

**PREVALENCE ET CARACTERISATION
DE SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* O157 PRODUCTRICES DE SHIGATOXINES
ISOLEES DE DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE
EN BELGIQUE ET EN ALGERIE.**

**PREVALENCE AND CHARACTERIZATION
OF O157 SHIGATOXIN PRODUCING *ESCHERICHIA COLI*
ISOLATED FROM FOODSTUFFS FROM ANIMAL ORIGIN
IN BELGIUM AND ALGERIA**

THESE PRESENTEE PAR
AMINA CHAHED
EN VUE DE L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES
ORIENTATION MEDECINE VETERINAIRE

ANNEE ACADEMIQUE ; 2006-2007

Avant-propos

L'intérêt que j'ai porté aux *Escherichia coli* entérohémorragiques producteurs de shigatoxines a commencé, en 1998, lors de la préparation de mon mémoire de DES (Diplôme d'Etudes Spécialisées) en hygiène et technologie des denrées alimentaires sous la direction du professeur Georges Daube, dans le département des sciences des denrées alimentaires de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (FMV, ULg).

Les EHEC (enterohemorrhagic *Escherichia coli*) font partie de la famille des STEC ou Shiga-toxin producing *E. coli*. A cette époque, le nombre croissant d'épidémies liées à ces agents pathogènes, en Amérique du Nord et en Europe, ont interpellé les professionnels du secteur qui ont concentré leurs efforts pour mettre au point tous les moyens de recherche, d'identification, de maîtrise et de prévention du danger. Ces pathogènes émergents et agents zoonotiques et plus particulièrement le sérotype O157:H7 apparaissent comme un problème important de santé publique.

La prise de conscience du danger des souches attachantes et effaçantes de *Escherichia coli* (AEEC pour attaching and effacing *E.coli*) et en particulier des *E. coli* entérohémorragiques est due à leurs implications dans des cas mortels de syndrome hémolytique et urémique (SHU) suite essentiellement à la consommation de produits alimentaires contaminés, en particulier d'origine bovine.

Grâce aux moyens mis à ma disposition par le laboratoire national de référence en microbiologie des aliments de la FMV de Liège et par l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, j'ai pu entreprendre la préparation d'une thèse de doctorat en sciences vétérinaires. Le temps imparti à sa réalisation a permis de répondre aux objectifs premiers, à savoir une évaluation de la prévalence des *E. coli* producteurs de shigatoxines de sérotype O157 (STEC O157) dans les denrées alimentaires et de son évolution pendant plusieurs années dans le cadre des plans de surveillance mis en place par l'Institut d'Expertise Vétérinaire (IEV) et repris par l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) en Belgique.

Il m'a été permis aussi de suivre l'évolution des méthodes de diagnostic des STEC, des méthodes d'identification des facteurs de virulence ainsi que des nouvelles stratégies de contrôle de ces agents pathogènes à tous les niveaux de la chaîne alimentaire (réservoirs, denrées alimentaires) conformément aux nouveaux textes législatifs européens.

Parallèlement, il m'a été permis d'entreprendre des recherches en Algérie afin de montrer la présence des STEC O157 dans les filières de production de viandes destinées à la consommation humaine et d'évaluer leur prévalence. Il s'agit d'études préliminaires dont les résultats devront être discutés au

niveau des services vétérinaires. L'objectif est de collaborer pour la mise en place des mesures de prévention au niveau des abattoirs. Un deuxième objectif est de convaincre le milieu hospitalier d'introduire la recherche des STEC O157 et autres STEC dans le cadre du diagnostic des agents responsables de diarrhées au moins chez les populations à risque.

La recherche des STEC O157 chez les ovins présente un intérêt particulier car, d'après les données de la littérature, ces germes ont été très peu ou pas du tout recherchés sur les carcasses ovines.

Une comparaison de la situation en Belgique et en Algérie a pu être menée et des perspectives ont pu être envisagées.

Dans ce document, le terme STEC est utilisé pour désigner les *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines de sérotype O157 et autres sérotypes isolés de denrées alimentaires. Le terme EHEC sera réservé aux souches STEC directement impliquées dans des cas d'infections ou d'épidémies chez l'homme.

Remerciements

Cette thèse n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon directeur de recherche, Monsieur Georges Daube, Professeur de microbiologie des denrées alimentaires au département des sciences des denrées alimentaires et responsable du laboratoire national de référence en microbiologie des aliments, que je veux vivement remercier. La pleine confiance qu'il m'a accordée dès l'admission au programme m'a permis d'élaborer un plan de thèse propre à mes aspirations. Je voudrais aussi le remercier pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ces années. Je voudrais aussi le remercier d'avoir toujours trouvé du temps et de nous avoir fait l'honneur de répondre à toutes nos préoccupations en matière de collaborations. Les connaissances, le savoir faire et les conseils qu'il nous a toujours transmis sont et resteront précieux pour moi.

Je n'oublierai pas le Professeur Henry Vindevogel qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a permis dans des moments particuliers d'entreprendre les premières étapes de ma formation.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude à ces deux personnes autrement qu'en leur promettant d'agir comme eux avec des étudiants dans ma situation. J'éprouve un profond respect pour leur travail et leur parcours, ainsi que pour leurs qualités humaines.

J'aimerais par ailleurs souligner la contribution importante du Docteur Bernard China qui a été constamment à mes côtés, qui m'a aidée et soutenue dans le suivi quotidien de mes travaux. Son aide a été précieuse et les résultats obtenus tiennent essentiellement à son accompagnement. Merci Bernard pour ta compétence et le temps que tu as bien voulu m'accorder.

Je voudrais également remercier le Professeur Jacques Mainil, d'avoir bien voulu être membre de mon comité d'encadrement et de nous avoir accordé toutes les facilités pour mener à bien une partie des expériences au laboratoire de bactériologie et pathologie des maladies bactériennes. Un grand nombre de ses remarques constructives m'ont permis d'améliorer la structure et la présentation de la thèse.

Je voudrais remercier le Docteur Denis Piérard, du laboratoire national de référence des *E. coli* entéropathogènes (UZ-Brussel, anciennement AZ-VUB) d'avoir bien voulu être membre de mon comité d'encadrement et d'avoir participé à la révision de certains éléments de cette thèse. Merci pour l'intérêt qu'il a porté au sujet des cas d'infections à *Escherichia coli* entérohémorragiques en milieu hospitalier en Algérie ce qui peut nous encourager à poursuivre les recherches dans le domaine.

Mes remerciements vont aux membres de mon Jury pour le temps et l'attention qu'ils ont bien voulu me consacrer.

Merci à messieurs les Docteurs Bellal et Youyou de l’Institut National d’Agronomie à Alger pour avoir accepté d’être les collaborateurs incontournables pour les travaux réalisés en Algérie.

Merci au Docteur Nicolas Korsak qui m’a permis de collaborer et de présenter les résultats de l’étude qu’il a menée dans le cadre de l’implémentation du système HACCP dans les abattoirs en Belgique.

Merci à Yasmine Ghafir qui a mis à notre disposition toutes les données nécessaires à l’exploitation des résultats des plans de surveillance des agents zoonotiques en Belgique.

Je n’oublierai pas de remercier chaleureusement les enseignants du DES en sciences des denrées alimentaires d’origine animale et toutes les personnes du service de microbiologie des aliments et du département qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Merci aux membres du laboratoire de bactériologie et pathologie des maladies bactériennes et à toutes ces équipes, qui ont su créer une ambiance très sympathique d’entraide, pour leur accueil chaleureux durant mes multiples séjours en Belgique.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j’ai eu à travailler au sein de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège et j’en remercie ici l’ensemble des enseignants ainsi que l’ensemble du personnel de la faculté qui à un moment ou un autre m’ont apporté une aide précieuse.

Merci au Docteur Touati Kamel pour ses encouragements et son amitié

Mes remerciements vont aux responsables de l’IEV et de l’AFSCA en Belgique qui m’ont permis d’exploiter les résultats des plans de surveillance des agents zoonotiques dans les denrées alimentaires (travaux réalisés partiellement au laboratoire de microbiologie alimentaire de l’Université de Liège)

Mes remerciements vont à l’Ecole Nationale Vétérinaire d’Alger, à l’Institut Pasteur d’Alger et aux services du Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural en Algérie.

Ce travail a été effectué grâce au financement du Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique en Algérie dans le cadre des programmes de bourses de formation à l’étranger et grâce aux moyens d’encadrement et de recherche mis à notre disposition au niveau du laboratoire national de référence en microbiologie des aliments de la FMV de Liège.

Maman, ma plus grande richesse est de t'avoir. Merci pour tout ce que tu consens pour que nous puissions nous épanouir mon fils et moi. Merci de nous protéger.

A mon fils, Nazim, que ce modeste travail soit un exemple qui pourra t'aider à aller de l'avant dans ta vie. C'est ton courage dans des moments difficiles et ta maturité à l'âge de l'insouciance qui m'ont permis de réaliser mes travaux.

A mes étudiantes qui ont participé aux travaux réalisés en Algérie.

Mes encouragements à mes amies Bella Amina et Kadi Maya.

A ma très chère amie Mouni Ait Ouada, A toute sa famille.

A mes ami(e)s d'Algérie, de Belgique et de France (Vivianne, Vincianne, Rosa, Samia, Mahmoud)

. A mes amis de la société Nososclean.

A la mémoire des enseignants universitaires assassinés.

A la mémoire de mon grand père et de mon oncle.

Résumé

Certains *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines sont responsables de toxi-infections d'origine alimentaire qui se traduisent par des diarrhées mais aussi par des syndromes plus graves pour l'homme comme le syndrome hémolytique urémique pouvant provoquer la mort. Il s'agit d'agents zoonotiques dont le réservoir principal est le bovin et les autres ruminants. Les souches de STEC du sérotype O157:H7 sont responsables d'épidémies dans le monde causant des milliers de malades et des dizaines de morts. Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés (viande de boeuf peu cuite, produits laitiers non pasteurisés), la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (plus spécialement les bovins) et leur environnement.

Les facteurs de virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) sont principalement les protéines codées par un îlot de pathogénicité, "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE), impliquées dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement et de la diarrhée et les toxines de Shiga codées par des bactériophages et impliquées dans les syndromes extra-intestinaux. De nombreuses méthodes de diagnostic ont été développées pour identifier ce pathogène à partir des aliments. Elles regroupent des méthodes de bactériologie classique, des méthodes immunologiques et des méthodes moléculaires. Des mesures d'hygiène sont particulièrement importantes pour éviter la contamination des animaux à la ferme et celle de la viande à l'abattoir. Enfin, des modèles d'évaluation du risque ont été développés notamment afin de modéliser le comportement des STEC dans l'aliment.

La recherche et l'évaluation de la prévalence des STEC O157 dans les denrées alimentaires produites en Belgique s'inscrivent dans le cadre de l'implémentation progressive du système HACCP (directive 93/43/CEE) dans les industries alimentaires et dans le cadre de l'application des directives concernant les plans de surveillance des agents zoonotiques dans les états membres de l'Europe. La recherche et le suivi de l'évolution des STEC O157 dans les denrées alimentaires d'origine animale sont présentés dans ce document en trois parties distinctes du fait de l'évolution des méthodologies de recherche et des priorités fixées.

