**Président :** M BENSOUILAH Taiqyedine MC-B (Université De Bordj Bou Arréridj)

**Examineur :** Mme ABED Hanane MC-B (Université De Bordj Bou Arréridj)

**Encadreur :** M MERIBAI Abdelmalek MC-B (Université De Bordj Bou Arréridj)

**Année universitaire : 2020/2021**

## ***REMERCIEMENTS***

*Nous remercions **ALLAH** tout puissant de nous avoir donné la force et la capacité d'effectuer ce travail.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier M<sup>r</sup> **BENSOULLAH Taïqyeddine** (Maitre de conférences B à l'université Mohammed el Bachir El Ibrahimî) qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.*

*Nos remerciements vont à notre encadreur et enseignant M<sup>r</sup> **MERIBAI Abdelmalek** Maitre de conférences B à l'université Mohammed el Bachir El Ibrahimî) qui nous a inspiré tout au long de ce travail, pour ses efforts fournis, ainsi que les précieux conseils qui nous ont aidé afin de réaliser ce travail.*

*Nous remercierons également M<sup>me</sup> **ABED Hanane** Maitre de conférences B à l'université Mohammed el Bachir El Ibrahimî) qui a acceptée de faire part de ce jury, d'examiner et juger notre travail.*

*Nos remerciements vont à tous les enseignants de la faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie de la Terre et l'Univers pour la qualité des enseignements qu'on a acquis durant le cycle de notre formation.*

*Enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail avec l'expression de ma reconnaissance à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverai jamais à leur exprimer mes remerciements sincères.*

*A mon père **RACHID** pour le goût à l'effort qu'il suscité en moi, de par sa rigueur et en m'encouragent à aller plus loin possible.*

*A la femme qui s'est sacrifiée pour satisfaire mes exigences et qui n'a épargnée aucun effort pour me rendre heureuse :*

*Ma mère **DAHIBA***

*A mes sœurs **Radia**, **Asma** et **Imene**, **Ikhlas** et à mon frère **ANIS** qui m'ont encouragé tout au long de mon parcours de master.*

*A mon binôme **Yusra** pour son soutien, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

*A mes amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs encouragements et leurs amours.*

*Melle **Adda.S***

## *Dédicaces*

*A celle qui a semée au fin fond de mon cœur l'amour et la tendresse, qui m'a toujours été la source de bonté, de générosité et d'espoir : à ma mère **Nora**.*

*Je dédie ce mémoire à l'homme qui a sacrifié pour ses enfants, à celui qui m'a lancé dans la vie avec force et volonté : à mon père **ABDELGHANI**.*

*A mon adorable sœur : **NADA***

*A Mon Mari : **BILEL***

*A mon binôme : **SARA***

*A tous ceux qui me connaissent et m'aiment.*

*Mme **MADOUY. Y***

## Table de matières

**Remerciement**

**Dédicaces**

**Liste d'abréviation**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Sommaire**

**Résumés**

## Sommaire

<b>Introduction</b> . . . . .	01
<b>Chapitre 1/ Généralités sur les <i>Escherichia coli</i></b>	
<b>I. Généralités sur les <i>Escherichia coli</i></b> . . . . .	03
I.1. Définition et Taxonomie . . . . .	03
I.2. Structure antigénique . . . . .	03
I.2.1. L'antigène O ou somatique . . . . .	03
I.2.2. L'antigène K ou capsulaire . . . . .	04
I.2.3. Antigène H ou flagellaire . . . . .	04
<b>II. Différents pathovars <i>Escherichia coli</i></b> . . . . .	04
II.1. Serotype <i>Escherichia coli</i> O157: H7 . . . . .	05
II.2. Caractères phénotypiques . . . . .	06
II.3. Caractères écologiques. . . . .	06
<b>III. Réservoirs du germe</b> . . . . .	07

III.1. Les produits d'origine animale . . . . .	07
III.1.1. Viandes et produits carnés . . . . .	07
III.1.2. Les produits laitiers . . . . .	09
III.2. Filières agroalimentaires. . . . .	09
<b>IV. Modes de transmission . . . . .</b>	<b>10</b>
IV.1 Transmission alimentaire. . . . .	10
IV.2 Transmission interhumaine . . . . .	11
IV.3 Transmission par contact des animaux et environnement fermier . . . . .	11
<b>V- Facteurs de virulences . . . . .</b>	<b>11</b>
V.1. Lésion d'attachement- effacement . . . . .	11
V.2. Les shigatoxines. . . . .	13
V.2.1. Les phages stx. . . . .	13
V.2.2. Structure et mode d'action des Shiga-toxines. . . . .	13
V.3. L'entérohemolysine E-hlyA. . . . .	14
V.4. Autres facteurs de virulence . . . . .	15
<b>VI. Pathologies liées aux EHEC . . . . .</b>	<b>16</b>
VI.1. Colite hémorragique. . . . .	17
VI.2. Syndrome Hémolitique et Urémique (SHU). . . . .	17
VI.3. Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT). . . . .	17
VII. Traitement du syndrome hémolytique et urémique et du purpura thrombotique Thrombocytopénique	18
 <b>Chapitre 2/ Méthodes de détection des Escherichia EHEC:</b>	
<b>I. Méthodes de dénombrement des <i>E. coli</i> O157 :H7. . . . .</b>	<b>19</b>
I.1 Protocole de recherche de <i>E. coli</i> O157: H7 dans les aliments . . . . .	19
I.1.1 Etape d'enrichissement. . . . .	20
I.1.2 Etape de séparation-concentration. . . . .	20

I.1.3 Détection d' <i>E. coli</i> O157 sur milieux sélectifs. . . . .	21
<b>II. Méthodes immuno-biochimiques pour recherche des O157 : H7. . . . .</b>	<b>21</b>
II.1 Méthodes biochimiques de détection et d'isolement de <i>E. coli</i> O157:H7. . . . .	21
II.1.1 Utilisation des propriétés biochimiques de <i>E. coli</i> O157:H7. . . . .	21
II.1.2 Méthode de confirmation par agglutination phénotypique . . . . .	23
II.2 Méthodes immunologiques de détection de <i>E. coli</i> O157:H7. . . . .	23
II.2.1 Systèmes immuno-chromatographiques et systèmes ELISA . . . . .	23
II.2.2 Systèmes automatisés/ ELFA . . . . .	25
II.2.3 Tests immunologiques validés AFNOR de détection des <i>E. coli</i> O157:H7. . . . .	26
<b>III. Techniques de détection des toxines STEC. . . . .</b>	<b>28</b>
III.1 Techniques de détection de la production de Shigatoxines (ELISA) . . . . .	28
III.2 Méthodes génétiques pour la détection des STEC . . . . .	28
III.2.1 Les systèmes P.C.R ( <i>Polymérase Chain Reaction</i> ). . . . .	28
<b>IV. Les différents milieux d'isolement des STEC. . . . .</b>	<b>29</b>
<b>Conclusion. . . . .</b>	<b>30</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexe</b>	

## Liste des abréviations

A/E = Attachement/effacement.

AAF = fimbriae d'adhérence agrégative.

Afa = Afimbrial adhesin.

BCIG = 5- bromo-4 chloro-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide.

C.H = Colite hémorragique

CMI = concentrations minimales inhibitrices.

CT-SMAC = Cefixime-tellurite-sorbitol-MacConkay.

DAEC = *E. coli* à adhésion diffuse.

eae = EPEC attachement/effacement.

EAEC = *E. coli* entéroaggrégatifs.

EC = *Escherichia coli*.

Eh x= Entérohémolysine des EHEC.

EHEC = *E. coli* entérohémorragiques.

EIEC = *E. coli* entéroinvasifs.

ELFA = Enzyme Linked Fluorescent Fluoresent Assay.

ELISA = dosage immuno-enzymatique (antigène ou anticorps) sur support solide « enzyme-linked immunosorbent assay ».

EPEC = *E. coli* entéropathogènes.

Esp =EPEC-secreted protein.

espP = gène codant pour la sérine protéase espP.

ETEC = *E. coli* entérotoxinogènes.

Gb3 = Globotriooacylglycérol.

HPI = High pathogen pathogenicity island.

ICE = Immuno-Concentration *E. coli* O157.

ICMSF = La commission internationale sur les spécifications microbiologiques des aliments.

IMS = Immunomagnétique séparation.

ISO = Organisation Internationale de Normalisation.

LDC = La lysine décarboxylase.

LEE = Locus of enterocyte effacement.

LT = Entérotoxines thermolabile.

mTSB = bouillon tryptone soja modifié.

MUG = 4- méthyl- umbelliféryl- $\beta$ - glucuronide

ODC = Ornithine Décarboxylase.

PCR = Polymerase Chain Reaction.



## *Liste des abréviations*

PTT= Purpura thrombotique thrombocytopenie.

SHU = Syndrome hémolytique et urémique.

SMAC = sorbitol-MacConkay.

STT = système de sécrétion de type III.

ST = Entérotoxines thermostable.

stcE = gène codant pour la zinc metalloprotéase.

STEC = Shiga toxin-producing *E. coli*.

stx = gène qui code pour une toxine Stx.

Stx = Shigatoxine.

Tir = Translocated intimin receptor.

TS = Tryptone Soja.

uidA = gène qui code pour la  $\beta$ -glucuronidase.

USDA = United States Department of Agricultural.

VTEC = verocytotoxin producing *Escherichia coli*.

**Liste des Figures**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal	<b>10</b>
<b>02</b>	Structure (A) et mode d'action des Shiga-toxines (B), Adaptée de Bryan et al. (2015); Melton-Celsa (2014).	<b>12</b>
<b>03</b>	Évolution clinique des infections à <i>E. coli</i> entérohémorragique (AFSSA., 2003). EHEC: <i>E. coli</i> entérohémorragique; IRC: insuffisance rénale chronique; SHU: Syndrome hémolytique et urémique.	<b>16</b>
<b>04</b>	Schéma de la détection et de l'identification de souches STEC O157 à partir d'aliments (norme ISO 16.154).(Vimont.,2007)	<b>17</b>
<b>05</b>	VIP test, test immunologique en «1 étape ». (vimont.2007)	<b>23</b>
<b>06</b>	Automate VIDAS avec des cônes et des barettes (SAVOYE, 2011)	<b>24</b>
<b>07</b>	Principe du VIDAS (SAVOY, 2011)	<b>24</b>
<b>08</b>	La technique de la séparation immuno-magnétique (IMS). Dynabeasds anti- <i>E.coli</i> O157.(DYNAL, A.S., 1997).	<b>26</b>

Liste des tableaux

N°	Titre	Pages
<b>01</b>	les affections associées aux différents pathovars des <i>Escherichia coli</i> responsables d'infections intestinales chez l'homme (Gouali et Weill.,2013)	<b>04</b>
<b>02</b>	Principaux critères différentiels des espèces du genre <i>Escherichia</i> ( <i>E. coli</i> , <i>E. hermanii</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i> ) (Grimont, 1987)	<b>06</b>
<b>03</b>	Caractéristiques de croissance d' <i>E. coli</i> O157 : H7 (adapté d'Anses., 2011)	<b>07</b>
<b>04</b>	Tableau de synthèse Fréquences observées de produits contaminés par <i>E. coli</i> O157: H7 (Vimont.,2007)	<b>08</b>
<b>05</b>	Fréquences observées de laits et fromages contaminés par des STEC. (Vimont., 2007)	<b>09</b>
<b>06</b>	Facteurs de virulence intervenant dans le pouvoir pathogène des <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques. (Gouali et Weill., 2013)	<b>15</b>

# Résumé

### Résumé

*Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (*STEC*), bactéries responsables d'infections aux manifestations cliniques graves. Qui vont des diarrhées bénignes à la colite hémorragique au syndrome hémolytique et urémique (SHU); principale cause d'insuffisance rénale chez les enfants. Le choix, l'optimisation des techniques pour recherche/dénombrement des *STEC* dans les eaux, aliments est un sujet trop controversé. Cependant; aucune des techniques, n'est différentielle entre les souches/ sérotypes pathogènes des non pathogènes. L'objectif de l'étude est de réaliser une synthèse des connaissances par l'analyse des données scientifiques relatives aux *Escherichia coli* entérohémorragiques (*ECEH*), leurs propriétés, virulence, aliment vecteurs, techniques d'application en Microbiologie Alimentaire, permettant leur détection/ dénombrement. Les principaux modes de transmission des *STEC* à l'Homme sont la consommation d'aliments d'origine animale, d'eaux contaminées, la transmission interhumaine et le contact avec des animaux porteurs. Les *STEC* ne sont tous pathogènes mais certaines souches *E. coli* entérohémorragiques sont potentiellement virulentes. Actuellement cinq sérotypes: *O157: H7*, *O26 : H11*, *O103: H2*, *O111: H8* et *O145: H28*, reconnus responsables d'épidémies humaines. Cependant; des données scientifiques affirment qu'il existe un nombre élevé, d'autres souches/ sérotypes pathogènes, bien que rarement impliqués dans des épidémies. De nombreuses méthodes normalisées/ accréditées (Bactériologiques, biochimiques, immunologiques, sérologiques, génétiques) sont d'application pour la détection /dénombrement des sérotype *EHEC/ STEC* dans les eaux et les denrées alimentaires. A l'heure actuelles, les techniques génétiques, basées sur la recherche/ amplification des gènes *stx* (*stx1*, *stx2*...) sont de référence. Le renforcement du control bactériologique des zoonoses, aliments, abattoires, laiteries, fromageries, eaux potables, seul rempart contre ces pathogènes.

**Mots clés :** *Escherichia coli EHEC, STEC*, sérotype *O157: H7*, Bactériologie, Techniques, Aliments.

**Abstract**

Shiga toxin producing *Escherichia coli*, procaryote species that form part of humans and warm-blooded animals gut flora. Although most *Escherichia coli* considered harmless, certain strains and serotypes can cause severe humans illness, Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are recognized as responsables of bloody diarrhoea, haemolytic ureamic syndrome (HUS) which can be fatal in humans. Study aimed to establish of a synthesis of current knowledge by critical analysis of data relating to enterohemorrhagic *Escherichia coli* species (ECEH), their properties, virulence, transmission, and application techniques in Food Microbiology, allowing their detection / enumeration. The modes of transmission of STEC to humans are consumption of contaminated food and water, human-to-human transmission and contact with carrier animals. While not all STEC are pathogenic for humans, certain strains called enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) are responsible for serious human infections. Currently five serotypes, identified, dominate the group of *Escherichia coli* ECEH. These are: O157: H7, O26: H11, O103: H2, O111: H8 and O145: H28. However, scientific data claim that there are a large number of other serotypes although rarely involved in epidemics are potentially virulent. Many standardized / accredited methods (Bacteriological, biochemical, immunological, serological, genetic) are applicable for control, detection / enumeration of EHEC serotypes in water and foodstuffs. At the present time, genetic techniques, in particular those based on research / amplification of stx DNA regions (stx1, stx2, etc.) are standard. In Algeria, absence of legal texts, national standards, strict control measures are urgently needed to reduce the contamination risk.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Shiga toxin- STEC, *Enterohemorrhagic- EHEC*, Serotype O157: H7, Bacteriology, Methods, Food.

## ملخص

الإشريكية القولونية المنتجة للشيفاتوكسين هي بكتيريا مسؤولة عن العدوى البشرية بأعراض سريرية مختلفة. تتراوح هذه من الإسهال الخفيف إلى التهاب القولون النزفي ومتلازمة انحلال الدم اليوريمي (SHU) ، و هي السبب الرئيسي للقصور الكلوي لدى الأطفال الصغار. الهدف من الدراسة هو تحقيق تركيب المعارف و المكاسب الحالية من خلال التحليل النقدي للبيانات العلمية المتعلقة بأنواع الإشريكية القولونية المعوية النزفية ECEH و خصائصها و قوتها و إنتقالها و تقنيات التطبيق في علم الأحياء الدقيقة للأغذية، مما يسمح لها الكشف\ الإحصاء، و يولى إهتمام خاص للنمط المصلي: O157 تتمثل الطرق الرئيسية لإنتقال STEC إلى البشر في إستهلاك الطعام و المياه الملوثة، و الإنتقال من إنسان إلى اخر، و الإتصال بالحيوانات الحاملة، على الرغم من أن جميع أنواع STEC ليست مسببة للأمراض للبشر، إلا أن بعض السلالات التي تسمى الإشريكية القولونية النزفية المعوية (EHEC) هي المسؤولة عن العدوى البشرية الخطيرة. حالياً، تم تحديد خمسة أنماط مصلية، و تهيمن على مجموعة الإشريكية القولونية EHEC و التي هي: O145: H28 و O111: H8 ، O103: H2 ، O26: H11 ، O157: H7 و مع ذلك، تؤكد البيانات العلمية أن هناك عددا كبيرا من الأنماط المصلية الأخرى على الرغم من أنه نادرا ما تكون متورطة في الأوبئة و من المحتمل أن تكون ضارة. العديد من الطرق المعيارية / المعتمدة (البكتريولوجية ، والكيميائية الحيوية ، والمناعية ، والمصلية ، والوراثية) قابلة للتطبيق، للإكتشاف\ إحصاء الأنماط المصلية ل EHEC في الماء و المواد الغذائية. في الوقت الحالي، تظل التقنيات الجينية، و لا سيما تلك القائمة على البحث\ تضخيم جينات Stx (Stx1, Stx2) هي المعيار المعتمد.

**الكلمات المفتاحية:** الإشريكية القولونية، الإشريكية القولونية النزفية المعوية، الإشريكية القولونية O157: H7 ، علم البكتيريا ، التقنيات ، الأطعمة.

# Introduction



### **Introduction**

Les espèces *Escherichia coli* producteurs des Shiga-toxines (STEC), sont considérées comme des potentiels pathogènes émergents, notamment en raison des faibles doses infectieuses observées. Ces *E. coli* (STEC) ne sont pas tous pathogènes pour l'homme, le terme d'EHEC, regroupant les STEC hautement pathogènes pour celui-ci (AFSSA, 2003).