La première étude a permis d'évaluer le taux de contamination des carcasses de bœuf et de porcs par les STEC O157 dans neuf abattoirs dont la production est représentative de la production en Belgique. Trois cent dix carcasses de bœuf et 245 carcasses de porcs ont été soumises à un double écouvillonnage en surface (1500 cm² pour les carcasses de bœuf et 1200 cm² pour les carcasses de porcs) au niveau de sites spécifiques 2 à 4 heures après abattage. La méthode de recherche était basée

sur une courte étape d'enrichissement en bouillon nutritif (6h à 37°C), une immuno-concentration par la méthode de séparation immuno-magnétique (IMS), une étape de détection immuno-enzymatique (VIDAS ECO, BioMérieux) et un isolement sur milieu Mac Conkey au sorbitol et membranes petrifilm TM kit (3M). Lors de résultat positif, au moins cinq colonies sorbitol négatives et une colonie sorbitol positive isolées à partir du milieu SMAC sont testées au latex anti O157 (Dry-spot *E.coli* O157, Oxoid). L'identification de l'espèce a été réalisée par réaction biochimique sur galerie API 20E (Bio Mérieux) et sur gélose Rapid *E.coli* (Sanofi, Diagnostic Pasteur, Paris, France) pour la recherche de l'activité β glucuronidase. La caractérisation des gènes de virulence par PCR (Polymerase Chain Reaction) au niveau du laboratoire de référence belge par amplification des gènes *eae*, *stx1* et *stx2* (Dr Piérard, UZ-Brussel).

Cette étude a permis de standardiser la méthode d'échantillonnage et d'isoler la première souche de STEC O157:H- (*stx1+*, *stx2+*, *eae+*) potentiellement pathogène pour l'homme sur des carcasses bovines. Une première estimation de la prévalence des *E. coli* O157 (1 à 5 % pour les carcasses de bœuf) a été établie pour la Belgique.

La viande hachée de bœuf représente le risque majeur d'infections à STEC car elle est souvent consommée crue. Six cent vingt-sept échantillons de viandes hachées ont été testés pour la recherche des STEC O157 et pour la recherche des autres STEC ou AEEC par la méthode d'hybridation ADN/ADN sur colonies et confirmation des gènes de virulence par PCR. Un dénombrement des *E. coli* totaux comme indicateur d'hygiène a été effectué sur les échantillons testés au niveau du laboratoire national de référence en microbiologie des aliments de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (ULg).

Aucune souche typique de STEC O157 (*eae stx*) n'a été isolée au cours de cette deuxième étude.

La PCR a permis de détecter la présence d'un des gènes recherchés dans 45 échantillons et le gène *stx* dans 32 échantillons (5,1 %). Seulement 7 souches ont été isolées par la méthode d'hybridation ADN/ADN sur colonies.

Parmi elles, deux sont des *E. coli* de sérotype O91 (*stx2+*, *eae-*) et deux souches EPEC de sérotype O128 et trois de sérotypes non identifiés. Aucune ne présentait les caractéristiques typiques des STEC (*eae+*, *stx+*). De même, la qualité bactériologique des viandes hachées testées était satisfaisante puisque plus de 80 % des échantillons avaient un taux d'*E. coli* inférieur à 50 unités formant colonies (ufc) par gramme donc inférieur au critère légal de $m=50$ ufc/gramme et $M= 500$ ufc/g, $n=5$ et $c=1$ (Arrêté Royal du 4 juillet 1996). Les résultats obtenus au cours de cette deuxième étude rejoignent les résultats d'une autre étude réalisée au cours de la même période en Belgique sur des échantillons de viande issus de plusieurs espèces animales. Le risque de contamination par les STEC O157 semblait

faible en cette période, néanmoins, il n'était pas exclu de voir apparaître une épidémie comme ce fut le cas en Suède malgré la faible incidence de cas d'infections à STEC enregistrées dans ce pays.

La troisième étude répond à l'application des directives 92/117/CEE et 2003/99/CEE et décrit les plans de surveillance des STEC O157 dans les denrées alimentaires en Belgique pendant la période comprise entre 1997 à 2004. Les analyses ont été réalisées au niveau des laboratoires de référence en Belgique ainsi qu'au niveau des deux laboratoires de l'AFSCA (à partir de 2003). Parallèlement à la recherche des STEC O157, un dénombrement des *Escherichia coli* totaux comme indicateur d'hygiène a été effectué pour chaque échantillon analysé à partir de 1998.

Aucune souche de STEC O157 caractéristique n'a été isolée à partir des 1025 échantillons (matrices issues de bovins, porcs, volailles, lapins) testés en 1997. Ceci était probablement lié au faible nombre d'échantillons testés par matrice mais aussi à la méthode analytique utilisée. Un protocole plus sélectif devait permettre d'optimiser la méthode de détection des STEC O157 dans le futur. De même, un renforcement de la surveillance des STEC O157 dans les filières à risque, notamment la filière bovine, avait été préconisé.

En 1998, une modification de la méthode analytique (méthode SP-VG M001) validée par le laboratoire national de référence en microbiologie des aliments de l'ULg, a permis d'optimiser le niveau de détection et de diminuer la prévalence des faux positifs au test VIDAS ECO. Neuf souches de *E. coli* de sérotype O157 (*stx+*) et une souche de *E. coli* O157 (*stx-*) ont été isolées à partir de surfaces de 6010 carcasses regroupées en pools de 5 carcasses par échantillon (1202 pools).

Contrairement aux résultats de 1997, l'existence de souches STEC potentiellement pathogènes a été confirmée dans la filière bovine même si la prévalence enregistrée semblait faible (environ 0,15 %). Quatre vingt pourcents des souches STEC O157 portaient les gènes *stx₂*, *eae* et *ehxA* et 90 % portaient l'antigène H7.

A partir des résultats du dénombrement des *E. coli* par cm² de surfaces de carcasses, une courbe de distribution des percentiles a pu être réalisée. Les limites au percentile 75 (2 ufc/cm²) et au percentile 95 (55 ufc/cm²) étaient supérieures aux valeurs des critères définis par l'arrêté royal du 28 Août 2002 modifiant l'arrêté royal du 4 juillet 1996 (3m = 0,7 ufc/cm² et M = 20 ufc/cm²). Le niveau d'hygiène était en général insuffisant avec une majorité de firmes ne satisfaisant pas aux critères microbiologiques pour les *E. coli*. Cependant, aucune relation statistiquement significative entre les niveaux de contamination par les *E. coli* totaux et la présence d'*E. coli* O157 n'a pu être établie.

Les plans de surveillance des années 1999 à 2004 ont été marqués par une surveillance des STEC O157 sur un plus grand nombre d'entreprises, un plus grand nombre d'échantillons, une plus grande

surface de carcasses écouvillonnées et des recherches au stade du consommateur (cas du filet américain). En 1999, les recherches ont été effectuées sur les échantillons de bovins, de porcs, de poulet, de poules et sur des poissons. En 2000, des matrices de gros bovins, de veaux et de porcs ont été étudiées. En 2001, ce sont des matrices de bovins, de poulet et de poules qui ont été analysées. De 2002 à 2004, les recherches se sont focalisées sur la filière bovine.

Les carcasses de bœufs et de veaux et porcs ont été écouvillonnées au niveau de quatre sites à raison de 1600 cm² pour les bovins et 600 cm² pour les carcasses de porcs (Décision 2001/471/CE). Pour les autres matrices, 25 g de l'échantillon prélevé ont constitué la prise d'essai du laboratoire. La méthode de recherche des STEC O157 a été la méthode SP-VG M001. Le dénombrement des *E. coli* a été réalisé selon la méthode validée par l'AFNOR, SDP-07/1-07/93.

Des prévalences de STEC O157 égales à 1,3 % (25/1984) en 1999, 0,4 % (6/1501) en 2000, 1,08 % (13/1388) en 2001, 1,07 % (13/1225) en 2002, 0,82 % (10/1497) en 2003 et à 1,35 % (18/1337) en 2004 ont été mises en évidence sur les surfaces de **carcasses de bœuf** (n= 8904) ce qui montre une variation annuelle de 0,4 à 1,4 % entre 1999 et 2004 et une **moyenne pondérée de 0,95 %**.

Pour l'année 2000, La prévalence est significativement inférieure à celle des années 2001, 2002 et 2004 alors qu'entre les autres années, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Des valeurs proches, égales à 0,7 % au Danemark (EC, 2001), à 1,4 % au Royaume Uni (Chapman et al., 2001) et des valeurs plus élevées, à savoir 12 % en Italie (Bonnardi et al., 2001), 11 % en Irlande (Mc Evroy et al., 2003) ont été rapportées dans d'autres études.

En ce qui concerne les **viandes hachées**, la prévalence des STEC O157 est faible soit 0,1 % (1/974) en 1999, 0,4 % (1/487) en 2000, 1,68 % (5/298) en 2003. Aucun STEC O157 n'a été mis en évidence en 2001, 2002 et 2004. On a enregistré une **moyenne pondérée de 0,27%**. La présence de souches dans du haché de bœuf prélevé en grandes surfaces montre que des souches pathogènes se retrouvent parfois au stade de la distribution et constituent un danger direct pour le consommateur. De même à partir des 751 échantillons de **viandes de découpe** analysées entre 1999 et 2004, deux souches STEC O157 ont été isolées en 2003 et deux autres en 2004 soit une **prévalence de 0,52 %**. Ces résultats sont également proches des 0,4 % enregistrés au Royaume Uni (Chapman, 2001), 0,11 % en France (Afssa, 2003) et 0,2 % aux USA (Warren, 2002). La prévalence des STEC O157 dans les viandes hachées semble faible. Néanmoins, toute comparaison ou interprétation des résultats reste difficile à cause des différences d'échantillonnage et de procédures d'analyses et d'identification.

Les matrices de porcs, de poules, poulets et de poissons ne semblent pas présenter un danger à l'heure actuelle puisque aucun STEC O157 n'y a été mis en évidence à ce jour en Belgique.

De 1998 à 2004, 106 souches de STEC O157 ont été isolées et caractérisées à partir des matrices de bovins. La majorité des STEC O157 ont présenté le pathotype *stx₂*, *eae* et *ehxA*, le plus fréquemment impliqué dans les formes graves des infections. La majorité (81,1 %) appartient au sérotype O157:H7. Au cours de ces plans de surveillance, une amélioration de la contamination par les *Escherichia coli* a pu être observée à partir de 1999 aussi bien dans les firmes productrices de carcasses de bœuf qu'au niveau de la production des viandes hachées. Cependant, aucune association directe entre les taux élevés des *E. coli* totaux et la présence de STEC O157 n'a pu être établie. On peut en déduire que *E. coli* ne semble pas être un indicateur pour la présence de cet agent pathogène mais que, bien sûr, le niveau de contamination par les souches pathogènes doit diminuer en parallèle à la charge en *E. coli* totaux et que, donc, globalement le risque qu'elles présentent doit diminuer.

En Algérie, jusqu'à l'heure actuelle aucun plan officiel de surveillance des agents zoonotiques n'a été mis en place. Au cours de la quatrième étude, une méthode simplifiée de la recherche des STEC O157 et autres AEEC, a permis d'échantillonner 230 carcasses de bœuf produites dans un abattoir à Alger. Parmi elles, 18 se sont révélées positives pour la présence des STEC O157 soit une prévalence de 7,8 %. La majorité est potentiellement pathogène pour l'homme puisque 14 (78 %) d'entre elles ont présenté le pathotype *stx₂*, *eae* et *ehxA* et deux seulement sont H7, une a présenté le pathotype *stx₁ stx₂ eae ehxA*, une le pathotype *stx₁ eae ehxA* et deux sont *stx-*, *eae+ ehxA+*

En ce qui concerne les STEC non O157, 66 colonies (2,8 %) sur 2300 testées possédant au moins un des gènes recherchés, ont été isolées à partir de trente carcasses positives (13 %) à l'hybridation ADN/ADN sur colonies. Quarante (60,6 %) sont des EPEC (*eae+*, *stx-*), 23 sont (*stx+*, *eae-*) et trois isolées sur une même carcasse présentent le pathotype (*eae+*, *stx+*). Aucune de ces trois souches n'a agglutiné avec les sérums correspondant aux sérotypes les plus fréquents (O26, O111, O128, O103, O91, O145).

Plus de 65 % des carcasses avaient des niveaux de *E. coli* supérieurs à la limite d'acceptabilité définie par le critère microbiologique belge (20 ufc/cm²). Le percentile 75 était de 444 ufc/cm² et le percentile 95 de 2300 ufc/cm². Il en résulte que l'abattoir ne répond pas aux principales règles d'hygiène de production des viandes et que de tels taux de contamination fécale laissent supposer que si les animaux sont porteurs de STEC O157, le niveau de contamination des carcasses contaminées devrait être plus important qu'en Belgique.

Bien que le réservoir principal des STEC soit le bovin, les ovins peuvent être aussi porteurs de ces souches. Très peu de données sont disponibles en ce qui concerne la présence des STEC O157 sur les carcasses ovines. L'étude 5 a permis de mettre en évidence, par la méthode d'écouvillonnage des surfaces de carcasses conformément à la décision européenne 2001/471/CE, la présence de STEC O157 sur 4 des 160 carcasses testées soit une prévalence de 2,5 %. Le pathotype principal était *stx₂*, *eae* et *ehxA*. Toutes les souches isolées sont des STEC O157:H7.

L'étude du portage des STEC dans les matières fécales d'ovins présentés à l'abattoir a montré la présence du gène *stx* dans 27 matières fécales sur 106 testées par PCR multiplex (*eae*, *stx₁*, *stx₂*) soit une prévalence de 25,4 %. Pour celles-ci, le pathotype principal était *stx₁* (50 %) suivi du pathotype *stx₁*, *eae* (46,4 %). Les neuf souches STEC O157 possédant le gène *stx₂* ont été testées par PCR pour les sous-types c, d, e, f et seulement trois sont porteuses du variant *stx_{2d}*. Les autres PCR se sont révélées négatives.

En ce qui concerne l'espèce ovine, nos données sont proches des résultats d'une étude en Suisse qui a révélé la présence de STEC sans préciser le sérotype dans 29,9 % des matières fécales (Zweifel et al., 2004) Nos données confirment que l'ovin est aussi un réservoir important de STEC et peut être une source de contamination importante pour l'homme particulièrement en Algérie où la viande ovine est consommée en grande quantité.

En perspectives, au niveau Belge, les critères microbiologiques européens du règlement (CE) n°2073/2005 vont encore accentuer les efforts des industriels pour la maîtrise des agents pathogènes dans les filières à risque. Le développement des méthodes efficaces pour la recherche des autres sérotypes devrait permettre d'étendre la surveillance aux STEC non O157 les plus importants. Les données collectées au cours des plans de surveillance vont compléter les données disponibles pour une analyse du risque STEC O157 dans les filières à risque et particulièrement la filière bovine.

En Algérie, une application des plans HACCP au niveau des entreprises agroalimentaires et une surveillance des agents zoonotiques sont nécessaires. Des études complémentaires et approfondies grâce à la mise en place de moyens de diagnostic doivent être menées aussi bien au niveau humain qu'au niveau vétérinaire. Les résultats de ces études devront être considérés par la Direction des Services Vétérinaires du Ministère de l'Agriculture en Algérie.

Summary

Some Shigatoxin producing *Escherichia coli* are responsible for foodborne diseases which result by diarrhoeas but also in more serious syndromes for the human like the uraemic haemolytic syndrome which can cause death. They are zoonotic agents which major reservoirs are bovine and the other ruminants. The O157:H7 STEC isolates are responsible for numerous outbreaks in the worldwide in which they can cause thousands of ill people and tens of deaths.

The principal routes of transmission are usually consumption of contaminated foodstuffs (undercooked beef products, no pasteurized dairy products), vegetables, contaminated water ingestion, contact person to person and the contact with animals (in particular cattle) and their environment.

Virulence factors of Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) are mainly coded proteins by a small island of pathogenicity, LEE for “Locus of Enterocyte Effacement” involved in the formation of the lesion of attachment-effacement and of the diarrhoea and toxins of Shiga coded by bacteriophages and involved in the extraintestinal syndromes. Many methods of diagnosis were developed to identify this pathogen from food. They include classical methods of bacteriology, immunological and molecular methods. Hygiene control is particularly important to avoid the contamination of the animals to the farm and that of the meat at the slaughterhouse. In the end, risk assessment models have been developed in order to study the behaviour of STEC in the food chain

The search and the follow-up for the evolution of the STEC O157 in the foodstuffs of animal origin in Belgium (in accordance with the progressive establishment of system HACCP and the directives on the research of the zoonotic agents) are presented in this document in three distinct parts because of the evolution of research methodologies and the fixed priorities.

In order to manage and to control, via a HACCP plan, the microbiological risks associated with meat products, the first study in this document, made it possible to evaluate the rate of contamination of the beef and pigs carcasses by the STEC O157 in nine slaughterhouses of which the production is representative of the production in Belgium. The number of carcasses swabed was 310 beef carcasses and 245 pig carcasses. Carcasses were sampled in a cooling room between 2 and 4 h after slaughtering.

The samples had been executed with the help of sterile gauzes on well defined and specific sites of pig and beef carcasses (approximatively 1200 cm² and 1500cm² per carcass of pig and cattle, respectively). The gauzes resulting from five carcasses were placed in the same sterile stomacher bag. The method of research was based on a short step of enrichment in buffered peptone water broth (6H à 37°C), a immunoconcentration by the method of immunomagnetic separation (IMS), a step of immuno-enzymatic detection (VIDASTM O157 ECO, BioMérieux). The colonies have been directly

isolated on medium Sorbitol-Mac Conkey and with the help of the immunoblot method *E. coli* petrifilm TM kit (3M), typical colonies (5 sorbitol - and one sorbitol +) were agglutinated with latex anti-O157 (Oxoid) and the biochemical characters have been demonstrated on API 20^E TM (bioMérieux) and Rapid *E. coli* TM medium (Sanofi Diagnostic Pasteur). Virulence characters have been assayed by PCR by the Belgian reference laboratory (Dr. Denis Piérard, UZ-Brussel).

This study made it possible to standardize the sampling procedure and to isolate the first STEC O157 (*stx₁*, *stx₂*, *eae*) isolate from a foodstuff (beef carcasses) in Belgium. None STEC O157 was isolated from pig carcasses. It was a first estimate of the prevalence of *E. coli* O157 (1 to 5 % for the beef carcasses) which was established in Belgium.

Minced meat represents the major risk of infections with STEC because it is often consumed raw.

An official surveillance program about the detection of O157 and other enterohaemorrhagic serotypes in the biggest firm producing minced beef was realized in the second study. 627 minced meat samples were tested for the research of the STEC O157 and the research of the other STEC or AEEC by the method of hybridization ADN/ADN on colonies and confirmation of virulence genes by PCR. An enumeration of *E. coli* like indicator of hygiene was carried out on the samples tested. All analyses were performed by the laboratory of reference of the Veterinary Faculty of Medicine of the University of Liege.

No typical O157 STEC strain (*eae*, *stx*) was isolated from the minced meat.

The PCR made it possible to detect gene *stx* in 32 samples (5-1%) among the 45 positive for one of the required genes (*eae* or *stx*) but only 7 strains were isolated by the method of hybridization ADN/ADN on colonies. Among them, two are *E. coli* of serotype O91 (*stx₂*, *eae-*), two are EPEC of serotype O128 and three of serotype no identified. None of these strains isolated by hybridization showed the typical characteristics of the STEC (*eae+*, *stx+*).

In the same way, the bacteriological quality of the minced meats tested was satisfactory since more than 80 % of the samples had a level of *E. coli* lower than 50 colonies forming units (cfu) per gram thus lower than the legal criterion of $m=50$ cfu/g and $M = 500$ cfu/g, $n=5$ and $c=1$ (Royal Decree of July 4, 1996). The results obtained join the results of another study carried out during the same period in Belgium on meat samples resulting from several animal species. The risk of contamination by the STEC O157 seemed weak in this period. Nevertheless, it was not excluded to see appearing an epidemic as it was the case in Sweden in spite of the weak incidence of case of infections to STEC recorded in this country.

The third study lies within the scope of the application of directives (92/117/CEE and 2003/99/CEE on the survey of zoonoses and zoonotic agents and regulation 2160/2003 on the control of *Salmonella* and other zoonotic agents present in food chain and presents the plans of monitoring of the O157 STEC in

the foodstuffs in Belgium for the period ranging between 1997 to 2004. The analyses were carried out by the laboratories of reference in Belgium and by two laboratories of the Federal Agency for Safety of the Food Chain (FASFC) (from 2003).

Parallel to the research of the STEC O157, an *Escherichia coli* counting like indicator of hygiene was carried out for each sample analyzed since 1998. No typical O157 STEC was isolated from the 1025 samples (cattle, pig, poultry and rabbit matrixes) tested in 1997. This was probably related on the low number of samples tested by matrixe but also to the analytical method used. A more selective protocol was to make it possible to optimize the method of detection of the O157 STEC in the future and a reinforcement of the monitoring of the O157 STEC in the sector to risk, in particular the bovine sector had been recommended.

In 1998, a modification of the analytical method (method SP-VG M001) validated by the national laboratory of reference of ULg, made it possible to optimize the level of detection and to decrease the prevalence of the false positive to the test VIDAS ECO. Nine strains of *E coli* of sérotype O157 (*stx*+) and one *E coli* O157 (*stx* -) were isolated from surfaces from 6010 carcasses gathered in pools from 5 carcasses per sample (1202 pools). Contrary to the results of 1997, the existence of potentially pathogenic STEC O157 was confirmed in the bovine carcasses even if the recorded prevalence seems weak (minimum 0-15 %). Four twenty percents of O157 STEC isolates carried the genes *stx*₂, *eae* and *ehxA* and 90 % carried the antigen H7. From the results of the *E coli* counting per cm² of surfaces of carcasses, a curve of distribution of the percentiles could be carried out.