La souche bactérienne *E. coli*, principalement incriminée, lors de toxi-infections à EHEC, est le sérotype O157: H7. Cependant, il existe plus de 300 sérotypes d'EHEC répertoriés, ces EHEC appelées non-O157: H7, représentent 20 à 70% des infections à EHEC chaque année. Les rapports européens émanant de l'EFSA (*European Food Safety Authority*) et Américains de l'USDA (*United States Department of Agriculture*), ont identifiés 6 sérotypes d'EHEC non- O157, les plus couramment isolés chez l'homme : O26, O45, O103, O111, O121 et O145 (EFSA and ECDC, 2016).

La prise de conscience du danger des souches *E. coli* entérohémorragiques, est due essentiellement, à leurs implications dans des cas mortels de syndrome hémolytique et urémique (SHU), du purpura thrombotique thrombo-cytopénique (PTT) chez l'adulte; ou les principaux vecteurs sont les aliments d'origine animales (Bouvet *et al.*, 2003; Espié *et al.*, 2002).

Il existe, néanmoins, d'autres modes de transmission des STEC à l'homme, comme la transmission interhumaine, le contact avec des animaux porteurs, ou bien encore, le contact avec des éléments du milieu extérieur souillés par des fèces (surfaces de traitement en technologie alimentaires, eaux potable et de baignade, sols, environnement fermier...).

Le réservoir naturel des STEC, constitué principalement des animaux porteurs sains, correspond plus particulièrement au tube digestif des ruminants (Ferreira *et al.*, 2014), essentiellement les espèces bovines (Chahed *et al.*, 2006), mais aussi ovines et caprines (Ferhat *et al.*, 2018).

La contamination des aliments ainsi que des eaux est principalement liée à des contaminations fécales (Odonkor et Ampofo, 2013; Djaouda *et al.*, 2020). Elle peut avoir lieu au niveau des abattoirs lorsque l'hygiène n'est pas maîtrisée.

Elle peut aussi être liée à une mauvaise hygiène de la traite du lait (Farroukh *et al.*, 2018).

Enfin, les végétaux et les fruits, peuvent être contaminés par des effluents tels que les substances d'épandages ou de l'eau contaminée par des déjections animales (AFSSA, 2003; Djaouda *et al.*, 2020).

## ***Introduction***

Les épidémies liées aux STEC, avaient lieu, surtout, à cause des viandes hachées de bœuf insuffisamment cuites (Nastasijevic *et al.*, 2009), mais également des produits laitiers (Coia *et al.*, 2001; Vernozy-Rozand *et al.*, 2002).

Les fromages fabriqués à base de lait cru, ont été impliqués dans des cas sporadiques et/ou épidémiques (Coia *et al.*, 2001). Cependant, le lait cru a rarement été associé à des épidémies humaines (Fach *et al.*, 2001). De nombreuses techniques bactériologiques, moléculaires, sont d'application pour la recherche et l'évaluation de la prévalence des STEC: O157 dans les denrées alimentaires, notamment celles d'origine animales. Cependant, aucune de ces techniques n'est différentielle entre les souches pathogènes et non pathogènes.

Le choix et l'optimisation des techniques pour recherche et dénombrement des STEC dans les eaux et denrées alimentaires est un sujet de grande controverse (Chui *et al.*, 2018). En Algérie, la recherche et le dénombrement des STEC notamment des sérotypes O157: H7, n'est pas systématique pour le contrôle de qualité des eaux et des aliments ou pour la surveillance des agents zoonotiques. À ce titre, une absence de normes nationales et un vide juridique sont constatés. (AFSSA, 2003)

La présente étude a fixé comme objectif, la réalisation d'une collecte et synthèse des connaissances actuelles, par analyse critique des données scientifiques relatives aux espèces *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), leurs propriétés, leur virulence, leur transmission, les techniques d'application en microbiologie alimentaire, permettant leur détection/ dénombrement. Une attention particulière sera réservée aux sérotypes pathogènes notamment le O157: H7.

Ce mémoire, est structuré en deux chapitres dont:

- Un premier chapitre portera sur des caractéristiques concernant les *Escherichia coli*.
- Un deuxième chapitre traitant les différentes méthodes de détection et dénombrement des *Escherichia coli* EHEC.

*Chapitre 1 :*

Généralités sur les  
Escherichia coli

## I. Généralités sur les *Escherichia coli*

### I.1 Définition et Taxonomie

Le nom *Escherichia coli* a été donné en hommage aux travaux du pédiatre allemand Théodore Escherich qui décrit pour la première fois, en 1885, le bacille *Bacterium coli* dans des selles de nourrisson. *E. coli* fait partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de la plupart des animaux à sang chaud (Escherich,1885).

L'espèce *Escherichia coli* appartient au genre *Escherichia* de la famille *Enterobacteriaceae*, qui à son tour fait partie de l'ordre des *Entérobactéries*, de l'embranchement des *protéobactéries*  $\gamma$  rattaché au règne des bactéries (Greatorex et Thorne., 1994)

*E. coli*, et plus globalement les coliformes, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournissant une indication sur l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive, notamment les salmonelles (Laskin et Lechevalier, 1994).

La caractérisation bactériologique d'*E. coli* se définit par (Le Minor et al., 1990) :

- bacille à gram négatif (2 à 4  $\mu$  de longueur 0.4 à 0.6 $\mu$  de large) ;
- immobiles ou mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriche ;
- poussent sur milieu ordinaire ;
- aérobies-anaérobies facultatifs ;
- réduisent le nitrate en nitrite ;
- ont une réaction d'oxydase négative ;
- utilise le glucose par voie fermentative

La plupart des souches d'*E. coli* sont commensales et banales mais certains à l'origine de pathologies intestinales et extra-intestinales. En 1945, Bray démontre que certaines épidémies de diarrhées chez les enfants, non associées à *Salmonella* ou à *Shigella*, ont pour origine des souches de *E. coli*. En 1974, les travaux de Kauffmann permettent de distinguer les différentes souches de *E. coli* dont les pathogènes responsables d'entérites grâce à leurs antigènes de surface.

### I.2 Structure antigénique

#### I.2.1 L'antigène O ou somatique

Cet antigène est localisé au niveau de la paroi bactérienne de nature lipopolysaccharides, il est en fait endotoxine bactérienne. A cet antigène O correspond une agglutination O. Il existe environ 180 antigènes O différent. (Fauchère et Avril,2002)

## Chapitre 1/ Généralités sur les *Escherichia coli*

### I.2.2 L'antigène K ou capsulaire

De nature polysaccharide, ils entourent l'antigène O et se présentent sous deux types de structure :

- La première, capsulaire lorsqu'ils constituent une capsule visible au microscope.
- La seconde, d'enveloppe quand ils ne sont pas visibles au microscope est masquent les antigènes somatiques, si bien qu'ils inhibent l'agglutinabilité O des bactéries par les sérums de diagnostic de *Escherichia coli* préparé sur lapin. Environ 80 antigènes K ou d'antigène d'enveloppe différentes ont été reconnus. (Joly et Alain, 2003)

### I.2.3 Antigène H ou flagellaire

Il n'existe que chez les bactéries mobiles, donc pourvus de flagelle. A cet antigène H correspond une agglutination H faite d'agglutinants floconneux, lâche et facilement dissociés par agitation. Les bactéries sont agglutinées par leurs flagelles. On connaît 56 types.

Les antigènes K, O, H sont à la base d'un schéma de diagnostic antigénique, notamment pour le diagnostic différentiel, ils permettant d'établir le sérotype et de détecter les souches d'*Escherichia coli* responsable du pathologies (Kauffmann, 1974).

## II. Les différents pathovars *Escherichia coli*

Tableau 01 présente les affections associées aux différents pathovars des *Escherichia coli* responsables d'infections intestinales chez l'homme (Gouali et Weill, 2013).

(Voir annexe 01)

**Tableau 01 : les affections associées aux différents pathovars des *Escherichia coli* responsables d'infections intestinales chez l'homme (Gouali et Weill.,2013).**

Pathotype	Affection associées	Caractéristiques des souches
EPEC, Enteropathogenic E. coli	Diarrhée aqueuse aiguë ou persistante	Adhésion localisée sur les entérocytes et les cellules in vitro. Adhésion « intime » aux entérocytes et destruction des microvillosités (lésion d'attachement-effacement), présence du locus d'effacement des entérocytes (LEE). Pas de caractère invasif de type <i>Shigella</i> sp. Pas de production d'entérotoxines ou de toxines Stx.

## *Chapitre 1/ Généralités sur les Escherichia coli*

ETEC, Entérotoxigène E. coli	Diarrhée aqueuse aiguë	Adhésion aux entérocytes grâce à des pili spécifiques (CFAs, Css,...). Production d'entérotoxines thermostables (ST) et/ou hémolabiles (LT).
EHEC, Entérohémorragique E. coli	Diarrhée aqueuse aiguë ; colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique, purpura thrombotique thrombocytopénique	Production de Shiga-toxines (Stx) ou vérotoxines. Lésion d'attachement-effacement sur les entérocytes et présence du locus d'effacement des entérocytes (LEE). Plasmide de virulence de 60 Mda.
EIEC, Entéroinvasive E. coli	Diarrhée aqueuse, Syndrome dysentérique	Génétiquement très proche de Shigella sp. Plasmide de virulence de 140 Mda Invasion et prolifération dans les cellules épithéliales in vitro et in vivo.
EAEC, E. coli entéroagrégatif	Diarrhée persistante	Adhésion typique en « briques empilées » sur cellules in vitro. Facteurs de virulence hétérogènes : adhésines (AAFs), toxines (EAST1, Pet), facteurs entéroagrégants (aggR, aggA).
DAEC, E. coli à adhérence diffuse	Diarrhée aqueuse aiguë	Adhésion diffuse sur cellules in vitro. Production d'adhésines afimbriales (afa). Pas de production d'entérotoxines ou de Stx.

### **II.1 Sérotype *Escherichia coli* O157 : H7**

*Escherichia coli* O157 : H7 produit des toxines de type Shiga et est classé dans les *E. coli* entérohémorragiques. Ce sérotype, fut le premier à être identifié comme responsable de diarrhées hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'homme au début des années 1980, de nombreuses autres souches d'*E. coli* ont été reconnues comme induisant les mêmes effets, mais *E. coli* reste la bactérie la plus étudiée et étant le sérotype le plus souvent isolé lors de cas d'infections. (Grimont, 1987).

## II.2 Caractères phénotypiques

Deux caractéristiques fondamentales différencient le sérotype O157 : H7 des autres souches d'*E. coli* :

- *Escherichia coli* O157 : H7 ne fermente pas le sorbitol en 24h à l'inverse des autres souches
- Chez *Escherichia coli* O157 : H7, l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase n'est pas active.

Ces deux caractéristiques ont été utilisées pour mettre en place des techniques de détection d'*E. coli* O157 : H7. Cependant des souches mutantes d'*E. coli* O157 : H7 fermentant le sorbitol ont été isolées (Feng, 1995). (Tableau 02).

**Tableau 02 : Principaux critères différentiels des espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*). (Grimont, 1987).**

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

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

## II.3 Caractères écologiques

Les STEC, comme la plupart des *E. coli*, sont capables de croître à des températures comprises entre 6°C et 46°C, avec un optimum à 37 °C (40°C pour *E. coli* O157 : H7) (ICMSF, 1996) (Tableau 02).

Leur capacité à se développer à des températures inférieures à 15 °C a été récemment attribuée à des mécanismes génétiques spécifiques à certaines souches pathogènes, notamment O157 (Vidovic *et al.*, 2011).

## Chapitre 1/ Généralités sur les *Escherichia coli*

Le tableau 03 présente également les autres principales caractéristiques de croissance (pH,  $A_w$ , teneur en sel) de la majeure partie des souches d'*E. coli* O157: H7, le sérotype le plus étudié.

Par ailleurs, à ce jour, très peu de données sont disponibles pour les souches non O157 : H7, qui pourraient présenter des valeurs cardinales différentes (AFSSA, 2003).

**Tableau 03 : Caractéristiques de croissance d'*E. coli* O157 : H7 (Frank et al., 2011).**

Facteur environnementaux	Valeurs minimales	Valeurs optimales	Valeurs maximales
Température	6	40	45,5
pH	4,4	7	9
$a_w$	0,95	0,995	-
Na Cl (%)	-		8,5

### III. Réservoirs du germe

Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources d'infections à EHEC. Ainsi, il paraît évident que *E. coli* O157 : H7, et plus généralement les STEC, peuvent se transmettre par voie féco-orale et que la contamination se produit fréquemment par l'ingestion d'aliment ou d'eau souillée, par le contact direct avec les animaux, les humains porteurs, ou des objets contaminés. (Crump et al., 2002 ; Grant et al., 2008 ; Swerdlow et al., 1992)

#### III. 1 Les produits d'origine animale

##### III.1.1 Viandes et produits carnés

Les ruminants, notamment les bovins, sont considérés comme le principal réservoir des STEC O157 : H7 et non- O157 (majoritairement O5, O26, O103, O111, O118 et O145) (Duffy et McCabe, 2014). Plus de 120 sérogroupes de STEC ont été isolés du tube digestif du bovin. (Auvray et al., 2012).

Dans le tractus gastro-intestinal du bovin, la présence des STEC est transitoire et le portage est asymptomatique puisque les bovins ne possèdent pas le récepteur Gb3 des Shiga-toxines à la surface des cellules endothéliales intestinales et rénales (Hoey et al., 2002 ; Pruijboom-Brees et al., 2000).

Les petits ruminants, tels que les ovins et les caprins, constituent également un réservoir important de STEC O157 (La Ragione et al., 2009). En Europe, en 2015, la prévalence de



## *Chapitre 1/ Généralités sur les Escherichia coli*

STEC chez les ovins et les caprins était de 18,5% et 4,3% pour les STEC O157, respectivement (EFSA & ECDC, 2016).

Des études ont montré que les fèces et la viande de mouton constituaient un important réservoir de souches STEC pathogènes pour l'Homme (Duffy & McCabe, 2014).

Les élans et les bisons sont considérés comme des réservoirs de *STEC* puisque de nombreuses épidémies à *E. coli* O157 : H7 ont été associées à la consommation de viande de bison contaminée ou de fruits contaminés par des fèces d'élan (Persad et Le Jeune, 2014).

Les non ruminants ; Un portage de STEC ou de souches O157 a été observé chez les porcs, les chiens, les chats, les chevaux et les oiseaux. Les porcs sont connus comme étant des réservoirs de STEC et peuvent être colonisés par des souches *E. coli* O157. (Booher et al., 2002) (Tableau 04).

**Tableau 04: Tableau de synthèse Fréquences observées de viande contaminées par *E. coli* O157: H7 (Vimont, 2007).**

<i>E.coli</i> O157: H7	Pays	Aliment	N*	Fréquence (%)	Référence
	Royaume-Uni	Bœuf cru	3216	1,1	Chapman et al., 2000
	Argentine	Bœuf haché	160	3,8	Chinen et al., 2001
	Suisse	Bœuf haché	211	2,3	Fantelli et stephane, 2001
	France	Bœuf haché	3500	0,1	Vernozy-Rozand et al., 2002
	Etats-Unis	Bœuf haché	296	16,8	Samadpour et al., 2002
	Irlande	Bœuf haché	1533	2,8	Cagney et al., 2004
	Irlande	Minerai	1351	0,07 et 1,85	Carney et al., 2006
	Serbie	Bœuf haché	48	6,2	Nastasijevic et al., 2009
		Saucisse de bœuf	48	2,1	

\* Nombre de produits testés.

### III.2. Les produits laitiers

Les produits laitiers à base de lait cru sont considérés comme des produits à risque. En effet, le lait nécessaire à la fabrication peut être contaminé lors de la traite. Sans étape de destruction des bactéries comme une pasteurisation, ces bactéries peuvent se développer dans le lait. Ainsi, lors de l'étape de coagulation du lait par l'action de la présure et/ou des bactéries lactiques, la température ambiante avoisine les 37°C. A cette température, un grand nombre de bactéries se développent y compris les bactéries pathogènes (Maher *et al.*, 2001 ; D'Amico *et al.*, 2010). (Tableau 05).

### III.3. Filières agro-alimentaires

La consommation de viande de bœuf ou de préparations à base de viande de bœuf, *E. coli* O157 : H7 et les autres STEC sont introduits dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de carcasses contaminées provenant elles-mêmes d'animaux porteurs. La contamination des carcasses peut avoir lieu principalement aux moments du dépouillement des cuirs (potentiellement souillés par le pathogène) et de l'éviscération (le pathogène ayant pour réservoir principal le tube digestif des bovins). D'autre part, une inter-contamination des carcasses sur la chaîne d'abattage peut également se produire via les outils utilisés par les opérateurs. (Vimont, 2007).

La consommation de végétaux crus a été décrite comme étant un des modes de contamination de l'homme par les STEC et en particulier par *E. coli* O157: H7, les causes de contamination des cultures maraîchères mises en avant sont, le plus souvent, l'irrigation de ces cultures par de l'eau elle-même contaminée et l'épandage d'effluents d'élevage contaminés par les STEC. (Vimont, 2007).

**Tableau 05 : Fréquences observées de laits et fromages contaminés par des STEC. (Vimont., 2007).**

STEC	Pays	Aliment	N*	Fréquence (%)	Méthode utilisée	Référence
	France	Lait cru	205	21,5	PCR-ELISA	(Fach <i>et al.</i> , 2001)
		Fromage au lait cru	180	30,5		
		Fromage au lait pasteurisé	45	8,9		
	France	Fromage au lait cru	1039	13	PCR	(Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2002)

	Allemagne	Lait cru et lait certifié	273	3,9 et 2,1	VT-ELISA	(Klie et al., 1997)
	Hollande	Lait cru	1011	0	IMS	(Heuvelink et al., 1998)
	Angleterre	Lait cru Fromage ay lait cru	500 739	0 0	IMS	(Coia et al., 2001)
	Italie	Lait cru	100	0	EHEC-ELISA test	Massa et al., 1999

\* Nombre de produits testés

## IV. Modes de transmission

Les trois voies principales d'infection sont :

- (i) l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, (ii) la transmission de personne à personne et (iii) le contact direct avec les animaux et/ou l'environnement des fermes. (Figure 01).