The limits with percentile 75 (2 ufc/cm²) and with percentile 95 (55 ufc/cm²) were higher than the values of the criteria defined by the royal decree of August 28, 2002 modifying the royal decree of July 4, 1996 (3m=0-7 cfu/cm² and M=20 cfu/cm²). That means that the level of hygiene was in general insufficient with a majority of firms not satisfying the microbiological criteria for the *E coli*. However, no statistically significant relation between the levels of contamination by the total *E. coli* and the presence of O157 *E. coli* could be established.

The plans of monitoring of the years 1999 to 2004 were marked by a monitoring of the O157 STEC in a greater number of companies, a greater number of samples, a greater surface of swabbed carcasses (1600 cm² for beef and 600 cm² for the pork) and research at the stage of the consumer (case of the raw minced beef meat). The method of research of the O157 STEC is the method SP-VG M001. The enumeration of the *E coli* was carried out according to the method validated by AFNOR SDP-07/1-07/93.

All of the 153 aquaculture fish samples analysed in 1999 were negative.

One hundred and sixty three pork carcasses were analysed in 2000 with 145 cut samples and 159 minced meat samples. All these were negative for the presence of EHEC O157.

For veal the 157 carcasses samples analysed in 2000 were negative.

In 2001, 243 broiler skin samples, 181 fillets samples, and 152 layer skin samples were analysed in 2001. All samples were negative.

For bovine carcasses (n= 8904), the prevalences of O157 STEC were equal to 1,3 % (25/1984) in 1999, 0,4 % (6/1501) in 2000, 1,08 % (13/1388) in 2001, 1,07 % (13/1225) in 2002, 0,82 % (10/1497) in 2003 and with 1,35 % (18/1337) in 2004. An annual variation from 0,4 to 1,4 % between 1999 and 2004 and one weighted average of 0,95 % was registered. For year 2000, the prevalence is significantly lower than that of years 2001, whereas between the other years, no significant difference could be highlighted. Close values, equal to 0,7 % to Denmark (EC, 2001) to 1,4 % in the United Kingdom (Chapman and al., 2001) and of more raised values, namely 12 % in Italy (Bonnardi and al., 2001), 11 % in Irish (Mc Evroy and al., 2003) were brought back in other studies.

The prevalence of the O157 STEC in minced meat (n= 2588) is weak: 0,1 % (1/974) in 1999, 0,4 % (1/487) in 2000, 1,68 % (5/298) in 2003. No STEC O157 was highlighted into 2001, 2002 and 2004. One records an average weight of 0,27 %.

The presence of O157 STEC on the retail level shows that pathogenic strains are found sometimes at the stage of the distribution and constitute a direct hazard to the consumer. In the same way starting from the 751 meat samples of cutting analyzed between 1999 and 2004, two STEC O157 strains were isolated into 2003 and two others in 2004. The prevalence was equal to 0,52 %. The same results were registered: 0,4% in United Kingdom (Chapman and al., 2001), 0,11 % in French (AFSSA, 2003) and 0,2 % in USA (Warren, 2002). The prevalence of the STEC O157 in the minced meats seems weak. Nevertheless, any comparison or interpretation of the results remains difficult because of the differences of sampling and procedures of analysis and identification.

From 1998 to 2004, 106 STEC O157 strains were isolated from bovine samples and were characterized. The majority of the STEC O157 presented the pathotype *stx₂*, *eae* and *ehxA*, most frequently implied in the serious forms of the infections. The majority (81,1 %) revealed the H7 antigen.

During these plans of monitoring, an improvement of the contamination by *Escherichia coli* could be observed since 1999, in the producing firms of beef carcasses as well as on the level of the production of the beef minced meat. However, no direct association between the high rates of total *E. coli* and the presence of STEC O157 could be established. We deduce that *E. coli* level does not seem to be an indicator for the presence of this pathogenic agent but only, of course, the level of contamination by the pathogenic STEC to decrease in parallel with total *E. coli* counts and thus the risk which they present must decrease.

In Algeria, up to now, no official plan of monitoring of the zoonotic agents was set up. In the fourth study, two-hundred and thirty carcasses were swabbed and tested by a classical method of *E. coli* counts and for the presence of pathogenic O157 STEC and for the other AEEC by the method of colony DNA/DNA hybridization and confirmation of genes of virulence (*stx₁*, *stx₂*, *eae*, *ehxA*) by multiplex PCR and Real-time PCR.

For pathogenic *E. coli* O157, more than 7-8 % of the tested carcasses were positive. Eighteen *E. coli* O157 strains were isolated and typed by multiplex PCR. The main isolated pathotype (78 %) was *eae stx₂ ehxA* and only two strains were H7 positive. One strain presented the *eae stx₁ ehxA* pathotype and one strain presented the *eae stx₁ stx₂ ehxA* pathotype. All isolated strains were potentially pathogenic for human beings. Two isolates presented *stx- eae+ ehxA+* pathotype.

In addition to O157 *E. coli*, other attaching and effacing *E. coli* were also detected from carcasses by colony hybridization after pre enrichment and plating on sorbitol Mac Conkey agar using *eae*, *stx₁* and *stx₂* probes. Thirteen carcasses (13 %) on the 230 analysed harboured at least one colony positive for one of the tested probes. These positive carcasses were different from thoses positive for O157 *E. coli*. Sixty six colonies (2,9 %) positive by colony hybridization were isolated. The majority (60,6 %) of the positive strains harboured an enteropathogenic *E. coli*-like pathotype (*eae+*, *stx-*), 23 were (*stx+*, *eae-*). Only three STEC (*eae+*, *stx₁+*) colonies were isolated from the same carcass. These isolates did not belong to classical STEC serotypes. In this study, the global hygiene of the slaughterhouse was low, as indicated by the high level of *E. coli* counts with a 75th percentile of 444 cfu/cm² and a 95th percentile of 2300 cfu/cm². The prevalence of both O157 *E. coli* and other AEEC was also high representing a real hazard for consumers.

It results from it that the slaughterhouse does not answer the principal rules of hygiene of production of the meat and that such level of faecal contamination let suppose that if the animals are carrying O157 STEC, the level of contamination of the carcasses should be higher than in Belgium.

Although the principal reservoir of the STEC is the bovine one, the sheep can also be carriers of these strains. Very few data are available with regard to the presence of the O157 STEC on the ovine carcasses. Study V made it possible to highlight, by the same method (swabbing of surfaces of carcasses) in accordance with European decision 2001/471/CE, the presence of O157 STEC on 4 (2,5 %) of the 160 carcasses tested. The principal pathotype was *stx₂, eae and ehxA*. All the isolated strains were STEC O157:H7. Nine O157 STEC isolates having the gene *stx₂* were tested by PCR for the sub-types c, d, e, f and only three are carrying the *stx2d* variant. The other PCR appeared negative. In the same way, the study of the carrying of the STEC in the faeces of sheep presented at the slaughterhouse showed the presence of the gene *stx* in 27 faeces out of 106 (25,4 %) tested by PCR multiplex (*eae*, *stx₁*, *stx₂*). For those, the principal pathotype was *stx₁* (50 %) followed-up of the pathotype *stx₁, eae* (46,4 %). With regard to the ovine species, our data are similar to the results of a study in Switzerland. This one revealed the presence of STEC without specifying the serotype in 29,9

% of the faeces (Zweifel and al., 2004). Our data confirm that the sheep is also a significant reservoir of STEC and can be a source of significant contamination for the human beings particularly in Algeria where meat sheep is consumed in great quantity.

In prospects, at the Belgian level, the European microbiological criteria of Parliament Regulation (EC) n°2073/2005 will still accentuate the efforts of the operators for the control of the pathogenic agents in the sectors to risk. The development of the effective methods for research of the others serotypes should make it possible to extend the monitoring to the most significant non-O157 STEC. The collected data during monitoring plans will supplement the data available for an analysis of risk of O157 STEC in the exposed sectors and especially in the bovine sector. In Algeria, a better application of HACCP plans at the level of the food industries and a monitoring of the zoonotic agents are necessary.

Complementary and thorough these studies set up of diagnostic tools must be led as well at the human level as at the veterinary one. The results of these studies will have to be considered by the Management of the Veterinary Services of the Ministry for Agriculture in Algeria.

Table des matières

Avant-propos-----	2
Remerciements -----	4
Résumé -----	7
Summary-----	13
INTRODUCTION-----	31
1. DEFINITIONS ET NOMENCLATURE.-----	33
2. PATHOLOGIES HUMAINES ET ANIMALES LIEES AUX STEC-----	34
3. FACTEURS DE VIRULENCE DES SOUCHES STEC-----	35
3.1. Les Shigatoxines.-----	36
3.1.1. Génétique et structure des Shigatoxines-----	36
3.1.2. Mécanismes d'action des Shigatoxines -----	36
3.1.3. Les variants des toxines Stx-----	37
Les toxines Stx1-----	37
Les toxines Stx2-----	37
3.1.4. Association à la symptomatologie -----	39
3.2. La lésion d'attachement-effacement-----	42
3.2.1. La génétique -----	42
3.2.2. Les mécanismes de la lésion. -----	44
3.2.3. Les protéines impliquées :	45
L'intimine -----	45
Les protéines du système de sécrétion de type III -----	45
Les protéines formant le translocon -----	45
Les protéines effectrices codées par le LEE -----	45
Les protéines effectrices non-codées par le LEE. -----	47
3.3. Les autres facteurs potentiels de virulence-----	47
3.3.1. Les autres îlots de pathogénicité-----	47
3.3.2. L'adhésine SAA.-----	47
3.3.3. L'adhésine F18-----	48
3.3.4. Les plasmides-----	48
3.3.5. L'entérotoxine EAST1-----	48
3.3.6. La toxine CDT -----	48
4. METHODES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES STEC-----	49
4.1. Isolement et détection de <i>E. coli</i> O157-----	49
4.1.1. Utilisation des caractéristiques biochimiques pour l'isolement de <i>E. coli</i> O157 -----	49
4.1.2. Tests immunodiagnostiques utilisant des anticorps dirigés contre l'antigène O157 -----	49
4.1.3. Protocole de recherche de <i>E. coli</i> O157 dans les aliments -----	50
Etape d'enrichissement-----	51
Etape de séparation-concentration-----	51
Isolement d' <i>E. coli</i> O157 sur milieux sélectifs -----	52
Tests de confirmation et d'identification des <i>E. coli</i> O157-----	52
4.2. Détection des STEC non O157-----	53
4.3. Méthodes de caractérisation des STEC-----	54
4.3.1. Détection de la production de Shigatoxines -----	54
4.3.2. Méthodes génétiques pour la détection des STEC dans les aliments -----	55
Les systèmes P.C.R. -----	55
L'hybridation ADN/ADN -----	58
4.4. Le typage moléculaire des STEC-----	58
4.4.1. Relations clonales entre les souches O157:H7. -----	59
4.4.2 Relations clonales entre les STEC non O157 -----	60

5. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR LES STEC -----	60
5.1. Emergence des <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shigatoxines -----	60
5.2. Epidémiologie humaine-----	63
5.2.1. Sérogroupes incriminés -----	63
5.2.2. Incidence des infections humaines aux STEC: -----	63
5.3. Modes de transmission-----	71
5.3.1. La transmission alimentaire -----	71
5.3.2. La transmission inter-humaine-----	73
5.3.3. La transmission par contact direct avec les animaux-----	73
5.3.4. Les autres modes de transmission-----	73
5.4. Epidémiologie environnementale-----	74
5.4.1. Le portage par les animaux d'élevage -----	74
Portage par les bovins -----	74
Conditions de survie des STEC dans les matières fécales de bovins.-----	75
Influence des conditions d'élevage sur la survie et la résistance des STEC -----	76
5.4.2. Le portage par d'autres espèces de ruminants -----	79
5.4.3. Le portage des STEC par des animaux de compagnie. -----	79
5.4.4. Le portage chez les oiseaux -----	79
5.4.5. L'environnement-----	80
6. L'EVALUATION DU RISQUE LIE AUX STEC O157-----	81
6.1. L'identification des dangers -----	81
6.2. L'évaluation de l'exposition. -----	82
6.3. La caractérisation du danger -----	82
6.4. La caractérisation du risque-----	83
7. EVOLUTION DE LA REGLEMENTATION EUROPEENNE EN MATIERE DE SECURITE DES ALIMENTS-----	85
OBJECTIFS-----	90
PARTIE EXPERIMENTALE -----	Erreur ! Signet non défini.
I. EN BELGIQUE-----	Erreur ! Signet non défini.
Etude I. Evaluation du taux de contamination par les STEC de sérotype O157 de carcasses de bœuf et de porcs dans 9 abattoirs -----	Erreur ! Signet non défini.
I. Justification de l'étude -----	Erreur ! Signet non défini.
II. Matériel et méthodes -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Lieux et périodes de prélèvements.-----	Erreur ! Signet non défini.
2. Matrices analysées et nombre de prélèvements effectués-----	Erreur ! Signet non défini.
3. Méthodes d'échantillonnage par écouvillonnage des surfaces de carcasses --	Erreur ! Signet non défini.
4. Méthodes de recherche des <i>E. coli</i> O157 (figure I.3) -----	Erreur ! Signet non défini.
III. Résultats-----	Erreur ! Signet non défini.
IV. Conclusions -----	Erreur ! Signet non défini.
Etude II. Etude de la prévalence des <i>Escherichia coli</i> producteurs de shigatoxines dans les viandes hachées en Belgique.-----	Erreur ! Signet non défini.
I. Justification de l'étude -----	Erreur ! Signet non défini.
II. Plans d'échantillonnage et méthodologie de recherche des STEC. -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Échantillonnage-----	Erreur ! Signet non défini.
2. Méthodologie de recherche des STEC O157 et autres STEC -----	Erreur ! Signet non défini.
2.1. Recherche de la présence de souches portant l'antigène O157 (figure II.1)-----	Erreur ! Signet non défini.
2.2. Recherche des gènes codant pour les vérocytotoxines par PCR-----	Erreur ! Signet non défini.
2.2.1 Réalisation de la PCR -----	Erreur ! Signet non défini.

2.2.2. Conditions de PCR-----	Erreur ! Signet non défini.
2.2.3. Détection des produits d'amplification -----	Erreur ! Signet non défini.
2.3. Caractérisation des souches isolées par hybridation ADN/ADN sur colonies --	Erreur ! Signet non défini.
3. Dénombrement des <i>E. coli</i> totaux-----	Erreur ! Signet non défini.
III. Résultats-----	Erreur ! Signet non défini.
1. Dénombrements des <i>Escherichia coli</i> totaux-----	Erreur ! Signet non défini.
2. Prévalence d' <i>E. coli</i> O157 isolés à partir des viandes hachées---	Erreur ! Signet non défini.
3. Prévalences des autres STEC/AEEC-----	Erreur ! Signet non défini.
3.1. Prévalence d'échantillons positifs par PCR -----	Erreur ! Signet non défini.
3.2. Isolement et caractérisation des souches par hybridation ADN/ADN sur colonies-----	Erreur ! Signet non défini.
3.3. Résultats individuels des échantillons positifs après PCR et caractérisation des souches-----	Erreur ! Signet non défini.
IV. Conclusion-----	Erreur ! Signet non défini.

Etude III. Surveillance du taux de contamination des denrées alimentaires d'origine animale par des souches d'*Escherichia coli* du sérotype O157 en Belgique de 1997 à 2004 Erreur ! Signet non défini.

A. Préambule-----	Erreur ! Signet non défini.
B. Plan de surveillance de l'année 1997 -----	Erreur ! Signet non défini.
I. Justification de l'étude -----	Erreur ! Signet non défini.
II. Plans d'échantillonnage et méthodologie de recherche-----	Erreur ! Signet non défini.
1. Choix des matrices -----	Erreur ! Signet non défini.
2. Matrices investiguées-----	Erreur ! Signet non défini.
2.1. Bovins et porcins -----	Erreur ! Signet non défini.
2.2. Volailles et lapins -----	Erreur ! Signet non défini.
3. Nombre d'entreprises échantillonnées : -----	Erreur ! Signet non défini.
4. Méthodologie d'échantillonnage -----	Erreur ! Signet non défini.
4.1. Ecouvillonnages -----	Erreur ! Signet non défini.
4.2. Prélèvements -----	Erreur ! Signet non défini.
5. Nombre d'échantillons testés pour la recherche des <i>E. coli</i> O157 ---	Erreur ! Signet non défini.
6. Recherche des STEC de sérotype O157 (figure III.3)-----	Erreur ! Signet non défini.
III. Résultats -----	Erreur ! Signet non défini.
IV. Conclusions-----	Erreur ! Signet non défini.

C : Plan de surveillance : année 1998-----	Erreur ! Signet non défini.
I. Justification de la surveillance -----	Erreur ! Signet non défini.
II. Plan d'échantillonnage et méthodologie de recherche-----	Erreur ! Signet non défini.
1. Matrices investiguées-----	Erreur ! Signet non défini.
2. Réalisation de l'échantillonnage-----	Erreur ! Signet non défini.
2.1. Période de prélèvement-----	Erreur ! Signet non défini.
2.2. Répartition par laboratoire -----	Erreur ! Signet non défini.
3. Nombre d'entreprises échantillonnées en 1998 -----	Erreur ! Signet non défini.
4. Types et méthodologie d'échantillonnage -----	Erreur ! Signet non défini.

4.1. Ecouvillonnages -----	Erreur ! Signet non défini.
4.2. Transport des échantillons -----	Erreur ! Signet non défini.
5. Paramètres mesurés et méthodes analytiques-----	Erreur ! Signet non défini.
5.1. Méthode de recherche des STEC de sérotype O157 (figure III.4). ---	Erreur ! Signet non défini.
5.2. Recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence et caractérisation des souches O157 isolées.-----	Erreur ! Signet non défini.
5.3. Dénombrement des <i>E. coli</i> indicateurs de contamination fécale- -Erreur ! Signet non défini.	
6. Statistiques -----	Erreur ! Signet non défini.
III. Résultats -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Résultats de la recherche et évaluation de la prévalence des <i>E. coli</i> O157	Erreur ! Signet non défini.
2. Caractérisation des <i>E. coli</i> O157-----	Erreur ! Signet non défini.
3. Contamination par les <i>E. coli</i> totaux des carcasses de bœuf --	Erreur ! Signet non défini.
4. Niveau d'hygiène des entreprises échantillonnées ayant révélé la présence d'au moins un STEC O157-----	Erreur ! Signet non défini.
IV. Conclusions -----	Erreur ! Signet non défini.
D. Plan de surveillance: années 1999-2004 -----	Erreur ! Signet non défini.
I. Justification du plan de surveillance. -----	Erreur ! Signet non défini.
II. Plan d'échantillonnage et méthodologie de recherche des STEC O157 -	Erreur ! Signet non défini.
1. Matrices investiguées et nombres d'entreprises échantillonnées -----	Erreur ! Signet non défini.
2. Types et méthodologie d'échantillonnage -----	Erreur ! Signet non défini.
2.1. Ecouvillonnage des carcasses de bœuf, veaux et porcs---	Erreur ! Signet non défini.
2.2. Viandes-----	Erreur ! Signet non défini.
3. Transport -----	Erreur ! Signet non défini.
4. Paramètres et méthodes analytiques -----	Erreur ! Signet non défini.
III. Résultats -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Prévalence des STEC O157 -----	Erreur ! Signet non défini.
2. Propriétés des souches d' <i>E. coli</i> pathogènes isolées : sérotypes et caractérisation des facteurs de virulence.-----	Erreur ! Signet non défini.
3. Répartition des prélèvements positifs en fonction du temps et de la firme -	Erreur ! Signet non défini.
4. Dénombrement des <i>E. coli</i> totaux -----	Erreur ! Signet non défini.
4.1. Les carcasses bovines.-----	Erreur ! Signet non défini.
4.2. La viande hachée de bœuf.-----	Erreur ! Signet non défini.
4.3. Relation entre la présence des STEC O157 et le dénombrement des <i>E. coli</i> totaux -----	Erreur ! Signet non défini.
IV. CONCLUSIONS -----	Erreur ! Signet non défini.
II: EN ALGERIE -----	Erreur ! Signet non défini.
ETUDE IV : Evaluation du taux de contamination des carcasses bovines par les <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques du sérotype O157 et d'autres <i>Escherichia coli</i> attachantes et effaçantes -----	Erreur ! Signet non défini.
I. Justifications de la recherche -----	Erreur ! Signet non défini.
II. Matériel -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Lieu des prélèvements -----	Erreur ! Signet non défini.
2. Matrices analysées et méthodes de prélèvements :-----	Erreur ! Signet non défini.
III. Méthodes analytiques -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Méthodes de recherche des STEC O157-----	Erreur ! Signet non défini.

2. Caractérisation des gènes de virulence par PCR classique et PCR en temps réel ----	Erreur ! Signet non défini.
3. Recherche des autres sérotypes de STEC par hybridation ADN/ADN sur colonies:	Erreur ! Signet non défini.
4. Dénombrement d' <i>E. coli</i> -----	Erreur ! Signet non défini.
IV. Résultats et Discussion -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Analyse de l'hygiène par comptage des <i>E. coli</i> totaux -----	Erreur ! Signet non défini.
2. Prévalence des <i>Escherichia coli</i> O157 -----	Erreur ! Signet non défini.
3. Caractérisation des souches isolées par PCR multiplex -----	Erreur ! Signet non défini.
4. Résultats de la recherche des autres sérotypes de STEC/AEEC -	Erreur ! Signet non défini.