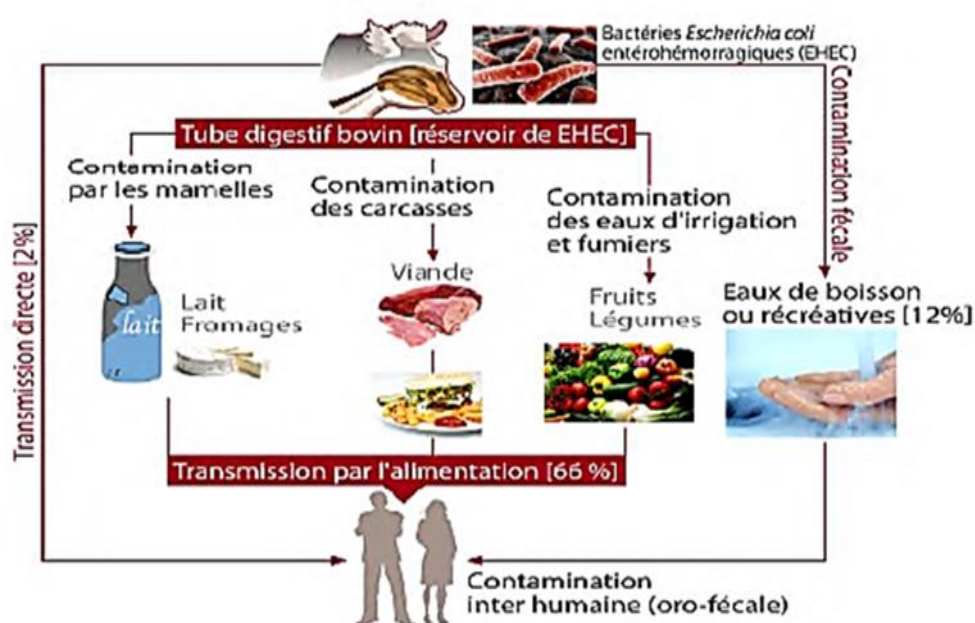


Figure 01 : Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal.

### IV.1 Transmission alimentaire

La majorité des infections est due à l'ingestion d'aliments contaminés. La viande de bœuf constitue la principale source de contamination suite à une cuisson insuffisante qui ne

## *Chapitre 1/ Généralités sur les Escherichia coli*

permet pas d'atteindre à cœur une température suffisante pour éliminer les bactéries pathogènes (Samadpour et *al.*, 2002).

Les résultats des enquêtes ont montré que les viandes de bœuf crues ou insuffisamment cuites, les viandes hachées (Paton et *al.*, 1996), le lait non pasteurisé et les produits laitiers (fromage au lait cru, fromage frais), les produits fermentés (saucisse sèche fermentée), le cidre, l'eau de boisson, la consommation d'eau contaminée (eaux de puit, eaux de source privée, eaux de distribution non traitées) (Jones and Roworth, 1996), les légumes crus comme les germes de luzerne aux Etats-Unis (Breuer et *al.*, 2001) sont des vecteurs des STEC.

### **IV.2. Transmission interhumaine**

La transmission inter-humaine dans la famille ou dans la collectivité est considérée comme un facteur de risque de survenue des infections à STEC notamment chez les enfants de moins de 15 ans. Des cas de transmission de personne à personne, par contact rapproché avec une ou des personnes ayant eu de la diarrhée, ont été observés en milieu familial (Vaillant et Espié, 2003). Cette transmission est d'autant plus importante que l'hygiène générale et plus particulièrement celle des mains est insuffisante et que les contacts sont étroits. De ce fait, la contamination féco-orale est une réelle préoccupation dans les crèches ou les divers centres de soins (hôpitaux, maisons de retraites) (Belongia et *al.*, 1993).

### **IV.3 Transmission par contact avec animaux et environnement de ferme**

La transmission de STEC à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme, porteurs de bactéries ou leur environnement contaminé (leurs déjections), a été à l'origine d'infections humaines sporadiques (Heuvelink et *al.*, 2002) et également d'épidémies (Crump et *al.*, 2002).

Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à EHEC. Les fermes pédagogiques, les parcs zoologiques et aires d'attraction, abritant des animaux porteurs de STEC sont des facteurs de risque importants pour les infections à STEC.

A cet effet, des guides et des recommandations sont préconisés pour prévenir les cas d'infections dans ces pays (Center for disease control outbreaks of *Escherichia coli* O157 : H7 2001).

## **V. Les facteurs de virulences**

### **V.1 La lésion d'attachement-effacement**

La colonisation du tube digestif par les EHEC est une étape majeure de la physiopathologie et s'accompagne du développement de lésions spécifiques des entérocytes

## Chapitre 1/ Généralités sur les *Escherichia coli*

dites d'attachement-effacement (A/E), qui se limitent au côlon et au caecum. Les lésions A/E, d'abord décrites chez le pathovar *E. coli* entéropathogène (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 (AFSSA., 2003 ; Donnenberg et Kaper., 1992). Un piédestal, constitué d'actine cellulaire, sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon très étroite, est alors constitué. (Voir annexe 02)

Le criblage d'une banque de mutants a permis de mettre en évidence *in vitro* les gènes impliqués dans ce phénomène (Donnenberg et *al.*, 1989). Le premier gène identifié fut le gène *eae* pour « *E. coli* attaching effacing ». Il code pour une protéine de membrane externe de 94 à 97 kDa (selon les souches) appelée l'intimine pour son implication dans l'attachement intime de la bactérie aux cellules épithéliales (Jerse et *al.*, 1990). Tous ces gènes sont regroupés au sein d'un îlot de pathogénicité appelé LEE pour «Locus of Enterocyte Effacement» (Mc Daniel et *al.*, 1995). Un îlot de pathogénicité est un ensemble de gènes regroupés en un endroit précis du génome et qui sont impliqués dans la pathogénicité de la bactérie.

### **Locus d'effacement des entérocytes (LEE)**

Les gènes responsables des lésions A/E sont portés par le locus chromosomique LEE, codant un système de sécrétion particulier, le système 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 membrane externe de 94 Kda appelée intimine (Jerse et *al.*, 1991). Plusieurs variants d'intimine ont été identifiés. Ces différents variants seraient impliqués dans le tropisme cellulaire, la spécificité d'hôte et donc dans le pouvoir pathogène des EHEC. Certains variants sont également retrouvés dans des souches EPEC (AFSSA., 2003 ; Oswald et *al.*, 2000).

- Le gène *tir* code le corécepteur spécifique de l'intimine, Tir (Translocated intimin receptor), une protéine de 78 kDa injectée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote grâce à un système de sécrétion de type III. Tir s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique de l'entérocyte (AFSSA., 2003).
- Les gènes *esp* (EPEC-secreted protein) codent pour une seringue moléculaire (*espA*, *espB*, *espD*) impliquée dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (Tir, *map*, *espF*, *espG*, *espH*...) (AFSSA., 2003).
- Le système de sécrétion de type III : les protéines Esp ne comportant pas de séquence signal, leur sécrétion a été attribuée au système de type III dont les gènes sont également portés par le LEE. Le mécanisme d'activation du système de sécrétion de type III reste mal

connu, de même que les transductions de signaux responsables du réarrangement du cytosquelette des cellules hôtes (AFSSA., 2003).

### V.2 les shigatoxines

Les (Stx) sont considérées comme le principal facteur de virulence des EHEC. Les toxines Stx sont également connues sous le nom de Vérotoxines en raison de leur cytotoxicité sur les lignées cellulaires Vero.

La pathogénicité des EHEC dépend de la production des toxines Stx qui sont responsables des effets cliniques, notamment les colites hémorragiques et le SHU. Les toxines Stx sont des exotoxines présentant une parenté avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae* de type I. Elles ont été classées en deux groupes majeurs : Stx1 et Stx2 (Kruger & Lucchesi, 2015). D'autres espèces bactériennes comme *Acinobacter haemolyticus*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae* produisent également les toxines Stx (Scheutz et al., 2012).

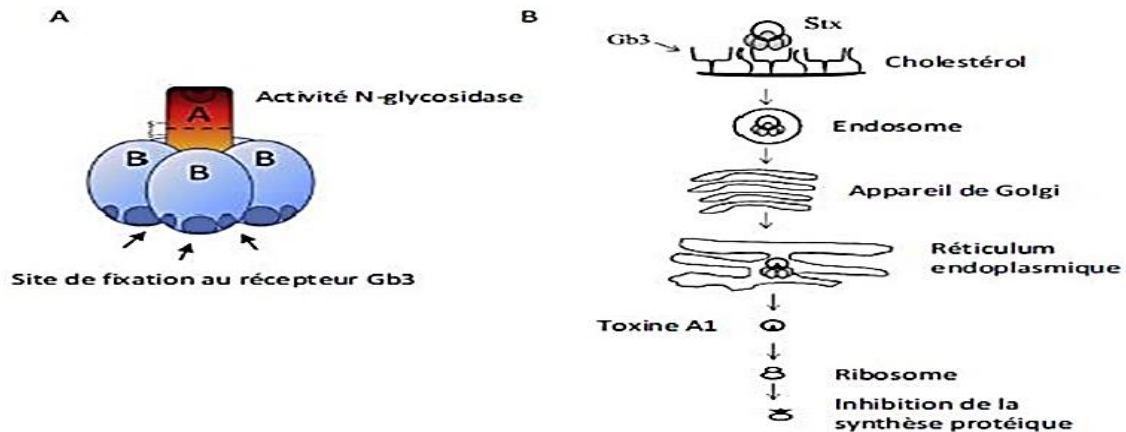
#### V.2.1 Les phages stx

Les gènes codant Stx1 et Stx2 sont portés par des phages distincts ayant un processus d'induction similaire (Mellies et al., 2014). Au stade lysogénique, le phage stx est intégré dans le chromosome bactérien sous la forme d'un prophage et l'expression des gènes stx est inhibée. Dans le chromosome bactérien, les phages stx peuvent s'insérer au niveau d'un site préférentiel unique ou d'autres sites d'intégration secondaires (Serra-Moreno et al., 2007). Dans certaines conditions, le prophage est induit (stade lytique) et les gènes portés par le phage sont exprimés. (Wagner et al., 2001 ; 2002).

Les phages stx représentent des éléments génétiques mobiles et sont considérés comme vecteurs des gènes stx. La transmission des phages stx peut avoir lieu au cours du transit intestinal mais aussi dans l'eau, les aliments, via les fèces ou encore les biofilms (Imamovic et al., 2009 ; Solheim et al., 2013).

#### V.2.2 Structure et mode d'action des Shiga-toxines

Les toxines Stx sont composées d'une sous-unité A liée de façon non covalente à 5 sous-unités B identiques formant un pentamère (protéine de type AB<sub>5</sub>) (Figure 02). La sous-unité A est composée de deux parties, A1 et A2, reliées entre elles par un pont disulfure. Le peptide A1 possède l'activité enzymatique N- glycosidase alors que les sous-unités B permettent l'interaction de la toxine avec son récepteur, le globotriaosylcéramide Gb3 présent à la surface des cellules endothéliales de l'intestin, du rein et du cerveau chez l'homme (Bauwens et al., 2013). Pour exercer son activité N- glycosidase, le peptide A1 doit être libéré dans le cytosol de la cellule cible.



**Figure 02 : Structure (A) et mode d'action des Shiga-toxines (B),**  
Adaptée de Bryan *et al.* (2015) ; Melton-Celsa (2014).

Bien que la protéine Stx2 ne présente que 60% d'homologie avec Stx1, les deux toxines ont un mode d'action identique (Melton-Celsa, 2014 ; Sandvig *et al.*, 2010). Au niveau du site de colonisation intestinal des EHEC, les toxines Stx sont relarguées lors de la lyse bactérienne et rejoignent la circulation sanguine par translocation des cellules épithéliales intestinales, dépourvues de Gb3, du pôle apical vers le pôle basal sans activité cytotoxique. Les toxines Stx atteignent les cellules endothéliales cibles du côlon, du rein et du cerveau et se fixent sur le récepteur Gb3 (O'Loughlin & Robins-Browne, 2001). Après fixation de la toxine au récepteur Gb3, le complexe Stx/Gb3 est internalisé dans la cellule cible par un mécanisme d'endocytose puis fusionne avec l'endosome (Figure 02). Le complexe rejoint l'appareil de Golgi puis le réticulum endoplasmique (R.E) par un transport rétrograde (Sandvig *et al.*, 2010). Dans le RE, le pont disulfure entre les peptides A1 et A2 est réduit et seul le peptide A1 est libéré et quitte le R.E pour atteindre l'enveloppe nucléaire puis les ribosomes cibles. L'activité N- glycosidase du peptide A1 retire un résidu adénine de l'ARN ribosomique 28S du ribosome 60S, ce qui entraîne la dissociation du ribosome avec le facteur d'élongation 1, conduisant à l'inhibition de la synthèse protéique (Spooner *et al.*, 2012). Il a également été montré que les toxines Stx sont capables d'induire l'apoptose de différents types cellulaires (Tesh, 2010).

### V.3 L'entérohémolysine E-hlyA

Différentes entérohémolysines ont été retrouvées chez les EHEC dont E-hlyA, codée par le gène ehxA, provoquant la lyse des érythrocytes. Homologue de l' $\alpha$ -hémolysine d'*E. coli* K12, E-hlyA s'insère dans la membrane cytoplasmique où elle forme des pores ce qui provoque la lyse osmotique des cellules. Le fer libéré par les érythrocytes favoriserait la

## Chapitre 1/ Généralités sur les *Escherichia coli*

prolifération des EHEC. Mais tous les EHEC isolées de patients ne sont pas forcément hémolytiques. (Pradel et al., 2008).

### V.4 Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence potentiels, codés par des gènes présents sur le chromosome ou sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages ou îlots de pathogénicité) ont été décrits chez les souches EHEC (Gyles, 2007 ; Afssa., 2003 ; Croxen et Finlay,2010). Ils regroupent en particulier :

Des toxines, telles que l'entérohémolysine (Ehx), l'entérohémolysine thermostable EAST1, la cytotoxine subtilase (SubAB), les cyclomodulines CDT (Cytolethal distending factor) et Cif (Cycle inhibiting factor) ;

Des protéases, telles que la catalase peroxydase KatP, la métalloprotéase StcE ; la sérine protéase EspP qui est capable de cliver le facteur V de coagulation humaine contribuerait au développement des colites hémorragiques observées chez les patients.

Des systèmes de captation du fer, retrouvés chez les *E. coli* responsables d'infections intestinale et extra-intestinales.

Des systèmes de résistance à l'acidité gastrique. Cependant, le rôle respectif de ces facteurs de virulence potentiels dans la pathogénie des EHEC n'est pas encore démontré. (Croxen et Finlay,2010).(Tableau 06)

**Tableau 06 : Facteurs de virulence intervenant dans le pouvoir pathogène des *Escherichia coli* entérohémorragiques. (Gouali et Weill., 2013).**

Facteur de virulence	Support génétique	Protéine/Gène	Mécanisme d'action
Facteurs d'adhésion	Système de sécrétion de type III Locus d'effacement des entérocytes (LEE)	Gènes Gène eae Tir Esp	Adhésion aux entérocytes
Shiga-toxines	Stx Stx1 Stx2 Stx2c/d Stx2e/f		Fixation à la membrane cytoplasmique. Internalisation par un mécanisme d'endocytose. Activité N-glucosidase sur la sous-unité 28S du ribosome.



## *Chapitre 1/ Généralités sur les Escherichia coli*

			Blocage de la sous-unité 60S du ribosome et arrêt de la synthèse protéique.
Facteurs plasmidiques	Gène ehxA	Hémolysine HlyA	Insertion dans la membrane. Cytoplasmique, activité cytolytique par formation de pores entraînant une lyse osmotique des cellules et une libération de fer des érythrocytes.
Autres facteurs plasmidiques	Gène Esp. Pepsine A. Catalase peroxydase périplasmique KatP Toxine type Clostridium difficile-like. Système de sécrétion de type II.	Sérine protéase	Clivage du facteur V de coagulation responsable de la survenue de colites hémorragiques.
Autres facteurs	Gène AstA. Système oxydatif, glutamate dépendant Gène rpoS.	Protéine EAST1	Rôle dans l'induction de la phase. Initiale de la diarrhée aqueuse. Résistance à l'acidité gastrique (pH < 2,5). Salinité. Chaleur.

### **VI. Pathologies liées aux EHEC**

Chez l'homme, après ingestion d'une dose infectieuse faible (inférieure à 100 unités formant colonies) (Caprioli et *al.*, 2005) ; et après une incubation de 3 à 4 jours (pouvant aller jusqu'à 10 jours), les infections à EHEC peuvent se manifester sous plusieurs aspects, allant de la diarrhée bénigne à des colites hémorragiques (Caprioli et *al.*, 2005).

Ces dernières, se compliquent parfois au bout de quelques jours, chez l'enfant et le sujet âgé en particulier, par un syndrome hémolytique urémique (SHU) ou un purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) chez l'adulte (Bouvet et *al.*, 2003).