ETUDE V. Evaluation du taux de contamination des carcasses ovines produites dans la région d'Alger par les <i>Escherichia coli</i> de sérotype O157 et autres <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxines. -----	Erreur ! Signet non défini.
I. Justifications de la recherche -----	Erreur ! Signet non défini.
II. Lieux de prélèvements-----	Erreur ! Signet non défini.
III. Méthodologie de recherche des STEC-----	Erreur ! Signet non défini.
1. Méthodes de recherche et de typage des <i>E. coli</i> O157 -----	Erreur ! Signet non défini.
2. Recherche des STEC dans les matières fécales d'ovins-----	Erreur ! Signet non défini.
3. Evaluation du niveau d'hygiène de l'abattoir-----	Erreur ! Signet non défini.
IV. Résultats -----	Erreur ! Signet non défini.
1. Prévalence des STEC O157 sur les carcasses-----	Erreur ! Signet non défini.
2. Prévalence des souches STEC dans les matières fécales ovines. -----	Erreur ! Signet non défini.
3. Evaluation de l'hygiène de l'abattoir-----	Erreur ! Signet non défini.

DISCUSSION GENERALE -----	Erreur ! Signet non défini.
----------------------------------	------------------------------------

1. Organisation et évolution des plans de surveillance des STEC en Belgique- -----	Erreur ! Signet non défini.
1.1. Méthodologie de recherche: -----	Erreur ! Signet non défini.
1.1.1. Les plans d'échantillonnage-----	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2. Le choix des entreprises échantillonnées-----	Erreur ! Signet non défini.
1.1.3. La procédure d'échantillonnage: -----	Erreur ! Signet non défini.
1.1.4. Les méthodes de recherche des STEC O157 -----	Erreur ! Signet non défini.
1.1.5. La détection des STEC non O157-----	Erreur ! Signet non défini.
1.2. Prévalence des STEC en Belgique-----	Erreur ! Signet non défini.
1.2.1. Historique ou rétrospective des premières études réalisée sur l'homme et les animaux en Belgique-----	Erreur ! Signet non défini.
1.2.2. La prévalence des STEC O157 dans les denrées alimentaires en Belgique -----	Erreur ! Signet non défini.
1.2.2.1. Recherche des STEC O157 dans les viandes hachées et carcasses de bœufs au cours des deux premières études (I et II) -----	Erreur ! Signet non défini.
1.2.2.2. Prévalence des STEC O157 dans les denrées alimentaires d'origine animale -----	Erreur ! Signet non défini.
1.2.3. Caractérisation des souches STEC O157 isolées en Belgique-----	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4. Pertinence de la mise en place de critères microbiologiques (<i>E.coli</i> et STEC O157) -----	Erreur ! Signet non défini.
1.2.5. Procédure d'alerte en cas de détection d'un STEC O157 ---	Erreur ! Signet non défini.
2. Prévalence des STEC en Algérie-----	Erreur ! Signet non défini.
2.1. Chez les bovins -----	Erreur ! Signet non défini.
2.1.1. L'hygiène -----	Erreur ! Signet non défini.
2.1.2. Les STEC -----	Erreur ! Signet non défini.

2.2	Chez les ovins.	-----	Erreur ! Signet non défini.
3.	Perspectives	-----	Erreur ! Signet non défini.
	Bibliographie	-----	Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures

Figure 1. Micrographie électronique de la lésion d'attachement et d'effacement

Figure 2. Schéma des principaux éléments génétiques responsables de la virulence des *E. coli* producteurs de shigatoxines

Figure 3. Schéma des mécanismes de l'interaction entre un *E. coli* porteur du LEE et un entérocyte

Figure 4. Schéma de la détection et de l'identification des souches STEC O157 à partir d'aliments (norme ISO 16154)

Figure 5. Apparition des clones épidémiques STEC O157

Figure 6. Incidence des infections à STEC O157 dans divers pays européens

Figure I.1. Zones de prélèvement chez le porc

Figure I.2. Zones de prélèvement chez le bovin

Figure I.3. Méthodes de recherche des STEC O157

Figure II.1. Schéma d'isolement et de caractérisation des souches

Figure III.1. Zones écouvillonnées sur les carcasses de porcs

Figure III.2. Zones écouvillonnées sur les carcasses de bovins

Figure III.3. Schéma pour l'isolement des STEC O157

Figure III.4. Schéma d'isolement des STEC (méthode SP-VG M001)

Figure III.5. Répartition des comptages en *E. coli* totaux par cm² de surfaces de carcasses de bœuf en 1998

Figure III.6. Répartition des comptages en *E. coli* totaux par cm² de surfaces de carcasses de bœuf pour les années 1999 à 2004

Figure III.7. Répartition des comptages en *E. coli* totaux par gramme de surfaces de viande hachée de bœuf pour les années 1999, 2000, 2003 et 2004

Figure IV.1. Isolement des STEC O157

Figure IV.2. Dénombrement des *E. coli* en percentiles

Figure IV.3. Détermination du pathotype par PCR multiplex classique

Figure IV.4. Résultats de la PCR en temps réel multiplex pour une souche *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehxA* positive

Figure V.1. Résultats des dénombrements d'*E. coli* sur les carcasses ovines en Algérie

Liste des tableaux

- Tableau 1. Différents types de variants *stx* isolés chez l'homme et les animaux
- Tableau 2. Exemples de systèmes PCR utilisés pour la détection des STEC
- Tableau 3. Exemples d'épidémies à STEC O157 dans le monde
- Tableau 4. Incidence des infections à STEC O157 en Europe
- Tableau 5. Exemples de prévalences de STEC O157 au niveau des denrées alimentaires
- Tableau 6. Prévalence des STEC O157 dans les matières fécales de bovins hors Europe
- Tableau 7. Prévalence des STEC O157 dans les matières fécales de bovins en Europe
- Tableau I.1. Nombre de prélèvements effectués par abattoir
- Tableau I.2. Prévalences des *E. coli* O157 et caractéristiques des souches isolées
- Tableau II.1. Amorces utilisées pour la recherche des facteurs de virulence
- Tableau II.2. Conditions de PCR
- Tableau II.3. Caractéristiques des souches témoins isolées
- Tableau II.4. Caractéristiques des sondes génétiques utilisées
- Tableau II.5. Résultats des dénombrements d'*E. coli* β -glucuronidase positifs à 44°C
- Tableau II.6. Résultats de PCR à partir du mélange de colonies présentes sur gélose SMAC
- Tableau II.7. Résultats des hybridations et pathotypes isolés
- Tableau II.8. Confirmation et caractérisation des souches *stx* et/ ou *eae* positives et détermination du sérotype
- Tableau III.1. Nombre d'entreprises par type de matrices
- Tableau III.2. Nombre d'échantillons testés par matrice
- Tableau III.3. Nombre d'échantillons VIDAS ECO positifs et identification des souches portant l'antigène O157 pour les échantillons analysés par l'ULg
- Tableau III.4. Caractérisation des *E. coli* O157:H7 isolés (AZ-VUB)
- Tableau III.5. Caractéristiques des STEC O157 isolés
- Tableau III.6. Dénombrements des *E. coli* dans les firmes présentant au moins un échantillon contaminé par les STEC O157 et interprétation par rapport aux critères de l'Arrêté royal du 28 août 2002
- Tableau III.7. Nombre d'*E. coli* totaux sur le lots de carcasses positifs pour STEC O157

Tableau III.8. Matrices prélevées pour la recherche de STEC O157 (1999-2004)

Tableau III.9. Nombre d'entreprises échantillonnées (1999-2004)

Tableau III.10. Propriétés des souches d'*E. coli* pathogènes : sérotypage et caractérisation des facteurs de virulence

Tableau III.11. Comparaison des prévalences des STEC O157 sur les carcasses bovines

Tableau III.12. Caractéristiques des STEC isolés de 1999 à 2004

Tableau III.13. Répartition des prélèvements positifs en fonction du temps et de la firme en 1999

Tableau III.14. Répartition des dénombrements d'*E. coli* totaux sur les carcasses de bœuf (1999-2004)

Tableau III.15. Valeurs des dénombrements des *E. coli* dans les viandes hachées de bœuf

Tableau III.16. Niveau de contamination par *E. coli* des échantillons positifs pour les STEC O157 et interprétation par rapport aux critères règlementaire

Tableau III.17. Niveau de contamination par *E. coli* des firmes ayant présenté une souche de STEC O157 au niveau des carcasses bovines de 1999 à 2002

Tableau IV.1. Amorces utilisées

Tableau IV.2. Caractéristiques des souches de référence

Tableau IV.3. Caractéristiques des échantillons ayant permis l'isolement d'un STEC O157 à partir des carcasses de bœuf en Algérie

Tableau IV.4. Pathotypes des *E. coli* O157 isolés en Algérie à partir des carcasses de bœuf

Tableau IV.5. Pathotypes des souches STEC/AEEC non O157 isolées de carcasses

Tableau V.1. Pathotypes des souches d'*E. coli* O157 isolées d'ovins en Algérie

Tableau V.II. Pathotypes retrouvés à partir des matières fécales d'ovins en Algérie

Liste des abréviations

ADN :	acide désoxyribonucléique
AE :	attachement et effacement
AEEC :	attaching and Effacing <i>Escherichia coli</i>
AFLP :	amplification of random polymorphic DNA
AFNOR :	Association Française de Normalisation
AFSCA :	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaine Alimentaire
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AR :	Arrêté Royal
ARN :	Acide ribonucléique
UZ-VUB :	Academische Ziekenhuis – vrije Universiteit Brussel (maintenant AZ-Brussel)
BPW:	Buffered Peptone Water
CDC :	Center for Disease Control and Prevention
CDT :	cytolethal distending toxin
CEE :	Communauté Economique Européenne
CPM :	counts per minute
CT- SMAC :	cefixime tellurite sorbitol Mac Conkey
DG SANCO :	Direction Générale "Santé et protection des consommateurs"
dNTP :	désoxyribonucléotides
<i>eae</i> :	gène codant pour l'intimine
Efa :	EHEC factor for adherence
EFSA :	European Food Safety Authority
EHEC :	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique.
<i>ehxA</i> :	gène qui code pour l'entérohémolysine
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
EPEC :	<i>Escherichia coli</i> entéropathogène
EPT :	eau peptoné amponnée
Esp :	<i>Escherichia coli</i> secreted protein

<i>flic H7</i> :	gène qui code pour l'antigène H7
FSIS :	Food Safety Inspection Service
Gb :	globotriosyl céramide
GUD :	Béta glucuronidase
GUD+ :	β- glucuronidase positive
HPI :	high-pathogenicity Island
HACCP :	Hazard Analysis Critical Control Point
ICE :	immunoconcentration automatique
IEV :	Institut d'Expertise Vétérinaire
Iha :	IrgA homologue adhesin
IMS	séparation Immunomagnétique
IMVIC	indole, rouge de méthyl; Voges-Proskauer; citrate
ISO	International organization standardization
ISP-LP	Institut Santé Publique - Louis Pasteur
LB	milieu Luria-Bertani
LEE :	Locus of Enterocyte Effacement
Map :	mitochondrie associated-protein
MLEE :	multi locus enzyme electrophoresis
MLST	: multi loci sequencing typing
mTSB-n :	tryptone soja modifié + novobiocine
NA :	non acceptable
NleA :	non-LEE-encoded effector A
PAI :	peptide auto-inducteur
PCR :	polymerase Chain Reaction
PFGE :	electrophorèse en champ pulsé
PTT :	purpura Thrombotique Thrombocytopénique
Rep PCR :	repetitive element PCR
RAPD :	random amplification of polymorphic DNA

SAA :	STEC Autoagglutinating Adhesin
SDS :	Sodium dodécylsulfate
SHU :	syndrome Hémolytique et Urémique
SLT	: Shiga-like Toxin
SMAC :	sorbitol Mac-Conkey
SOR+	: sorbitol positif
SSC :	NaCl 0,9 M, Citrate trisodique 90 mM
STEC	: Shigatoxin producing <i>Escherichia coli</i>
Stx :	Shigatoxine
stx :	gène qui code pour une toxine Stx
TccP :	Tir cytoskeleton coupling protein
Tir :	translocated Intimin Receptor
TSB :	trypticase soja broth
TTSS :	système de sécrétion de type 3
uidA :	gène qui code pour la β -glucuronidase
ufc :	unité formant colonie
ULg :	Université de Liège
USDA :	United States Department of Agriculture
VirA :	virulent Plasmid
VTEC :	verocytotoxin producing <i>Escherichia coli</i>
VT :	vérocytotoxine
Ysc :	<i>Yersinia</i> secretion
SP-VG-M001	méthode officielle belge pour la recherche de <i>Escherichia coli</i> de sérotype O157 dans les aliments

INTRODUCTION

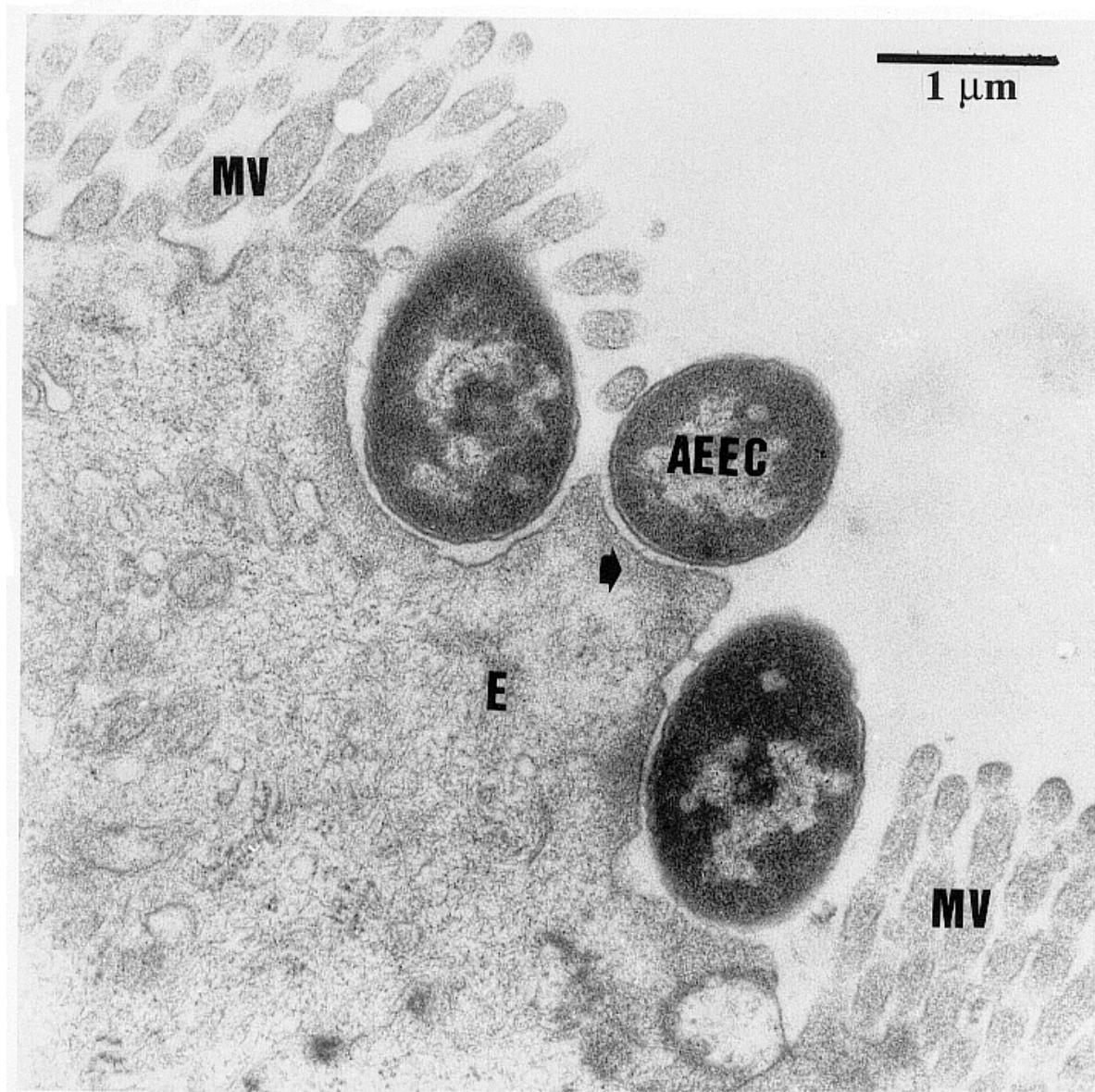


Figure 1. Micrographie électronique de la lésion d'attachement et d'effacement. Les *E. coli* attachantes et effaçantes (AEEC) s'attachent intimement à l'entérocyte et effacent les microvillosités (MV) conduisant à l'accumulation d'actine et à la formation du piédestal (flèche) (China et al., 2000)

1. DEFINITIONS ET NOMENCLATURE.

Pour commencer, il est important de pouvoir bien se situer par rapport à la nomenclature quelque peu rébarbative qui concerne les *E. coli* responsables de toxi-infections d'origine alimentaire (Mainil et Daube, 2005).

Parmi les *E. coli* pathogènes, on distingue notamment les *E. coli* attachantes et effaçantes (AEEC pour Attaching and effacing *E. coli*) se caractérisant par un attachement intime des bactéries aux entérocytes suivi d'un effacement des microvillosités (Moon *et al.*, 1983) (Figure 1). Il s'agit d'une définition liée à la lésion anatomo-pathologique produite.

Les AEEC regroupent les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) responsables de diarrhées chez l'homme et les animaux et les *E. coli* entérophémorragiques (EHEC) responsables de diarrhées, de dysenterie et de pathologies extra-intestinales comme le syndrome hémolytique urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'homme. Les souches similaires trouvées chez les animaux où seuls les symptômes entériques peuvent exister sont appelées EHEC-like. Les souches EHEC en plus de produire la lésion d'attachement et d'effacement (AE) produisent aussi des toxines dont l'archétype est la toxine Stx de *Shigella dysenteriae*. Les EHEC font donc partie aussi de la famille des STEC ou Shiga-toxin producing *E. coli* qui comprend aussi des souches non AEEC. L'acronyme EHEC est basé sur une caractéristique clinique alors que STEC est une définition phénotypique voire génotypique selon la méthode de caractérisation utilisée. Par conséquent, si la souche est isolée d'un aliment, on parlera de STEC alors que si elle est isolée d'un patient, on parlera plutôt d'EHEC.

Les STEC sont aussi appelés VTEC, pour "verocytotoxin-producing *E. coli*", car les toxines Stx sont toxiques pour les cellules Vero en culture. Pour rappel, Le terme VTEC est utilisé par les autorités européennes (European food safety Authority, EFSA) alors que le terme STEC (autrefois SLTEC pour Shiga-like toxin producing *E. coli* (Karmali, 1989)) est utilisé par les autorités américaines (Center for Disease Control and Prevention, CDC) (Mainil et Daube, 2005).

Pour être complet, il faut aussi signaler que les toxines Stx, autrefois Slt pour "Shiga-like toxins", sont aussi appelées VT pour "Verocytotoxins". Notons enfin que les *E. coli* O157:H7 responsables d'épidémies font partie des EHEC produisant les lésions d'attachement et d'effacement et des toxines de type Stx.

Il faut cependant indiquer que d'autres sérotypes d'EHEC sont aussi impliqués dans des pathologies semblables à celles qui sont provoquées par les EHEC O157:H7. Citons notamment les sérotypes : O26, O91, O103, O111, O118, O128 et O145 (Mainil et Daube, 2005). Mais la plupart de ces souches sont associées à des cas sporadiques plutôt qu'à de réelles épidémies.

2. PATHOLOGIES HUMAINES ET ANIMALES LIÉES AUX STEC

E. coli est un hôte normal de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux. Les STEC sont portés principalement par les bovins mais aussi par les ovins, les oiseaux et, dans une moindre mesure, les porcs (Caprioli *et al.*, 2005).

Chez l'homme, après ingestion d'une dose infectieuse faible (inférieure à 100 unités formant colonies ou ufc) (Caprioli, 2005) et après une incubation de 3 à 4 jours pouvant aller jusqu'à 10 jours (Karmali, 1989), les infections à STEC peuvent revêtir des tableaux cliniques variés allant de la diarrhée bénigne à des colites hémorragiques (Caprioli, 2005). Ces dernières se compliquent parfois au bout de quelques jours d'un syndrome hémolytique urémique (SHU) chez l'enfant et le sujet âgé et plus rarement de Purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Griffin et Tauxe, 1991). SHU et PTT ont en commun des lésions des cellules endothéliales de la microcirculation suivies d'un gonflement cellulaire, d'agrégation plaquettaire et de thrombose. Les manifestations sont déterminées par le lit vasculaire le plus atteint : celui des reins pour le SHU, celui du système nerveux pour les PTT. Ces deux affections sont caractérisées par une microangiopathie sévère et une réduction marquée du taux de plaquettes et du taux d'hémoglobine (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, AFSSA, 2003).

Chez les animaux, les STEC sont responsables de diarrhées et de dysenterie chez le jeune veau (China *et al.*, 1998). L'absence de récepteurs pour les toxines Stx expliquerait que les ruminants ne développent pas de toxémie ou de dommage vasculaire systémique (Pruimboom-Brees *et al.*, 2000)

Des STEC non AEEC sont également responsables de la maladie de l'œdème chez le porc.

Les animaux atteints présentent des signes nerveux, ont des œdèmes en particulier des paupières, du larynx et du front. Ils titubent, semblent aveugles et, dans les cas les plus avancés, sont couchés sur le côté et présentent des mouvements de pédalage. La mort peut survenir dans les 24 heures après le début des signes cliniques (AFSSA, 2003). La toxine Stx2e, un variant porcin des toxines Stx est responsable des dommages vasculaires, des œdèmes ainsi que des foyers de dégénérescence dans le tronc cérébral (angiopathie cérébrospinale) des porcs atteints. Les sérotypes les plus fréquemment impliqués sont les sérotypes O138, O139 et O141 (Heuvelink *et al.*, 1999 a).

Malgré la sensibilité à de nombreuses classes d'antibiotiques de la majorité des souches de *E.coli* O157:H7, l'utilisation d'antibiotiques comme traitement chez l'homme, est encore controversée. L'utilisation des antibiotiques comme traitement pourrait conduire à l'aggravation de l'infection par destruction de la bactérie, induisant des concentrations en toxines libres plus élevées et, de ce fait, plus disponibles à l'absorption systémique augmentant le risque de survenue du SHU (AFSSA, 2003).