### **VI.1 Colite hémorragique :**

La colite hémorragique, est la principale manifestation clinique de l'infection par les souches EHEC (Serra-Moreno et *al.*, 2007). Elle survient généralement, après une période d'incubation variant de 3 à 7 jours (Elliott et *al.*, 2001). Elle se caractérise par de violentes crampes abdominales, accompagnées d'une diarrhée aqueuse, devenant, dans 90% des cas, sanglante après 24 à 72 h d'évolution (Ochoa et *al.*, 2003). Le patient ne présente généralement pas, ou peu d'hyperthermie (Wong et *al.*, 2000). Des nausées, des vomissements, des céphalées et des frissons ont également été rapportés, mais leur fréquence est plus faible (Serra- Moreno et *al.*, 2007). La diarrhée sanglante, est retrouvée dans 90% des cas diagnostiqués. Mais l'infection par des EHEC peut être plus discrète, et certains patients développent des SHU sans avoir présenté de diarrhée prodromique (Ochoa et *al.*, 2003).

### **VI.2 Le Syndrome hémolytique et urémique (SHU) :**

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) a été décrit pour la première fois en 1955 par Gasser et *al.*, (1955).

Le SHU causé par les Shiga-toxines est caractérisé par la lésion histologique de microangiopathie thrombotique correspondant à des lésions endothéliales conduisant à une agrégation plaquettaire diffuse puis à l'occlusion des lumières artériolaires (Tarr et *al.*, 2005).

Le SHU est une complication de la diarrhée sanglante, qui touche surtout l'enfant de Moins de 3 ans et survient généralement après une diarrhée prodromique sanglante. Ce n'est qu'en 1983 que Karmali et *al.*, (1983) établissent la relation entre une infection intestinale à STEC et la survenue d'un SHU. L'apparition du SHU se fait en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs. Le SHU post-diarrhée représente environ 90 % des cas de SHU de l'enfant et constitue la première cause d'insuffisance rénale du nourrisson.

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Siegler, 1995 ; Siegler & Oakes, 2005). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès (Decludt et *al.*, 2000).(Figure03).

### **VI.3 Le Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)**

Le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) est une entité clinique décrite pour la première fois en 1925. Comme pour le SHU, l'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, auto-immune.), et la relation entre l'infection par *E. coli* O157 : H7 et l'apparition de ce syndrome est récente (Kovacs et *al.*, 1990).

Le PTT est rare et survient le plus souvent chez l'adulte (pic de fréquence chez les femmes autour de 40 ans). Il est exceptionnel chez l'enfant et la personne âgée. Le PTT se

caractérisé par une anémie hémolytique micro-angiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, une atteinte neurologique prédominante (modifications du comportement, paresthésie, aphasie, troubles visuels, coma) et des anomalies rénales inconstantes (insuffisance rénale présente dans environ la moitié des cas) (Tarr et *al.*, 2005).

Le PTT dure habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais il peut parfois évoluer pendant des mois. Lorsque la maladie progresse et atteint le système nerveux central et les reins, elle peut être fatale (Bouvet et *al.*, 2003; Nangaku et *al.*, 2007).

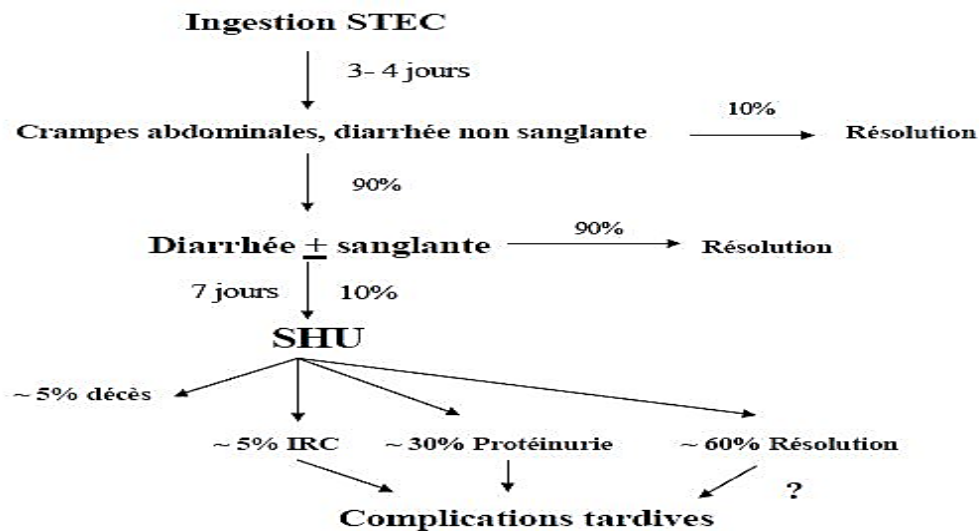


Figure 03: Évolution clinique des infections à *E. coli* entérohémorragique (AFSSA., 2003).

**EHEC:** *E. coli* entérohémorragique; **IRC:** insuffisance rénale chronique;

**SHU:** Syndrome hémolytique et urémique.

## VII. Traitement du syndrome hémolytique et urémique et du purpura thrombotique Thrombocytopénique

Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la mise en route d'une nutrition parentérale qui permet, à la fois, de compenser les pertes hydriques dues à la diarrhée et de soutenir la fonction rénale. L'administration d'antibiotiques est très controversée car elle augmenterait le risque de développement d'un SHU en favorisant la production et la libération des toxines bactériennes. La plupart des patients oliguriques ou anuriques doivent être dialysés. Les transfusions plaquettaires sont indiquées en cas d'hémorragies. Le taux de mortalité en phase aiguë de SHU est actuellement inférieur à 5%. Malgré une guérison apparente, la plupart des patients sont susceptibles de développer des complications tardives notamment au niveau rénal. Ainsi, les patients ayant eu un SHU avec une anurie de plus d'une semaine doivent faire l'objet d'une surveillance à très long terme. (Gouali et Weill., 2013)

*Chapitre 2 :*

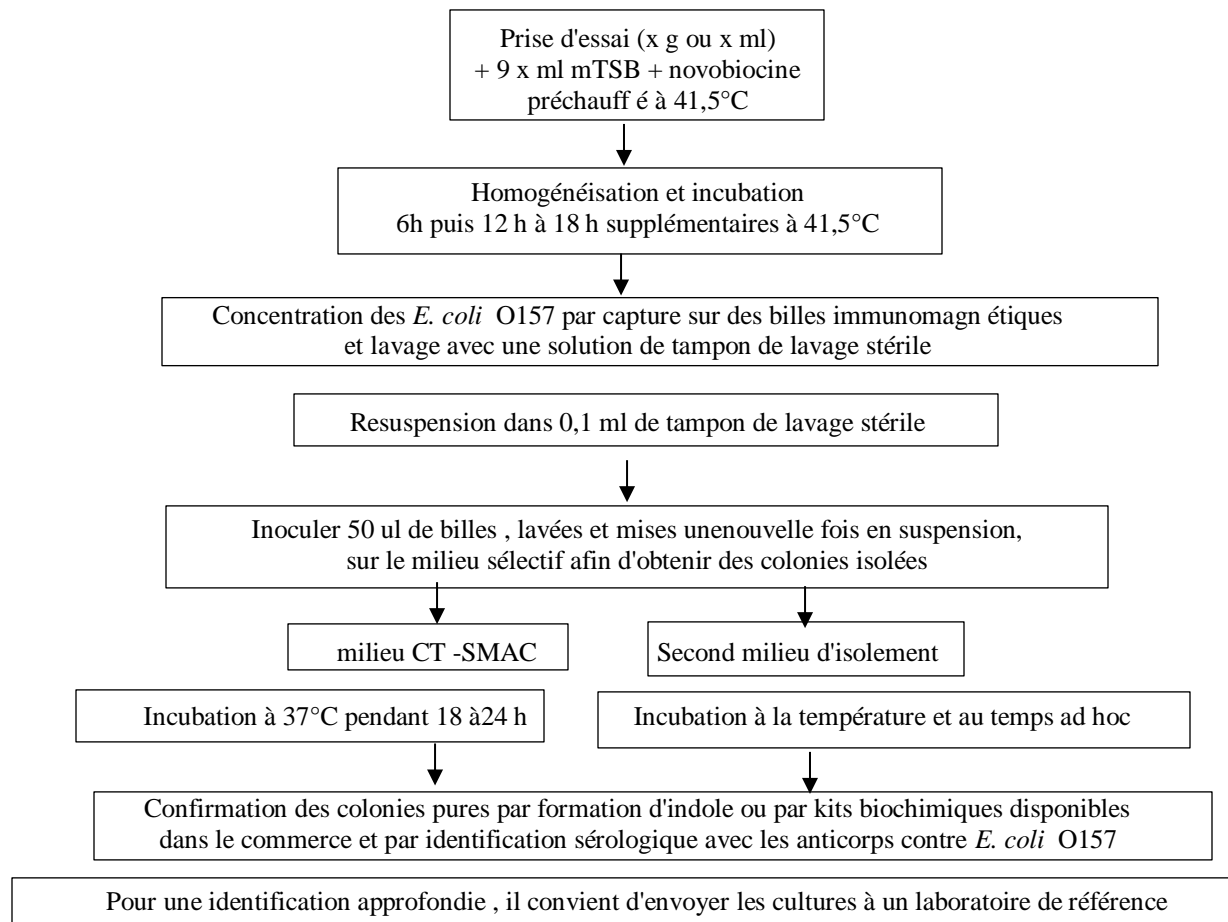
Méthodes de détection  
de E.coli O157 :H7

## I. Méthodes de dénombrement des *E. coli* O157 : H7

### I.1. Protocole de recherche de *E. coli* O157: H7 dans les aliments

Comme toute méthode classique d'isolement de bactéries pathogènes à partir d'un aliment, le protocole inclut:

- une étape d'enrichissement en bouillon pour revivifier et multiplier les bactéries stressées de l'aliment;
- une étape d'enrichissement spécifique ou d'immuno-concentration pour sélectionner la bactérie recherchée;
- un étalement sur milieu sélectif et une confirmation biochimique ou immunologique des colonies caractéristiques (**figure 04**).



**Figure 04:** Schéma de la détection et de l'identification de souches STEC O157 à partir d'aliments (norme ISO 16.154).(Vimont., 2007).

### I.1.1. Etape d'enrichissement

Comme la dose infectieuse est basse, de nombreux milieux d'enrichissement ont été étudiés pour permettre aux cellules bactériennes de se multiplier jusqu'à des niveaux détectables et souvent de supprimer la croissance des bactéries Gram positif et en grande partie des Gram négatif telles que *Proteus spp* et *Aeromonas spp*.

Parmi ceux utilisés pour la détection des STEC O157, le Bouillon Trypticase Soja modifié (mTSB) additionné de novobiocine ou d'acriflavine pour réduire le nombre de microorganismes à Gram positif.(voir l'ANNEXE 06). Un autre milieu décrit est constitué d'eau peptonnée tamponnée additionnée de vancomycine, de cefsulodine et de cefixime pour inhiber la croissance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif comme *Aeromonas spp*. Et *Proteus spp* (Weagant et Bound, 2001)

Beaucoup d'études entreprises, recommandent d'incuber le milieu d'enrichissement à une température proche de 42°C (Ogden *et al.*, 2001) pendant une courte durée (6 heures). Bolton *et al.*,(1999). ont recommandé pour la détection des STEC O157 dans les viandes, le bouillon mTSB incubé à 42°C pendant 6 heures comme milieu d'enrichissement suivi d'une étape d'enrichissement immunomagnétique et d'un isolement sur milieu CT- SMAC incubé à 42°C. Ce dernier milieu a l'avantage d'inhiber la multiplication des autres bactéries sorbitol négatives comme *Hafnia alvei*.

Cette dernière méthode a été reprise dans la norme ISO16654 (ISO, 2001). (voir figure ANNEXE 03)

### I.1.2. Etape de séparation-concentration

Dans le but de réduire la durée des analyses microbiologiques, des techniques de type séparation /concentration ont été développées. Ces techniques sont représentées par la centrifugation, la filtration, des systèmes bio-absorbants à base de lectine augmentant la sensibilité de la détection. La technique la plus efficace est la séparation immuno-magnétique qui est techniquement simple à réaliser et spécifique pour l'isolement de STEC O:157 (Vernozy-Rozand, 1999; Vernozy Rozand *et al.*, 1997).

Après enrichissement, les billes sont généralement mises en culture sur des milieux sélectifs. Bennet et collaborateurs (1996) ont prouvé que les systèmes de séparation concentration immunomagnétique (Dynabeads anti *E.coli* O157, Dynal Ltd, UK) repris dans la norme ISO16654 (ISO, 2001).

### I.1.3. Détection d'*E. coli* O157 sur milieux sélectifs

Après enrichissement, les billes magnétiques ou les bactéries du bouillon d'enrichissement sont étalées et mises en culture sur des milieux sélectifs. Comme les STEC O157 ne fermentent pas le sorbitol à l'opposé des autres *E. coli*, le milieu de base utilisé est le milieu Mac-Conkey au sorbitol (SMAC).

Des modifications de la gélose SMAC (ajout de cefixime et de tellurite : milieu CT-SMAC) ont été mises au point pour augmenter le caractère sélectif vis à vis des STEC O157 (Zadik *et al.*, 1993). D'autres milieux d'isolement sélectif et sensible comme le "Rainbow agar O157" ont été testés en combinaison avec des méthodes génétiques (PCR) pour détecter les souches de STEC O157 dans les échantillons de viandes (Radu *et al.*, 2000).

De nombreux milieux chromogènes ont été mis au point, deux sont spécifiques du sérotype O157:H7 (chromagar *E. coli* O157:H7 et O157:H7 ID), les EHEC O157 :H7 donnent des colonies mauves sur le milieu chromagar *E. coli* O157:H7. (AFSSA, 2003). L'utilisation de ces milieux pour la détection des *E. coli* O157 fermentant le sorbitol est recommandé (De Boer et Heuvelink, 2000).

## II. Méthodes immuno-biochimiques pour recherche des O157 : H7

Après isolement, différentes méthodes ont été développées pour détecter les STEC généralement et les STEC O157:H7 à partir de matrices plus ou moins complexes. Ces différentes techniques peuvent être classées en méthodes phénotypique ou biochimiques, immunologiques et méthodes génétiques. Un accent particulier sera également mis sur les limites de ces méthodes ainsi que sur l'émergence de méthodes nouvelles et originales. (Vimont, 2007)

### II.1. Méthodes biochimiques de détection et d'isolement de *E. coli* O157:H7

#### II.1.1. Utilisation des propriétés biochimiques de *E. coli* O157:H7

La plupart des réactions biochimiques de *E. coli* O157:H7 sont typiques des STEC et répondent au test IMVIC (indole, rouge de méthyl; Voges-Proskauer; citrate) à l'exception toutefois de la fermentation du sorbitol et de l'activité  $\beta$ -glucuronidase (Lingwood *et al.*, 1987). Environ 93 % des souches de *E. coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures ; à l'inverse, *E. coli* O157: H7 ne fermente pas le sorbitol (Neaves *et al.*, 1994). Néanmoins, il a été montré dans diverses études que des souches STEC du sérotype O157:H7 étaient capables de fermenter le sorbitol en 24 heures (Morgan *et al.*, 1993; Moxley et Francis, 1986; Wilson *et al.*, 1992). La prévalence de ces souches particulières est actuellement peu connue mais il apparaît

## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

évident que de telles souches ne peuvent être mises en évidence par les méthodes officielles de contrôle des aliments, telles qu'elles seront décrites dans ce chapitre.

En outre, 93 % des *E. coli* sont  $\beta$ -glucuronidase positives, à l'inverse, la grande majorité des STEC O157 ne produisent pas de  $\beta$ -glucuronidase (Tesh *et al.*, 1991).

Toutes ces caractéristiques biochimiques particulières ont été ré-utilisées dans la conception de divers milieux sélectifs pour l'isolement du sérotype O157: H7.

L'absence de fermentation du sorbitol, par exemple, justifié l'utilisation de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC) ont été mises au point dans l'objectif d'augmenter le caractère sélectif vis-à-vis de O157: H7. Ainsi, Okrend *et al.*, (1990), Tesh *et al.*, (1991) ont montré que l'addition de 5 bromo-4 chloro-indoxy- $\beta$ -D-glucuronide (BCIG) ajouté à raison de 0,1 g/L à une gélose SMAC favorise l'isolement de *E. coli* O157 inoculé volontairement dans des échantillons de viande de boeuf. En effet, le BCIG permet de différencier les colonies  $\beta$ -glucuronidase positives de celles qui sont négatives. *E. coli* O157:H7 présente des colonies sorbitol négatives et  $\beta$ -glucuronidase négatives ; ces colonies restent blanches alors que les colonies sorbitol négatives et  $\beta$ -glucuronidases positives virent au vert ou au bleu. L'ajout du BCIG à la gélose SMAC réduit par conséquent le nombre de faux positifs de 36 % par rapport à la simple utilisation du SMAC sans BCIG. En effet, *E. coli* O157:H7 a pu être isolé à partir de 11 des 12 échantillons de viande inoculés utilisant le SMAC-BCIG contre 8 sur 12 avec la seule utilisation du SMAC sans BCIG. Enfin, Zadik *et al.*, (1993) ont décrit l'intérêt d'ajouter du tellurite et de la céfixime à cette gélose SMAC (CT- SMAC), étant donné des concentrations minimales inhibitrices (CMI) plus élevées pour les STEC O157 que pour les autres *E. coli* (Pour inhiber les autres *E. coli* + tellurite et céfixime comme agents sélectifs) et les bactéries sorbitol négatives comme *Aeromonas* et *Plesiomonas*. Néanmoins, des souches de *E. coli* O157: H7 sensibles à certaines concentrations de tellurite ont été décrites par Karch *et al.*, (1996) et l'utilisation de la gélose CT-SMAC dans ce cas précis s'avère inadaptée.

De plus, Thomson *et al.* (1990) ont développé un test rapide fluorescent pour la détection de *E. coli* O157.

Ce test utilise le 4-méthylumbelliféryl  $\beta$ -D-glucuronide (MUG) comme indicateur hydrolysé en un composé fluorescent par l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase (Rippey *et al.*, 1987). De nombreux milieux chromogènes ont par ailleurs été mis au point comme par exemple les milieux



## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

CHROMagar *E. coli* O157:H7 (chromagar) et O157:H7 ID (bio Mérieux) spécifiques du sérotype O157:H7.

Les méthodes biochimiques sont intéressantes et fondamentales pour la détection de *E. coli* O157:H7 mais restent inadaptées à la détection des souches « mutantes » du sérotype O157: H7 et surtout à la détection des STEC non-O157:H7, étant donné l'absence de propriété biochimique commune à tous les STEC. (Okrend *et al.*, 1990, Tesh *et al.*, 1991)

### II.1.2. Méthode de confirmation par agglutination phénotypique

Cette méthode consiste en un test d'agglutination latex réalisé directement sur la colonie suspecte pour vérifier la présence de l'antigène somatique O157. L'identification de l'espèce par utilisation des galeries Api permet de vérifier qu'il s'agit de l'espèce *E. coli*. Enfin, il faut contrôler la présence du flagelle H7. Cette étape exige l'ensemencement de la souche étudiée sur une gélose-mobilité (3 repiquages sont nécessaires) de manière à favoriser la synthèse du flagelle avant son sérotypage à l'aide d'anticorps anti H7. Ces étapes de confirmation prennent de 3 à 4 jours en fonction du délai de reprise de mobilité de la souche (AFSSA, 2003).

Cette méthode est simple d'utilisation mais longue et par conséquent peu conciliable avec les exigences des industriels de l'agro-alimentaire.

## II.2. Méthodes immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7

Il existe actuellement sur le marché un grand nombre de tests permettant la détection de *E. coli* O157: H7 dans les aliments et/ou dans les échantillons environnementaux. Ces systèmes comprennent des tests conventionnels ELISA en microplaques, des systèmes immunologiques en une étape et des systèmes complètement automatisés (ANNEXE 04). Ces tests sont nombreux, mais compte-tenu de leur sensibilité, ils doivent être précédés d'une phase d'enrichissement, le fait que la dose infectieuse de *E. coli* soit considérée comme basse, a obligé les chercheurs à développer de nombreux milieux d'enrichissement pour permettre aux cellules bactériennes de se multiplier jusqu'à des niveaux détectables (Taylor, 1990; USDA, 1993; Weagant *et al.*, 1994).

### II.2.1. Systèmes immuno-chromatographiques et systèmes ELISA

Ces méthodes immunologiques donnent un résultat en 15 minutes (test "une étape", immuno-chromatographique) ou en 2 heures (système ELISA microplaques) après une phase d'enrichissement (le plus souvent d'une durée de 24 heures). La préparation de l'échantillon et les phases d'enrichissement varient d'un kit immunologique à autre.

## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

Les méthodes immunologiques en "une étape" sont très employées par les industriels du fait de leur rapidité d'exécution et de leur simplicité. En effet, les étapes de lavage-rinçage et d'addition de plusieurs réactifs ne sont pas nécessaires avec ces kits. Une grande partie de ces systèmes est basée sur le principe d'immuno-chromatographie. Le dispositif consiste en un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques de *E. coli* O157:H7 (i.e. O157 et éventuellement H7), un puits pour l'échantillon et une fenêtre de test et de contrôle. (AFSSA, 2003)

Une aliquote du bouillon d'enrichissement (généralement 100 µl) est placée dans le puits destiné à l'échantillon alimentaire 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 de *E. coli* O157 dans l'aliment. On peut citer en exemple le test validé AOAC « VIP EHEC » (BioControl, Montesson, France) qui permet, après un enrichissement de 18h (8h pour la matrice steak haché), de visualiser (en 10 minutes) si un échantillon donné est contaminé ou non par *E. coli* O157:H7 (figure 05).

Pour les systèmes ELISA, les anticorps spécifiques de *E. coli* O157:H7 sont fixés au fond des puits de microplaques. L'aliquote du bouillon d'enrichissement est déposée dans ces puits. Après incubation et une série de lavages, un anticorps "révélateur" anti-O157 est ajouté pour détecter le couple anticorps-bactéries. Ce deuxième anticorps est couplé à une enzyme qui permet une révélation colorimétrique.(AFSSA, 2003)

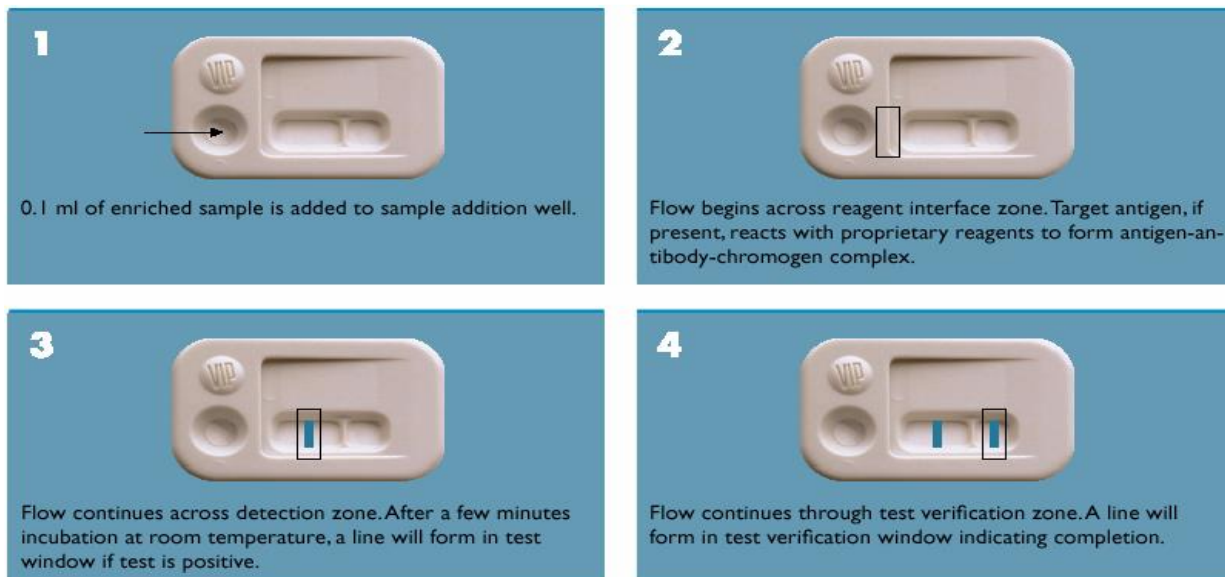


Figure 05: VIP test, test immunologique en «1 étape».(Vimont, 2007)

## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

### II.2.2. Systèmes automatisés/ ELFA

L'éventail des méthodes immunologiques totalement automatisées est beaucoup plus restreint (Annexe 04). Il a été choisi ici de présenter le système VIDAS *E. coli* O157 (VIDAS ECO) qui a été utilisé par la suite dans l'étude sur l'optimisation de la recherche des STEC O:157 dans le steak haché. Le VIDAS ECO est un test immunoenzymatique permettant la détection d'antigènes somatiques O157 par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS. Ce système permet de détecter *E. coli* O157 dans les aliments après un double enrichissement de 30 heures (Figure 07). 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 (Figure 06) .

Une aliquote de 500 µl de bouillon d'enrichissement placée dans la barrette subit des cycles d'aspiration-refoulement. Les antigènes somatiques O157 potentiellement présents dans ce bouillon sont alors captés par les anticorps du cône. Les éléments restés libres sont ensuite éliminés grâce à plusieurs lavages (Vimont, 2007).

En phase finale, des anticorps marqués à la phosphatase alcaline sont aspirés et refoulés dans le cône et vont ensuite se fixer sur les antigènes O157, eux-mêmes fixés sur les anticorps de la paroi du cône. De nouvelles étapes de lavage éliminent les conjugués non fixés. Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyle ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-méthyl-ombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm.

Cet automate peut réaliser jusqu'à 30 analyses simultanément et permet de réaliser d'autres recherches de pathogènes et/ou toxines (e.g. *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, entérotoxine staphylococcique) (Vimont, 2007).

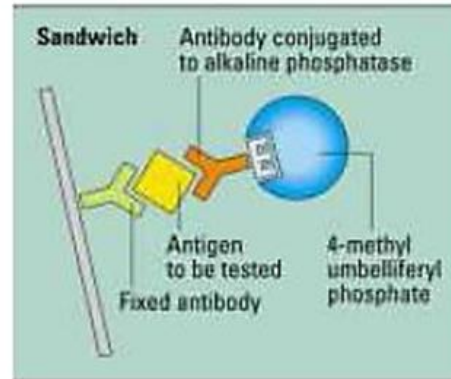
L'ensemble des systèmes décrits précédemment (systèmes en microplaques, en une étape ou automatisés) permet aux industriels de l'agroalimentaire un contrôle "présomptif" de la présence de *E. coli* O157:H7 dans les aliments analysés. En effet, les kits décrits précédemment ne recherchent que l'antigène somatique O157 (parfois associé à l'antigène H7). Même les systèmes qui affichent une spécificité totale pour *E. coli* O157: H7 donnent en fait des résultats positifs pour des *E. coli* O157 non-H7. Un résultat positif de l'un de ces tests immunologiques signe seulement la présence de l'antigène cible (le plus souvent, il s'agit de l'antigène somatique

## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

(O157). Une présentation des deux protocoles actuellement validés par l'AFNOR pour la recherche de *E. coli* O157:H7 dans les aliments (détection et isolement des colonies suspectes) fait l'objet du paragraphe suivant (Vimont, 2007).



**Figure 06 : Automate VIDAS avec des cônes et des barettes (SAVOYE, 2011)**



**Figure 07 : Principe du VIDAS (SAVOYE, 2011)**

### II.2.3. Tests immunologiques validés AFNOR de détection des *E. coli* O157:H7

Pour la détection de *E. coli* O157:H7 dans les aliments, deux méthodes validées AFNOR existantes, intègrent une phase d'immunoconcentration qui permet d'extraire et/ou de concentrer la bactérie cible du bouillon d'enrichissement. En effet, un isolement direct sur une gélose à partir du bouillon d'enrichissement donnerait des boîtes trop chargées pour lesquelles le repérage des colonies suspectes serait difficile. (AFSSA, 2003)

Ces deux techniques ont pour but d'optimiser l'étape d'isolement de la bactérie cible sur une gélose spécifique en la séparant de la matrice alimentaire et du reste de la microflore.

Parmi ces méthodes d'immunoconcentration, on trouve l'immunoséparation magnétique (IMS) et l'immunoconcentration automatique (ICE) permise par le VIDAS.

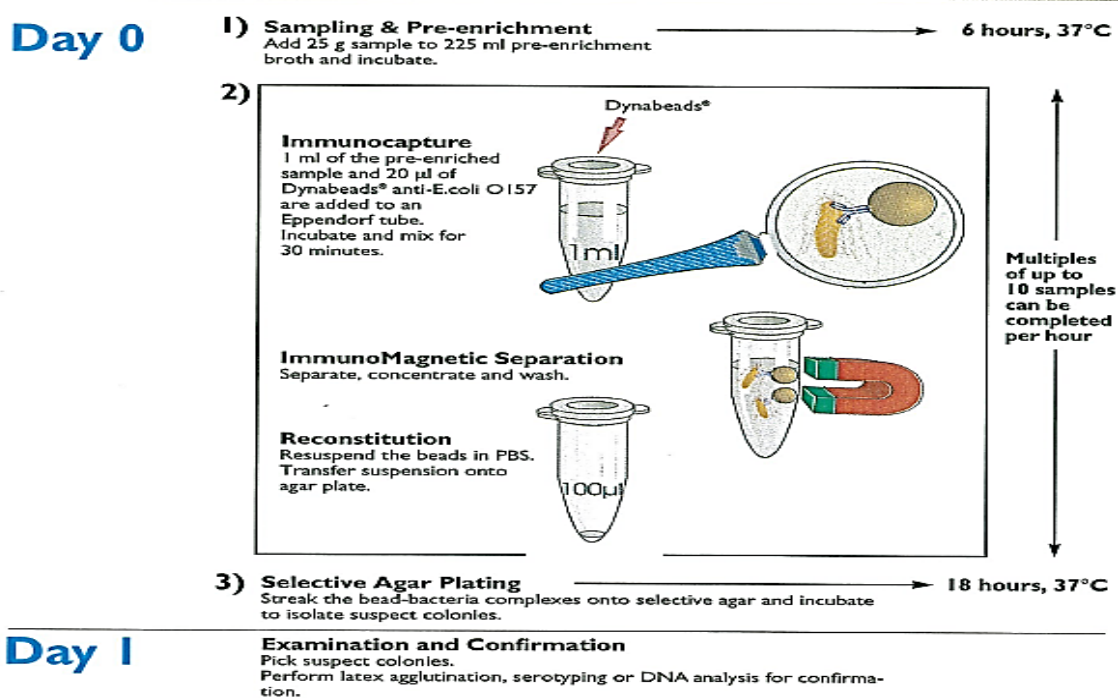
Les deux méthodes validées AFNOR de détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment utilisent:

- La technique de l'immunoséparation magnétique IMS (ISO EN 16654). (Figure 09)
- Le système VIDAS ECO pour la détection de l'antigène somatique O157 (ISO EN 16140) (Annexe 05). (AFSSA, 2003).

La technique de la séparation immuno-magnétique (IMS) reprise dans la norme ISO EN 16654 est une méthode qui utilise des particules paramagnétiques couvertes d'anticorps

## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

spécifiques de l'organisme cible, ajoutées à l'échantillon d'aliment à analyser. L'organisme cible est capturé à la surface des particules magnétiques et l'ensemble est retiré de l'échantillon par application d'un aimant (figure 08). Les organismes cibles sont ensuite séparés par centrifugation des débris alimentaires et des micro-organismes qui peuvent interférer avec les différents systèmes de détection. En rediluant les cellules cibles ainsi isolées dans un volume inférieur à celui duquel elles proviennent, on obtient un effet de concentration des cellules bactériennes et on augmente ainsi la sensibilité des systèmes de détection. Après enrichissement, les billes sont généralement mises en culture sur des milieux sélectifs. Les colonies caractéristiques sont ensuite confirmées à l'aide de tests biochimiques (galeries API 20E, bioMérieux) et immunologiques (test d'agglutination latex O157, recherche des Shiga-toxines par ELISA) (Vimont, 2007).



**Figure 08: La technique de la séparation immuno-magnétique (IMS).  
Dynabeads anti- E.coli O157.(DYNAL, A.S., 1997)**

Pour la méthode VIDAS ECO, un double enrichissement de l'échantillon alimentaire est (comme évoqué précédemment) premièrement réalisé dans du mTSB (modified Trypticase Soya Broth) pendant 6h à 42°C puis dans du CT- MacConkey Broth pendant 24h à 37°C. Une aliquote du bouillon d'enrichissement est ensuite analysée par le système VIDAS ECO. Lors d'une réponse positive pour le système VIDAS-ECO, une immunoconcentration est réalisée avec le système VIDAS ICE. Ce kit VIDAS ICE est composé des mêmes composants que le kit VIDAS

## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

ECO (cône et barrette). Le cône est recouvert d'anticorps anti-O157 qui permettent de capturer les bactéries cibles qui sont ensuite relarguées sous forme d'un immunocentrat et peuvent être isolées sur des géloses spécifiques. Les colonies suspectes font, là encore, l'objet de confirmation (agglutination latex O157, identification de l'espèce, recherche de l'antigène H7, production de Shiga-toxines).

### III. Techniques de détection des toxines STEC

#### III.1. Techniques de détection de la production des Shigatoxines (ELISA)

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 (Richardson *et al.*, 1988). Ainsi peuvent être testés des échantillons fécaux, des cultures bactériennes et des aliments. Les bactéries se multiplient en bouillon, les surnageants de cultures sont ajoutés à la lignée cellulaire Vero. Ces dernières prennent une forme ronde et se détachent du support 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 (O'Brien *et al.*, 1982).

Pour confirmer que l'effet cytopathogène exercé sur les cellules Vero est effectivement dû aux Shigatoxines, on peut réaliser des tests de neutralisation en utilisant des anticorps dirigés contre les différents types de Shigatoxines (Strockbine *et al.*, 1986).

Quelques techniques ELISA permettant la détection des shigatoxines ont été décrites. Les systèmes permettant la fixation des shigatoxines utilisent des glycolipides mimant le récepteur Gb3. Dans d'autres études des anticorps monoclonaux anti-shigatoxines ont été utilisés. Des kits ELISA (RIDASCREEN Verotoxin ELISA, Verotoxin Cypress Diagnostics) permettant la détection des shigatoxines dans les matières fécales sont commercialisés et peuvent être utilisés dans les laboratoires de diagnostic classique. De même, les tests d'immunochromatographie permettent la détection des toxines Stx1 et Stx2 (système Singlepath®, Merck).

#### III.2. Méthodes génétiques pour la détection des STEC

##### III.2.1. Les systèmes P.C.R (Polymérase Chain Reaction)

Ces méthodes sont, la plupart du temps, basées sur la recherche des gènes *stx* par PCR (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000) et les amorces conseillées ont été décrites par Lin *et al.* (1993). 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.

## Chapitre 2/ Méthodes de détection des *Escherichia coli* EHEC

Pour détecter tous les types de STEC isolés chez l'animal ou dans les aliments, Read *et al.* (1992) ont développé une PCR avec une paire d'amorces ayant pour cible une séquence conservée des gènes *stx1*, *stx2* et *stxE*. Plusieurs matrices (viande de boeuf, viande de porc, lait de chèvre, fèces de boeuf et fèces de porc) contenant différentes souches de STEC (233 souches), de *E. coli* non verotoxinogènes (72 souches) et d'autres bactéries (76 souches) ont été testées. Toutes les souches de STEC, appartenant à 50 sérotypes différents, ont pu être détectées avec cette méthode et *Shigella dysenteriae* type 1 était la seule autre bactérie détectée. La PCR 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 (méthodes conventionnelles). 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 (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000).

D'autres techniques ont été développées ces dernières années comme la PCR ELISA ou PCR en temps réel (China *et al.*, 2002 a). La PCR ELISA permet une détection du produit PCR en utilisant un lecteur de microplaques utilisé pour les tests ELISA. Le produit PCR est immobilisé dans les plaques multi-puits recouvertes de streptavidine qui a une affinité pour la biotine.

Les cibles génétiques principales pour la détection du sérotype O157:H7 sont les gènes *stx1* et *stx2*, le gène *eae* ainsi que le gène *ehxA*. Certains systèmes sont spécifiques des *Escherichia coli* O157:H7. Les gènes ciblés sont le gène *rfbE* codant pour l'antigène O157, le gène *fliCH7* codant pour l'antigène H7 ou le gène *uidA* codant pour la  $\beta$ -glucuronidase dont la séquence (mutation du gène à +93) est spécifique de ces souches (Yoshitomi *et al.*, 2006).

### **IV. Les différents milieux d'isolement des STEC**

Des milieux sélectifs et spécifiques du sérotype pour l'isolement des *E. coli* O157:H7 sont disponibles. (Voir Annexe 06).

# Conclusion



## **Conclusion**

Le choix et l'optimisation des techniques (d'application en microbiologie alimentaire), pour recherche et dénombrement des STEC dans les eaux et aliments, constitué un sujet de débat inter-laboratoire de grande controverse. Les données scientifiques analysées, affirment que les aliments d'origine animale comme les viandes (notamment d'origine bovine), certains produits laitiers crus et/ou fermentés, les eaux potables et/ ou de plaisance, sont des vecteurs pour ces pathogènes.

Dans un deuxième chapitre, une analyse critique des différentes méthodes pour la recherche / dénombrement de ces pathogènes dans les aliments. IL s'avère qu'il n'y a pas des techniques (optimales) différentielles entre les sérotype/ souches STEC pathogènes et non pathogènes. Cependant, les techniques génétiques, notamment celles basées sur la recherche/amplification des gènes stx par PCR (stx1, stx2...) sont de référence, bien qu'elles soient longues et coûteuses.

En raison de la gravité des épidémies et du manque de données disponibles sur ces procaryotes, l'instauration des mesures, visant à réduire les risques bactériologique à différents niveaux s'impose:

Législatif, d'abord, par l'établissement des lignes directrices, des recommandations, des normes nationales par les autorités compétentes afin de garantir la sécurité des aliments et des eaux.

La mise en place de laboratoire référence, doté des équipes qualifiées/ spécialisées, des banques de souches. Et d'observatoire national chargé de de suivi, de vigilance et des évolutions mondiales et/ou nationales des épidémies ou ces sérotype sont impliqués.

# Références Bibliographiques

## Références bibliographiques

- Adrienne WP., Potjane S., Ursula MT., Hui W., James CP.** (2004). A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxicogenic *Escherichia coli*. *Jo. Exp Med.* **Vol:** 200. Pp: 35- 46.
- AFSSA (2003).** Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga- toxines (STEC). Maisons- Alfort France 2003. Pp : 220.
- Andrade, J.R., Da Veiga, V.F., De Santa Rosa, M.R. et Suassuna, I.** (1989). An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Jo. Med. Microbiol.* **Vol:** 28. Pp: 49- 57.
- Auvray, F., Dilasser, F., Bibbal, D., Kerouredan, M., Oswald, E., & Brugere, H.** (2012). French cattle is not a reservoir of the highly virulent enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104 :H4. *Vet Microbiol.* **Vol:** 158(3-4). Pp: 443-445.
- Barrett P.S., T.J.** (1995). The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157: H7. *Epidemiol. Infect.* **Vol:** 115. Pp: 447- 454.
- Bauwens, A., Betz, J., Meisen, I., Kemper, B., Karch, H., & Muthing, J.** (2013). Facing glycosphingolipid- Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. *Cell Mol Life Sci.* **Vol:** 70(3). Pp: 425- 457.
- Belongia E.A., Osterholm M.T., Soler J.T., Ammend D.A., Braunn J.E., Mac Donald K.L.** (1993). Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 infection in Minnesota child day care facilities. *Jo. Am. Med. Assoc.* **Vol:** 269. Pp: 883- 888.
- Bennet A.R., Mac Phee S.,betts R.P.** (1996). The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. *Lett. Appl. Microbiol.* **Vol:** 22. Pp: 237-243.
- Bolton F.J., Crozier L.,Williamson J.K.** (1996). Isolation of *Escherichia coli* O: 157 from raw meat products. *Lett. Appl. Microbiol.* **Vol:** 23. Pp: 317- 321.
- Booher, S. L., Cornick., N. A., Moon,H. W.** (2002). Persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in experimentally infected swine. *Vet Microbiol.* **Vol:** 89. Pp: 69- 81.
- Bouvet J., Livrelli V., Mariani-Kurkdjan P., Oswald E.** (2003).Pathologie humaine et animale liée aux STEC. In AFSSA, Maisons- Alfort,Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga- toxines (STEC). Pp: 29- 39.
- Bouvet, J., Vernozzy-Rozand, C.** (2000). Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* verotoxiques (STEC) et de *E. coli* O157: H7 dans les aliments. *Rev. Med. Vet.* **Vol:** 151. Pp: 907- 914.
- Bouvier. M.** (2011). Mise au point de méthodes de détection des souches d'*Escherichia coli* productrices de Shiga- toxines (STEC). Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'École

## Références bibliographiques

- Pratique des Hautes Études. Ecole Pratique des Hautes Etudes Sciences de la vie et de la terre. France.
- Brenner, D. J., Fanning, G. R., Skerman, F. J., AND Stanley, F.** (1972). Polynucleotide Sequence Divergence Among Strains of *Escherichia coli* and Closely Related Organisms. *Journal of Bacteriology*. Vol: 109. Pp: 953- 965.
- 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., Griffin P.M.A.** (2001). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg. Infect. Dis.* Vol: 7. Pp: 977- 982.
- Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J.** (2015). Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clin. Lab. Med.* Vol: 35(2). Pp: 247- 272.
- Cagney, C., Crowley, H., Duffy, G., Sheridan, J. J, O'Brien, S., Carney, E., Anderson, W., McDowell, D.A., Blair, I.S., Bishop, R.H.** (2004) Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157: H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in *the Republic of Ireland. Food Microbiology*. Vol: 21. Pp: 203- 212.
- Caprioli A., Morabito S., Brugere H., Oswald E.** (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* Vol: 36. Pp: 289- 311.
- Carney, E., O'Brien, S. B., Sheridan J., McDowell, D., Blair I., and Duffy, G.** (2006). Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food microbiology*. Vol: 23. Pp: 52- 59.
- Center for disease control outbreaks of Escherichia coli O157: H7 infections among children associated with farms visits. Pennsylvania and Washington.** (2001). Morb Mortal Wkly Rep. Vol: 50. Pp: 293- 297.
- Chahed A., China B., Mainil J., Daube G.** (2006), Prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from serotype O157 and other attaching and effacing *Escherichia coli* on bovine carcasses in Algeria. *Journal of Applied Microbiology*. Vol: 101(2). Pp: 361- 368.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Cerdan Malo, A.T., Harkin, M.A.,** (2000). A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiology and Infection*. Vol: 124. Pp: 207- 213.
- China B., Ghafir Y., Daube G.** (2002). Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.* Vol: 147. Pp: 99- 109.
- Chinen, I., Tanaro, J.D., Miliwebsky, E., Lound, L.H., Chillemi, G., Ledri, S., Baschkier, A., Scarpin, M., Manfredi, E., Rivas, M.** (2001). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157: H7 from retail meats in Argentina. *Journal of Food Protection*. Vol: 64 (9). Pp: 1346- 1351.

## Références bibliographiques

- Cleary, T. G.** (1988). Cytotoxin-producing *Escherichia coli* and the hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Clin. North Am.* **Vol:** 35. Pp: 485- 501.
- Cleary, T. G., J. J. Mathewson, E. Faris, and L. K. Pickering.** (1985). Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Infect. Immun.* **Vol:** 47. Pp: 335- 337.
- Coia, J. E., Y. Johnston., N. J. Steers., and M. F. Hanson.** (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. Jo. Food. Microbiol.* **Vol:** 66. Pp: 63- 69.
- Croxen M. A., Finlay, B. B.** (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* **Vol:** 8. Pp: 26- 38.
- Crump, J. A., A. C. Sulka, A. J. Langer, C. Schaben, A. S. Crielly, R. Gage, M. Baysinger, M. Moll, G. Withers, D. M. Toney, S. B. Hunter, R. M. Hoekstra, S. K. Wong, P. M. Griffin, and T. J. Van Gilder.** (2002). An outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections among visitors to a dairy farm. *Na. Engl. Jo Med.* **Vol:** 347. Pp: 555- 560.
- D'Amico, D. J., Druart, M. J., Donnelly C. W.** (2010). Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *Jo. Food. Prot.* **Vol:** 73. Pp: 2217- 2224.
- De Boer E., Heuvelink A. E.** (2000). Methods for the detection and isolation of Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. Symp. Ser. Soc. *Appl. Microbiol.* **Vol:** 29. Pp: 1335- 1435.
- Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P. A., Hubert, B. & Loirat, C.** (2000). Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. The Société de Néphrologie Pédiatrique. *Epidemiol Infect.* **Vol:** 124. Pp: 215- 220.
- Djaouda M., Wadoubé Z., Baponwa O., Youssoufa S., Gaké B., Liang S., Nola M.** (2020), Survival and growth of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in treated groundwater consumed in northern Cameroon. *Applied Water Science.* **Vol:** 10: 242. [https:// doi.org/ 10.1007/ s13201- 020-01328-7](https://doi.org/10.1007/s13201-020-01328-7).
- Donnenberg, M. S., A. Donohue-Rolfe, and Keusch, G. T.** (1989). Epithelial cell invasion: overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherent factor. *Jo. Infect. Dis.* **Vol:** 60. Pp: 453- 459.
- Donnenberg, M. S., Kaper J. B.** (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **Vol:** 60. Pp: 61- 3953
- Doyle, M. P., Padhye, V. B** (1989). *Escherichia coli*. **In:** M. P. Doyle (Ed.), Foodborne bacterial pathogens. *Marcel Dekker*, New York. Pp: 235- 281.
- Duffy, G., Mc Cabe, E.** (2014). Veterinary public health approach to managing pathogenic verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the agri-food chain. *Microbiol. Spectr.* Pp: 1- 15.

## Références bibliographiques

- Dynal, A. S.** (1997). Capture and Isolated E. coli O157. *Thermo Microbiologia Scientific*. Pp: 1-8
- EFSA, & ECDC.** (2016). European Food Safety Authority and European Center for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 *EFSA. Journal* 2016. **Vol:** 14. Pp: 4634- 4231.
- Elliott S. J., Krejany E. O., Melies J. L., Robins-Browne R. M., Sasakawa C., Kaper J. B.** (2001). A novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of Shigella flexneri. *Infect. Immun.* **Vol:** 69. Pp: 4027- 33.
- Escherich T.** (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr Med.* **Vol:** 3(515, 522). Pp: 547- 54.
- Fach, P., S. Perelle., F. Dilasser, and J. Grout.** (2001). Comparison between a PCRELISA 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. *Jo Appl Microbiol.* **Vol:** 90. Pp: 809- 818.
- Fantelli, K., Stephan, R.** (2001). Prevalence and characteristics of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology.* **Vol:** 70. Pp: 63- 69.
- Farroukh C., Jordan K., Auvray F., Glass K., Oppegaard H., Raynaud S., Thevenot D., Condron R., De Reu K., Govaris A., Heggum K., Heyndrickx M., Hummerjohann J., Lindsay D., Miszczycha S., Moussiegt S., Verstraete K., Cerf O.** (2013), Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology.*
- Fauchère, J.L., et Avril, J.L.** (2002). Bactériologie générale et médicale. *Ellipses edition marketing S.A.* Pp: 237- 239.
- Feng P.** (1995). *Escherichia coli* serotype O157: H7 Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic variants. *Emerging Infectious Diseases.* **Vol:** 1. Pp: 47- 52.
- Ferhat L., Chahed A., China B., Assaous F., Daube G., Rahal K.** (2018), Research and characterization of *Escherichia coli* O157 strains isolated from ovine carcasses of two slaughterhouses of Algiers city. *Human & Veterinary Medicine. International Journal of the Bioflux Society.* **Vol:** 10. Pp: 46- 50.
- Ferreira M. R. A., Freitas Filho E. G., Pinto J. F. N., Dias M., & Moreira, C. N.** (2014), Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. *Tropical animal health and production.* **Vol:** 46(4).Pp: 635- 639.
- Frank,C., Faber, M.S.,Askar ,M., Bernard, H., Fruth ,A., Gilsdorf ,A., Höhle ,M., Karch, H., Krause ,G., Prager ,R., Spode, A., Stark, K., Werber, D.**( 2011) au nom de l'équipe

## Références bibliographiques

- d'investigation SHU. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Allemagne, mai 2011. *Euro. Surveill.* Vol: 16.
- Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., Siebenlann, R. E. & Oechslin, R.** (1955). Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz. Med. Wochenschr.* Vol: 85. Pp: 905- 909.
- Gouali, M., Weill, F. X.** (2013). Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. *Presse Med.* Vol: 42. Pp: 68- 75.
- Grant, J., Wendelboe, A. M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C., Rolfs, R. T.** (2008). Spinach-associated *Escherichia coli* O157: H7 outbreak, Utah and New Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* Vol: 14. Pp: 6- 1633.
- Greatorex, J. S., et Thorne, G. M.** (1994). Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patient and healthy subjects, *Jo. Clin. Microbiol.* Vol: 32. Pp: 1172- 1178.
- Grimont, P.A.D.** (1987). Taxonomie des *Escherichia*. *Med Mal Infect.* Pp: 6- 10.
- Gyles, G. L.** (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Jo. Anim Sci.* Vol: 85. Pp: 45- 62.
- Heuvelink, A. E.** (2000). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in humans and the food chain. Thèse de science- Université catholique de Nijmegen.
- Heuvelink, A., Bleumink, F. V. D., Biggelaar, M. T., Giffel, R., Beumer, & E. D. Boer.** (1998). Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. *Jo. Food. Prot.* Vol: 61. Pp: 1597- 1601.
- Heuvelink, A.E., Van Heerwaarden, C., Zwartkruis-Nahuis, J.T., Van Oosterom, R., Edink, K., Van Duynhoven, Y.T., & De Boer, E.** (2002). *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect.* Vol: 129. Pp: 295- 302.
- Hoey, D. E., Currie, C., Else, R. W., Nutikka, A., Lingwood, C. A., Gally, D. L., & Smith, D. G.** (2002). Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *Jo Med Microbiol.* Vol: 51. Pp: 143- 149.
- ICMSF** (1996). International commission on microbiological specification for foods (1996). Intestinally pathogenic *Escherichia coli* Ch 7 In: Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens. *Blackie Academic and Professional, London.* Pp: 126- 140.
- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., & Muniesa, M.** (2009). Phage mediated shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol: 75. Pp: 1764- 1768.
- ISO** (2001). International Organization for Standardization Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO 16654, ISO, Suisse. 2001. Pp: 1- 15.

## Références bibliographiques

- Jerse A. E., Gicquelais, K. G., Kaper, J. B.** (1991). Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **Vol:** 59. Pp: 3869- 75.
- Jerse A. E., Yu, J., Tall B. D., Kaper J. B.** (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **Vol:** 87. Pp: 7839- 7843.
- Joffin, C., Joffin, J. N.** (2003). *Microbiologie Alimentaire*. 5<sup>e</sup> Edition. **CRDP AQUITAINE**. France. Pp : 157- 162.
- Johnson R.P., Clarke R.C., Wilson J.B., Read S.C., Rahn K., Renwick S.A.** (1996). Growing concerns and recent outbreaks involving non O157: H7 serotypes of verocytotoxic *Escherichia coli*. *Jo. Food Prot.* **Vol:** 59. Pp: 1112- 1122.
- Joly B. and Alain R.** (2003). Entérobactéries: Systématique et méthodes de diagnostic. *Ed. Lavosier, Paris. France.* **Vol:** 356. Pp: 26- 38.
- Jones I.G., Roworth M.** (1996). An outbreak of *Escherichia coli* O:157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public. Health.* **Vol:** 110. Pp: 277- 282.
- Karch, H., and T. Meyer.** (1989). Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga- like- toxin- producing *Escherichia coli*. *Jo. Clin Microbiol.* **Vol:** 27. Pp: 1180- 1186.
- Karch.H., Brunder. W and H. Schmidt.** (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiology Society.* **Vol:** 142. Pp: 3305- 3315.
- Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C. & Steele, B. T.** (1983). *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet.* **Vol:** 2. Pp: 1299- 1300.
- Kauffmann, F.** (1974). The serology of the E.coli group. *Jo. Immun.* **Vol:** 57 Pp: 71- 100.
- Klie, H., M. Timm., H. Richter., P. Gallien., K. W. Perlberg, and H. Steinruck.** (1997). Détection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **Vol:** 110. Pp: 337- 341.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I. & Stavric, S.,** (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity.* **Vol:** 18(3). Pp: 775- 779.
- Kovacs, M. J., Roddy, J., Grégoire, S., Cameron, W., Eidus, L. & Drouin, J.** (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med.* **Vol:** 88. Pp: 177- 179.
- Kruger, A., Lucchesi, P. M.** (2015). Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology.* **Vol:** 161. Pp: 451- 462.



## Références bibliographiques

- La Ragione, R. M., Best, A., Woodward, M. J., & Wales, A. D.** (2009). *Escherichia coli* O157: H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS. Microbiol. Rev.* **Vol:** 33. Pp: 394-410.
- Laskin, A. et Lechevalier, H.** (1994). Handbook of microbiology. *CRC Press. Ohio.* **Vol:** 1. Pp: 1- 15.
- Le Minor, L., Popoff, M.Y et Bockemuhl, J.** (1990). Supplement 1989 to the kauffmann white scheme. *Res. Microbiol.* **Vol:** 141. Pp: 1173- 1177.
- Lin, Z., H. Kurazono, S. Yamasaki, and Y. Takeda.** (1993). Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* **Vol:** 37. Pp: 543- 548.
- Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis, and M. Karmali.** (1987). Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *Jo Biol Chem.* **Vol:** 262. Pp: 8834- 8839.
- Loirat, C., Baudouin, V., Sonsino, E., Mariani-Kurkdjian, P. et Elion, J.** (1992). Syndrome Hémolytique et Urémique de l'enfant: aspects cliniques, étiologiques, éléments du pronostic et résultats thérapeutiques, *In: Flammarion-Médecine- Sciences (Ed.)* Actualités Néphrologiques de l'Hopital Necker. Paris. Pp: 133- 158.
- Maher, M. M., Jordan, K.N., Upton, M.E., Coffey, A.** (2001). Growth and survival of *E. coli* O157: H7 Puring the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *Jo. Appl. Microbiol.* **Vol:** 90. Pp: 201- 207.
- Mariani Patricia -Kurkdjiana, Stéphane Bonacorsia.** (2016). Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entérohémorragique. *Francofone Des Laboratoires.* **Vol:** 486. Pp: 49.
- Massa, S., E. Goffredo., C. Altieri., and K. Natola.** (1999). Fate of *Escherichia coli* O157 :H7 in unpasteurized milk stored at 8 degrees °C. *Lett. Appl. Microbiol.* **Vol:** 28. Pp: 89- 92.
- MC Daniel T.K., jarvis K.G., Donnenberg M.S., Kaper J.B.** (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserve damong diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **Vol:** 92. Pp: 1664- 1668.
- Mellies, J. L., & Lorenzen, E.** (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Microbiol Spectr,* **Vol:** 2.
- Melton- Celsa, A. R.** (2014). Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr.* **Vol:** 2(4). Pp:1- 13.
- Milidis, M. D., H. J. Koomhof, and J. I. Phillips.** (1989). Invasive potential of noncytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli* in an *in vitro* Henle 407 cell model. *Infect. Immun.* **Vol:** 57. Pp: 1928- 1935.
- Morgan, D., C. P. Newman, D. N. Hutchinson, A. M. Walker, B. Rowe, and F. Majid.** (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect.* **Vol:** 111. Pp: 181- 187.

## Références bibliographiques

- Moschcowitz, E.** (1925). An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: an undescribed disease. *Arch. Intern. Med.* **Vol:** 36. Pp: 89.
- Moxley, R. A., and D. H. Francis.** (1986). Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect. Immun.* **Vol:** 53. Pp: 339- 346.
- Nangaku, M., H. Nishi., and T. Fujita.** (2007). Pathogenesis and prognosis of thrombotic microangiopathy. *Clin. Exp. Nephrol.* **Vol:** 11. Pp: 107- 114.
- Nastasijevic, I., Mitrovic, R. and Buncic, S.** (2009). The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science.* **Vol:** 82. Pp: 101- 105.
- Neaves, P., J. Deacon, and C. Bell.** (1994). A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK Dairy Industry. *Int. Dairy. Jo.* **Vol:** 4. Pp: 679- 696.
- O'Brien, A. D., and G. D. La Veck.** (1983). Purification and characterization of Shigella dysenteriae 1 -like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **Vol:** 40. Pp: 675- 683.
- O'Brien, A., G. La Veck, M. Thompson, and S. Formal.** (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Jo. Infect. Dis.* **Vol:** 146. Pp: 763- 769.
- Ochoa T. J., Cleary T. G.** (2003). Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr Opin Infect Dis.* **Vol:** 16. Pp: 259- 63.
- Odonkor S T., Ampofo J. K.** (2013), *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water. *An overview Microbiology Research.* **Vol:** 4.
- Ogden I. D., Hepburn N. F., Mac Rae M.** (2001). The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in food. *Jo. Appl. Microbiol.* **Vol:** 91. Pp: 373- 379.
- Okrend, A. J. G., B. E. Rose, and C. P. Lattuada.** (1990). A research note: use of 5-bromo chloro-3-indoxyl-1-glucuronide in Mac Conkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from ground beef. *Jo. Food. Prot.* **Vol:** 53. Pp: 941- 943.
- O'Loughlin, E. V., & Robins- Browne, R. M.** (2001). Effect of shiga toxin and shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* **Vol:** 3(6). Pp: 493- 507.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S.** (2000). Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.* **Vol:** 68. Pp: 64- 71.
- Paton A. W., Ratcliff R. M., Doyle R. M., Seymour- Murray J., Davos D., Lanser J.A., Paton J. C.** (1996). Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic- uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Jo. Clin. Microbiol.* **Vol:** 34. Pp: 1622- 1627.

## Références bibliographiques

- Persad, A. K., Le Jeune, J. T.** (2014). Animal reservoirs of shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **Vol:** 2. Pp: 1- 14.
- Pradel, N., Y. Bertin, et al.** (2008). Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl Environ. Microbiol.* **Vol:** 74(7). Pp: 2118- 28.
- Pruimboom-Brees, I. M., Morgan, T. W., Ackermann, M. R., Nystrom, E. D., Samuel, J. E., Cornick, N. A., & Moon, H. W.** (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157: H7 shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **Vol:** 97. Pp: 10325- 10329.
- Radu S., Rusul G., Ling O.W., Purwati E., Mustakim M., Lihan S.**( 2000). Rapid isolation and detection of *Escherichia coli* O157: H7 by use of rainbow agar O 157 and PCR assay. *Southeast Asian Jo. Trop. Med. Public. Health.* **Vol:** 31. Pp: 77- 79.
- Read, S. C., R. C. Clarke, A. Martin, S. A. De Grandis, J. Hii, S. Mc Ewen, and C. L. Gyles. C. L.** (1992). Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol. Cell. Probes.* **Vol:** 6. Pp: 153- 161.
- Richardson, S. E., M. A. Karmali, L. E. Becker, and C. R. Smith.** (1988). The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol.* **Vol:** 19. Pp: 1102- 1108.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. Mc Gee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen.** (1983.) Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *Na. Engl. Jo. Med.* **Vol:** 308. Pp: 681- 685.
- Rippey, S. R., L. A. Chandler, and W. D. Watkins.** (1987). Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shell-fish. *Jo. Food. Prot.* **Vol:** 50. Pp: 685- 690.
- Samadpour, M., Kubler, M., Buck, F.C., Depavia, G.A., Mazengia, E., Stewart, J., Yang, P., Alfi, D.** (2002). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King County, Washington. *Journal. of Food. Protection.* **Vol:** 65 (8). Pp: 1322- 1325.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A. B., Skotland, T., & Torgersen, M. L.** (2010). Endocytosis and retrograde transport of shiga toxin. *Toxico.* **Vol:** 56(7). Pp: 1181- 1185.
- Savoie, F.** (2011). Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* Producteurs de Shiga- toxines (STEC) dans les aliments. THÈSE De Doctorat. Spécialité: Microbiologie. L'Université de Bourgogne. France. Pp: 1. 198.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., O'Brien, A. D.** (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Jo. Clin. Microbiol.* **Vol:** 50. Pp: 2951- 2963.

## Références bibliographiques

- Serra-Moreno R., Jofre J., Muniesa M.** (2007). Insertion site occupancy by stx2-bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *Journal of bacteriology*. **Vol:** 189. Pp: 6645- 6654.
- Siegler, R. & Oakes, R.** (2005). Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr Opin Pediatr*. **Vol:** 17. Pp: 200- 204.
- Siegler, R. L.** (1995). The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Clin. North. Am.* **Vol:** 42. Pp: 1505- 1529.
- Solheim, H. T., Sekse, C., Urdahl, A. M., Wasteson, Y., & Nesse, L. L.** (2013). Biofilm as an environment for dissemination of stx genes by transduction. *Appl. Environ Microbiol.* **Vol:** 79(3). Pp: 896- 900.
- Spooner, R. A., Lord, J. M.** (2012). How ricin and shiga toxin reach the cytosol of target cells: retro-translocation from the endoplasmic reticulum. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **Vol:** 357. Pp: 19- 40.
- Strachan, N. J., Dunn G. M., Locking M. E., Reid, T.M., Ogden, I. D.** (2006). *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen. *Int. Jo. Food. Microbiol.* **Vol:** 112. Pp: 129- 137.
- Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, & A. D. O'Brien.** (1986). Two toxin- converting phages from *Escherichia coli* O157: H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* **Vol:** 53. Pp: 135- 140.
- Swerdlow, D. L., Woodruff, B. A., Brady R. C., Griffin, P. M., Tippen, S., Donnell, H., et al.,** (1992). A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157: H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* **Vol:** 117. Pp: 9- 812.
- Tarr, P. I., Gordon, C. A. & Chandler, W. L.** (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. **Vol:** 365. Pp: 1073- 1086.
- Taylor, M.** (1990) The haemolytic uraemic syndrome: a clinical perspective. *Phls Microbiol Digest*. **Vol:** 7. Pp: 133- 140.
- Tesh, V. L.** (2010). Induction of apoptosis by shiga toxins. *Future Microbiol.* **Vol:** 5, (3). Pp: 431- 453.
- Tesh, V. L., J. E. Samuel, L. P. Perera, J. B. Sharefkin, and A. D. O'Brien.** (1991). Evaluation of the role of Shiga and Shiga- like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *Jo. Infect. Dis.* **Vol:** 164. Pp: 344- 352.
- Thomson, J. S., D. S. Hodge, and A. A. Borczyk.** (1990). Rapid biochemical test to identify verocytotoxin- producing *Escherichia coli* serotype O 157. *Jo. Clin. Microbiol.* **Vol:** 28. Pp: 2165- 2168.
- USDA** (1993) Report on the *Escherichia coli* O157: H7 outbreak in the Western States. United States Department of Agricultural- Food safety and inspection service.

## Références bibliographiques

- Vaillant V., Espié E.** (2003). 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: étude cas-témoins 2000- 2001. Institut de Veille Sanitaire: Saint Maurice. France. Pp: 61.
- Vernozy- Rozand, C., Bouvet, J., Montet, M.P., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy-Cruchaudet, C., and Richard, Y.** (2002). Survey of retail raw milk cheeses for Verotoxin-producing E.coli (VTEC) and E. coli O157: H7 in France (Poster). In: **102th General Meeting of American Society for Microbiology** May, 19- 20 Salt- Lake City, USA.
- Vernozy-Rozand C.** (1999). Les *Escherichia coli* vérotoxiques (VTEC) et *Escherichia coli* O157: H7 en clinique et en agroalimentaire. **Ann. Biol. Clin.** **Vol:** 57. Pp: 507- 516.
- Vernozy-Rozand. C.** (1997). Detection of *Escherichia coli* O157: H7 and other verocytotoxine-producing E.coli (VTEC) in food. **Appl. Bacteriol.** **Vol:** 82. Pp: 537- 551.
- Vidovic, S., Mangalappalli- Illathu,M., Korber,R.** (2011). Prolonged cold stress reponse of *Escherichia coli* O: 157 and the rôle of rpoS. **International Journal of Food Microbiology.** **Vol:** 146. Pp: 163- 169.
- Vimont. A.** (2007). Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard - Lyon1. France.
- Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I., Waldor, M. K.** (2002). Bacteriophage control of shiga toxin1 production and release by *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.** **Vol:** 44. Pp: 957- 970.
- Wagner, P. L., Neely, M. N., Zhang, X., Acheson, D. W., Waldor, M. K., & Friedman, D. I.** (2001). Rôle for a phage promoter in shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strains. **Jo. Bacteriol.** **Vol:** 183. Pp: 2081- 2085.
- Weagant, S. D., Bound, A. J.** (2001). Evaluation des techniques d'énrichissement et d'isolement d'*Escherichia coli* O157: H7 à partir de germes contaminé artificiellement. **Journal International de Microbiologie Alimentaire.** **Vol:** 71. Pp: 87- 92.
- Weagant, S. D., Bryant, J. L., and Bark, D. H.** (1994). Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. **Jo. Food. Prot.** **Vol:** 57. Pp: 629- 631.
- Wilson, J. B., S. A. McEwen, R. C. Clarke, K. E. Leslie, R. A. Wilson, D. Waltner- Toews, and C. L. Gyles.** (1992). Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. **Epidemiol. Infect.** **Vol:** 108. Pp: 423- 439.
- 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* O 157: H7 infections among visitors to a dairy farm. **Na. Engl. Jo. Med.** **Vol:** 347. Pp: 555- 560.

## *Références bibliographiques*

- Wong C. S., Jelacic S., Habeeb R. L., Watkins S. L., Tarr P. I.** (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157: H7 infections. *Na. Engl. Jo. Med.* **Vol:** 342. Pp: 6- 1930.
- Yoshitomi K. J., Jinneman K. C., Weagant S. D.** (2006). Detection of Shiga toxin genes stx1, stx2, and the +93 uidA mutation of *E. coli* O157: H7/H- using SYBR® Green I in a real-time multiplex PCR. *Cell. Probes.* **Vol:** 20. Pp: 31- 41.
- Zadik P. M., Chapman P. A., Siddons C. A.** (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *E. coli* O157. *Jo. Med. Microbiol.* **Vol:**39. Pp: 155- 158.

# Annexe

## **Annexe 01**

### **Les différents pathovars**

#### **1- E. coli entéropathogène (EPEC) :**

Ces souches étaient responsables, dans les années 50, de diarrhées infantiles graves ou toxicoses, survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités.

Ces souches encore appelées E. coli G.E.I (des gastro-entérites infantiles) sont plus rarement rencontrées aujourd'hui, elles sont alors isolées de cas sporadiques. (Andrade et al., 1989 ; Jerse et al., 1990).

Le mode de pathogénèse est encore mal élucidé. Cependant, on sait maintenant que certaines souches EPEC produisent des toxines, en particulier des vérotoxines (Cleary et al., 1985), distinctes des entérotoxines ETEC (Cleary, 1988 ; O'Brien et LaVeck, 1983). En outre, certaines souches EPEC envahissent les cellules épithéliales (Donnenberg et al., 1989; Milidis et al., 1989).

#### **2- E. coli Entérotoxigène (ETEC) :**

Provoquent une diarrhée aqueuse en adhérant à petites cellules épithéliales intestinales et produisant une ou plusieurs entérotoxines appartenant soit à la famille thermolabile (LT-1, LT-2) ou la famille stable à la chaleur (STa, STb). Ils sont principalement associées à la diarrhée dans les pays en développement et sont le plus souvent associés à la diarrhée des voyageurs aux États-Unis (Doyle et Padhye, 1989 ).

#### **3- Les E. coli entéroinvasifs (EIEC) :**

Sont proches des shigelles, de point de vue génétique, biochimique et pathogénique (Brenner et al., 1972). Elles provoquent des diarrhées aqueuses, évoluant rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Leur principal réservoir est l'homme.

Les EIEC pénètrent les entérocytes du colon, provoquent la lyse de la vésicule d'endocytose et se multiplient, provoquant la mort cellulaire. Elles sont capables de se mouvoir dans le cytoplasme et de pénétrer ensuite dans la cellule adjacente par la polymérisation de l'actine cellulaire à de leur pôle.

#### **4- Les E. coli entérohémorragiques (EHEC) :**

Provoquent des symptômes allant de diarrhées peu sanglantes à des colites hémorragiques (C. H), voir à un Syndrome Hémolytique et Urémique (S.H.U) chez l'enfant ou (un Purpura Thrombotique Thrombocytopenique P.T.T) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort (Riley et al., 1983). Les ruminants sont reconnus pour être le principal réservoir. Un grand nombre de sérotypes d'EHEC est capable de produire les lésions de type A/E\* au niveau



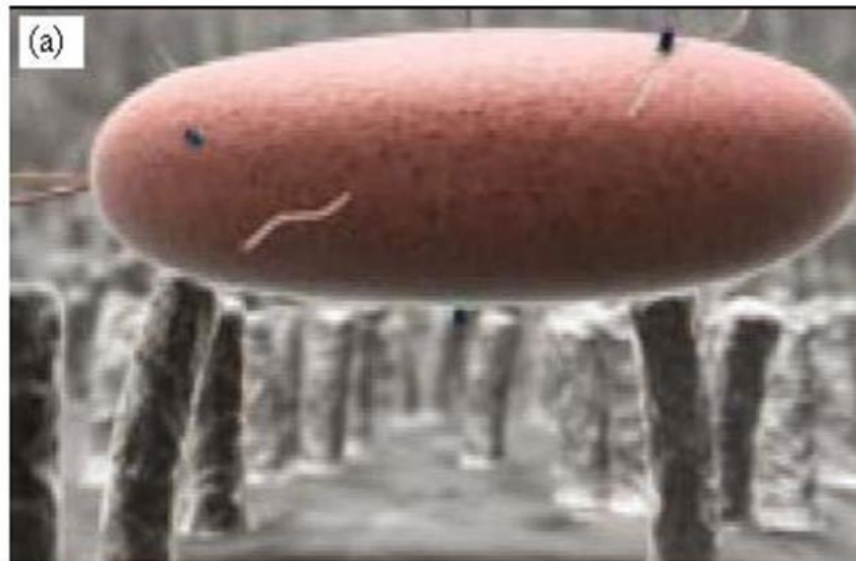
du colon. Néanmoins le point central de leur pouvoir pathogène est la production de toxines Stx 1 et/ou Stx 2, codées par les gènes stx, qui pénètrent dans la circulation sanguine et provoquent des atteintes extra-intestinales potentiellement mortelles (Konowalchuk et al., 1977).

L'ensemble des souches d'E. coli, possédant au moins un gène stx représente le groupe des Shigatoxin-producing E. coli (STEC) ou VTEC selon l'ancienne dénomination internationale (pour verotoxin-producing E. coli). Il est important de souligner que les STEC ne sont néanmoins pas tous pathogènes pour l'homme.

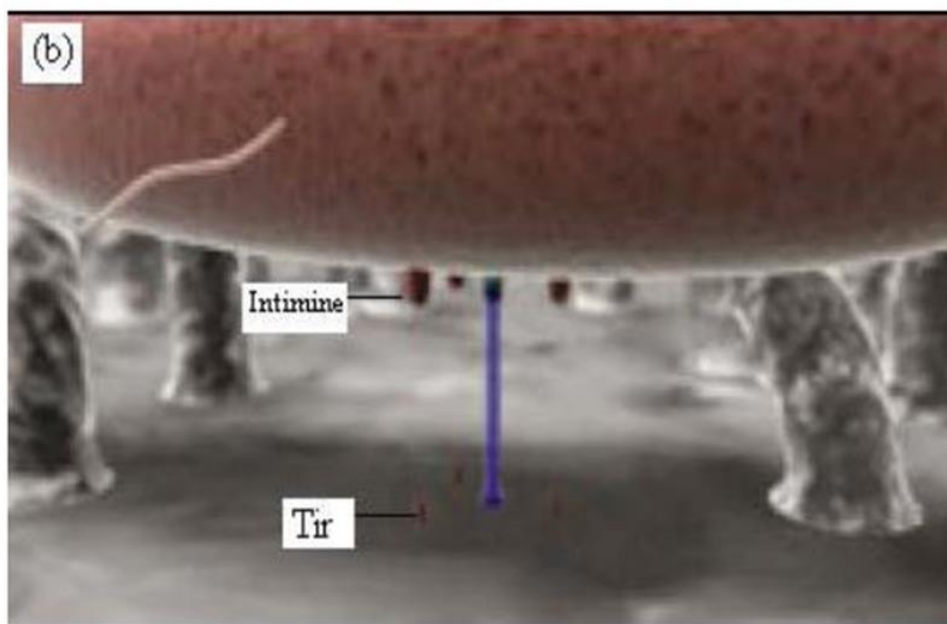
Selon la recommandation de l'AFSSA en date d'avril 2003 une souche STEC pathogène doit avoir les caractéristiques suivantes :

- Elle doit appartenir aux sérotypes : O157 : H7, O26 : H11, O103 : H2, O111 : H8, O145 : H28 ;
- Elle doit de surcroît posséder concomitamment, deux facteurs de virulence : un ou deux gènes stx codant pour les Shiga-toxines, et le facteur d'attachement et d'effacement eae, avec les variants suivants : eae-gamma pour O157 et O145, eae-beta pour O26, eae-epsilon pour O103 et eae-theta pour O111. (Gouali et Weill.,2013).

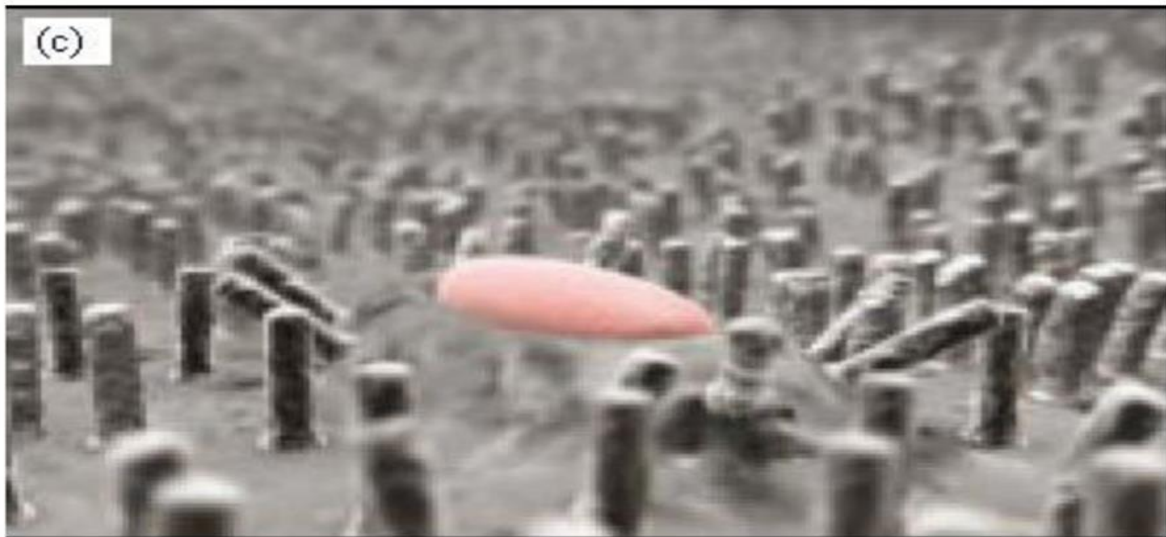
Annexe 02



a - Adhésion initiale d'une souche EHEC (représentée en rose) aux microvillosités Intestinales (représentées en gris). (Donnenberg et al., 1989)



b- Dans un second temps, la bactérie injecte Les protéines effectrices du système de sécrétion de type III (SSTT) dans le cytoplasme de la cellule épithéliale. Parmi celles-ci, notons la Protéine Tir qui vient se localiser au niveau de la membrane plasmique de la cellule pour Servir de récepteur à l'intimine. Il en résulte un attachement plus intime de la bactérie à la cellule épithéliale. (Donnenberg et al., 1989)



C- L'Adhésion intime de la bactérie à la cellule hôte entraîne une cascade biochimique complexe dans le cytoplasme de la cellule épithéliale se traduisant par la destruction de l'actine des microvillosités intestinales et leur effacement (Donnenberg.et Kaper., 1992).

**Figure : a/b/c : Modélisation des trois principales étapes de l'interaction entre une souche EHEC et aux entérocytes aboutissant à la formation d'une lésion d'attachement et d'effacement (A/E) (Adrienne et al., 2004).**

Annexe 03

**Préparation de l'échantillon**

25 g d'échantillon + 225 ml de mTSB (préchauffé à 37°C)



**Homogénéisation et Incubation  
6h à 37°C +/-1°C**

Concentration d'*E. coli* O157 par capture par les billes  
Immunomagnétiques et lavage par une solution stérile



Resuspension dans 0,1 ml de solution tampon stérile



Ensemencement de 50 µl de particules sur CT-SMAC et  
une seconde gélose sélective



**Incubation 18 à 24h à 37°C +/-1°C**

- Sélection de 5 colonies caractéristiques sur chaque milieu
- Confirmation des colonies par production d'indole ou les kits de diagnostic
- Disponibles dans le commerce et par agglutination avec le sérum anti *E. coli* O157

**Figure : Mode opératoire de l'IMS (ISO EN-16654).**

## Annexe 04

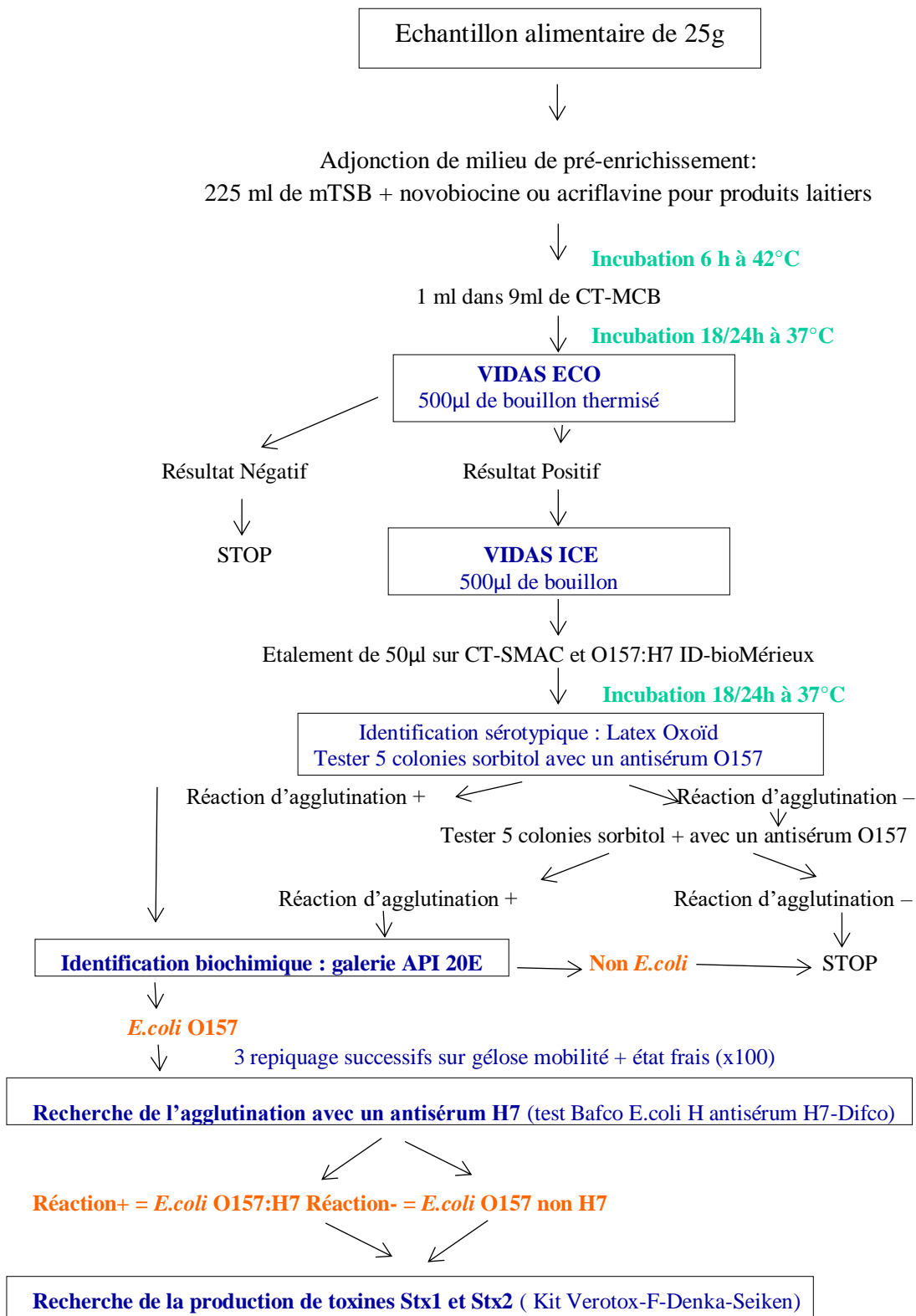
Tableau : Kits immunologiques de détection de *E. coli* O157:H7 dans l'aliment (Vernozy-Rozand et al., 2002)

Test	Fabricant	Antigène(S) Cible(S)	Système de révélation	FORMAT	Validation
<b>EHEK-Tek<sup>TM</sup></b>	Organon Teknika	O157 et H7	Colorimétrique	Microplaque	Health Canada Method MRLP-91
<b>Tecra<sup>TM</sup> E.C. O157 VIA</b>	Bioenterprises Pty Ltd	O157	Colorimétrique	Microplaque	
<b>Assurance<sup>TM</sup> EHEC EIA</b>	BioControl Systems Inc.	O157 et H7	Colorimétrique	Microplaque	AOAC Official Method 996.10
<b>PATH-STIK <i>E. coli</i> O157</b>	Celsis-Lumac	O157	Colorimétrique	Dip-stick	
<b>VIPTMEHEC</b>	BioControl Systems Inc	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	AOAC Official Method 996.09
<b>Transia card <i>E. coli</i> O157</b>	Diffchamb	O157	Colorimétrique	1 étape	
<b>REVEAL<sup>TM</sup> <i>E. coli</i> O157:H7</b>	Neogen	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
<b>ImmunoCard Stat1 <i>E. coli</i> O157:H7</b>	Meridian Diagnostics	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	AOAC Performance Tested
<b>Biocard EHEC</b>	ANI Biotech OY	O157	Colorimétrique	1 étape	
<b>Singlepath<sup>TM</sup> <i>E. coli</i> O157:H7</b>	Merck Ltd	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
<b>VIDAS <i>E. coli</i> O157</b>	BioMérieux	O157	Fluorescent	Automatisé	AFNOR 12/08- 07/00
<b>EiaFoss <i>E. coli</i> O157</b>	Foss Electric A/S	O157	Fluorescent	Automatisé	
<b>Difco EZ <i>coli</i></b>	Becton Dickinson	O157	Colorimétrique	1 étape	
<b>NOW EH. <i>E. coli</i></b>	Binax, Inc	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
<b><i>E. coli</i> O157- CD</b>	Denka Seiken	O157	-	-	
<b>RapidChek for <i>E. coli</i> O157:H7</b>	SDI, Inc	O157 et H7	Colorimétrique	1 étape	
<b>EC Lite</b>	GEM Biomedical	O157	Chemiluminescence	1 étape	
<b>Captivate O157</b>	IDG, Lab M Ltd.	O157	-	-	

*Annexe*

<b><i>E. coli</i> Rapitest</b>	Kalix	O157	-	-	
<b>Premier EHEC</b>	Meridian Diagnostics	O157	Colorimétrique	1 étape	
<b>GeneQuence</b>	Neogen	O157 et H7	Colorimétrique	Microplaque	
<b>BioGem</b>	Xenith BioMed	O157	Colorimétrique	1 étape	

## Annexe 05

Figure : Protocole de recherche de *E. coli* O157 dans l'aliment : méthode VIDAS ECO.

## Annexe 06

### Les différents milieux d'isolement des STEC

Le milieu BBL Chromagar O157 commercialisé par la société becton dickinson sert aussi à l'isolement, la différenciation et l'identification présumée d'E. coli O157: H7.

En raison de la présence de substrats chromogènes dans le milieu, les colonies d'E. coli O157: H7 produisent un colorant de couleur mauve, ce qui permet leur identification présumée à partir de la boîte de Pétri (Bouvier Marion, 2011).

### Isolement des E. coli O157 : H7

Des milieux sélectifs et spécifiques du sérotype O157: H7 sont aussi disponibles comme le milieu Mac Conkey Sorbitol (CT- SMAC) . Sur ce milieu, la microflore secondaire est inhibée par l'association entre les sels biliaires, le cristal violet, le céfixime et le tellurite de potassium. Après 24 heures d'incubation à 37°C, E. coli O157: H7 forme des colonies lisses, incolores, pouvant présenter un halo orangé d'alcalinisation. A titre d'information, ce milieu est utilisé dans la norme ISO 16654. (Bouvier Marion, 2011)

Un deuxième milieu spécifique d'E. coli O157: H7 existe : le milieu Chrom-ID O157: H7 (BioMérieux). Cette gélose contient un mélange d'hydrates de carbone et deux substrats chromogènes pour la détection de deux activités enzymatiques : la  $\beta$ -D-galactosidase présente chez toutes les souches d'E. coli quel que soit leur sérotype et la  $\beta$ -D-glucuronidase spécifique à toutes les souches d'E. coli non O157:H7. (Bouvier Marion, 2011)

**Tableau : Milieux d'isolement (Joffin, C et Joffin, N, 2003)**

		Mac Conkey Au Sorbitol	Mac Conkey au sorbitol et au BCIG <sup>(1)</sup>	Fluorocult® E. coli O157 : H7 Agar (Mreck)
Molécules organiques azotées	Peptone	20,0 g	20,0 g	20,0 g
	Extrait de viande			2,0 g
	Extrait de levure			1,0 g
Glucides	Sorbitol	10,0 g	10,0 g	10,0 g



Autres molécules carbonées	BCIG <sup>(1)</sup> MUG <sup>(2)</sup>		0,1 g	0,1 g
Indicateur de sulfure	Ammonium Fer III Citrate			0,5 g
Inhibiteurs	Sels biliaire n°3 Désoxycholate de sodium	1,5 g	1,5 g	
Indicateurs de pH	Rouge neutre Bleu de bromothymol PH final	30 mg  7,1	30 mg  7,1	25 mg
Ions minéraux ajoutés	NaCl Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,0 g	5,0 g	5,0 g 2,0 g
Agar		15,0 g	15,0 g	13,0 g
Eau	qsp	1 dm <sup>3</sup>	1 dm <sup>3</sup>	1 dm <sup>3</sup>

(1) BCIG 5- bromo-4- chloro-3- indolyl-D-β- glucuronide

(2) MUG 4- méthyl- umbelliféryl-β- glucuronide

**Tableau: Milieux d'enrichissement (Joffin, C et Joffin, N, 2003)**

		Bouillon TS à l'acriflavine <sup>(1)</sup> (produits laitiers)	Bouillon EC à la novobiocine <sup>(2)</sup> (viandes)
Molécules organiques azotées	Peptone trypticase- soja Tryptone Peptone de caséine	30,0 g	20,0 g
Glucides	Lactose		
Inhibiteurs	Sels biliaires n°3 Acriflavine <sup>(1)</sup> Novobiocine <sup>(2)</sup>	1,5 g 10 mg	1,12 g - 20 mg
Ions minéraux	NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- -	5,0 g 1,5 g

	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	4,0 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	1,25 g	
Eau	qsp	1 dm <sup>3</sup>	1 dm <sup>3</sup>

(1) Ajoutée extemporanément après autoclavage (ajouter dans 1 dm<sup>3</sup>, 2 cm<sup>3</sup> d'une solution de chlorhydrate d'acriflavine à 5 mg. cm<sup>3</sup> stérilisée par filtration, ou ajouter 0,45 cm<sup>3</sup> dans 225 cm<sup>3</sup> de milieu).

(2) Ajoutée extemporanément après autoclavage (ajouter dans 1 dm<sup>3</sup>, 1 cm<sup>3</sup> d'une solution de novobiocine à 20 mg. cm<sup>3</sup> stérilisés par filtration ou ajouter 0,225 cm<sup>3</sup> dans 225 cm<sup>3</sup> de milieu).