Des essais de traitement ciblant les toxines ont été réalisés grâce à un composant du récepteur pour bloquer les toxines Stx1 et Stx2 libres dans l'intestin, ce qui réduirait leur absorption. Le traitement serait alors administré très tôt dès l'apparition de la maladie. D'autres voies thérapeutiques comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-Stx ont également été testées (AFSSA, 2003).

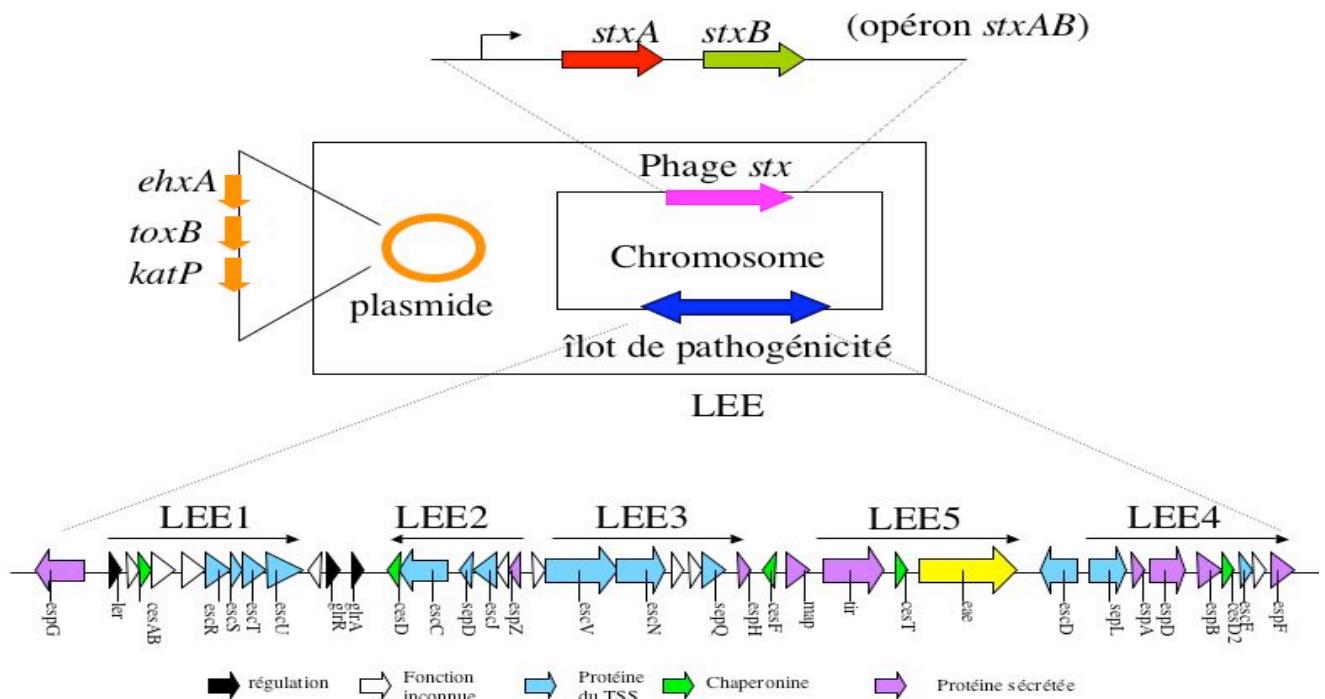


Figure 2. Schéma des principaux éléments génétiques responsables de la virulence des *E. coli* producteurs de Shigatoxines. Sur le chromosome, on trouve principalement : l'îlot de pathogénicité LEE comprend 40 grilles ouvertes de lectures (flèches) et 5 unités de transcription (LEE1 à LEE 5). Les gènes du LEE codent pour l'intimine (gène *eae*), des protéines secrétées par le TTSS ou des chaperonines. Le LEE est impliqué dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement. Des bactériophages intégrés dans le chromosome bactérien portent les opérons *stxAB* qui codent pour les Shigatoxines. A côté du chromosome on trouve un plasmide de haut poids moléculaire qui porte des gènes codant pour des facteurs potentiellement impliqués dans la virulence comme les gènes *ehxA* codant pour l'entérohémolysine, le gène *toxB* codant une adhésine et le gène *katP* codant pour une catalase-peroxydase.

3. FACTEURS DE VIRULENCE DES SOUCHESTE

La virulence d'une bactérie est une mesure quantitative de son pouvoir pathogène. Les gènes de virulence codent pour des propriétés qui sont impliqués dans le processus de pathogénie.

Les gènes qui codent les principaux facteurs de virulence des STEC sont portés par des éléments mobiles du génome, éléments acquis lors d'échanges génétiques par transfert horizontal : îlots de pathogénicité, bactériophages et plasmides (figure 2).

3.1. Les Shigatoxines.

Certaines souches d'*E. coli* produisent une cytotoxine qui est létale pour les cellules Vero ou HeLa en culture, entérotoxique au niveau de l'anse intestinale de lapins et létale pour la souris. Cette toxine proche de la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* a été désignée Shiga like toxine (Slt) et rebaptisée par la suite, shigatoxine (Stx).

Ultérieurement, plusieurs études permirent de distinguer deux types antigéniques de toxines. Les deux types de toxines ont été initialement dénommés Slt-I et Slt-II et ultérieurement Stx1 et Stx2. Des variants de ces toxines ont été très vite identifiés de telle manière que les toxines Stx1 et Stx2 constituent des familles de toxines (Mainil, 1999).

3.1.1. Génétique et structure des Shigatoxines

Ces toxines sont des holoprotéines de 70 kDa constituées d'une sous-unité A (possédant l'activité enzymatique) de 33 kDa et de 5 sous unités B (pour binding ou liaison au récepteur) de 7,7 kDa chacune (Paton JC et Paton A.W, 1998).

D'un point de vue génétique, la sous-unité A est codée par le gène *stxA* et la sous-unité B par le gène *stxB*. Ces deux gènes forment un opéron porté par des phages lysogènes spécifiques de type lambda (Scotland *et al.*, 1983) à l'exception de la production de la toxine Stx2e. Ainsi, l'opéron *stx1* code pour la toxine Stx1 et l'opéron *stx2* code pour la toxine Stx2.

3.1.2. Mécanismes d'action des Shigatoxines

Au niveau de la cellule eucaryote, les sous-unités B de la toxine Stx, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide (Gb3) (galactose- α (1-4), galactose-(1-4) glucosyl-céramide) (Mainil, 1999, AFSSA, 2003). Une fois la toxine internalisée par un mécanisme classique d'endocytose, elle subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique.

La sous unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont di-sulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme où elle exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S bloquant la sous unité 60S du ribosome et l'arrêt de la synthèse protéique et la mort cellulaire (effet apoptotique). En outre, la toxine (la sous unité B, en particulier) induirait la production de cytokines par les cellules intestinales. Elles activent la réponse inflammatoire et le développement des lésions au niveau de la barrière intestinale favorisant ainsi la dissémination systémique des toxines au niveau de l'organisme.

Les différents aspects de la pathologie liée à la production des toxines Stx par les STEC peuvent être reproduits chez de nombreuses espèces animales. Les différentes études ont confirmé le rôle des toxines Stx dans la pathologie des STEC et ont permis de développer le concept que les lésions

tissulaires observées étaient liées au niveau d'expression des récepteurs glycolipidiques des toxines au niveau de ces tissus.

3.1.3. Les variants des toxines Stx

Les toxines Stx1

Elles représentent un groupe homogène et sont neutralisées par les anticorps dirigés contre la toxine de *Sh. dysenteriae* avec laquelle elles présentent 99 % d'homologie. Récemment, quelques variants du gène *stx1* ont été décrits: *stx1*, *stx1c* et *stx1d*.

Le variant *stx1* correspond à la séquence nucléotidique du gène *stx1* porté par le phage 933J de la souche de référence EDL 933 (Strockbine *et al.*, 1986) et représente le variant de référence ou variant “sauvage”.

Le variant *stx1c*, tout d'abord mis en évidence chez des souches d'origine ovine et nommé *stx1OX3* (Paton *et al.*, 1995) a été retrouvé plus tardivement, chez des souches humaines et fut rebaptisé *stx1c* (Zhang *et al.*, 2002a). Chez l'homme, il est associé à des cas de diarrhées sans complication, ou bien n'entraîne aucun symptôme. Les pourcentages d'identité avec le gène *stx1* sont respectivement de 97 et 95 % pour les séquences des gènes *stxA* et *stxB*. Les protéines, quant à elles, ne diffèrent que de 9 et 3 acides aminés correspondant à 97,1 et 96,6 % d'homologie entre les sous-unités A et B respectivement. Koch et collaborateurs (2001) ont montré que l'opéron *stx1c* est fréquemment détecté dans les sérotypes O146:H21 et O128:H2 isolés chez les ovins et chez l'homme. Les ovins seraient probablement à l'origine de la transmission de ces germes à l'homme chez qui ils seraient responsables d'une forme bénigne de maladie.

Le variant *stx1d* (Burk *et al.*, 2003) a été mis en évidence chez une souche d'origine bovine. Un séquençage des gènes a montré que les régions codant les sous-unités A et B possédaient 93 et 92 % d'identité respectivement avec la séquence de référence *stx1*. Ce résultat correspond à une différence de 20 acides aminés pour la sous-unité A et de 7 acides aminés pour la sous-unité B. Les sites d'actions des deux sous unités sont fortement conservés. Très peu d'informations sur la toxicité de ce variant sont disponibles.

Les toxines Stx2

Elles constituent un groupe hétérogène, bien distinct de Stx1 et ne présentent que 56 % d'homologie avec la toxine Stx de *Sh. dysenteriae* type 1 (Strockbine *et al.*, 1986). Les souches productrices de Stx2 sont plus virulentes et ont été très souvent associées aux formes graves d'infections (SHU et TTP) (Ostroff *et al.*, 1989). Le variant *stx2* est l'opéron “sauvage” correspondant aux gènes de la souche de référence EDL 933 qui porte le phage 933W (Strockbine *et al.*, 1986). Les variants *stx2*

sont nombreux. Au moins 7 variants ont été identifiés à ce jour : *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*, et *stx2NV206* (Friedrich et al., 2002; Leung et al., 2003). Les variants ont tout d'abord été mis en évidence sur la base de différences de leur activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs des toxines Stx (Calderwood et al., 1996). Ces différences sont majoritairement dues à des mutations au niveau de la séquence nucléotidique des gènes *stx* modifiant donc légèrement la structure primaire de la toxine (Piérard et al., 1998a).

Les régions les plus conservées des toxines correspondent aux acides aminés impliqués dans le site enzymatique de la sous-unité A ou dans la liaison au récepteur Gb3 de la sous-unité B (Jackson et al., 1990). Les caractéristiques phénotypiques des souches possédant des variants expliquent pourquoi certaines souches sont associées à des hôtes spécifiques. Le caractère dangereux pour l'homme n'en est pas pour autant toujours absent puisque par exemple des cas de diarrhées dus à une souche possédant le variant *stx2e* ont été décrits (Piérard et al., 1991).

Le premier variant décrit fut celui des STEC impliqués dans la maladie de l'œdème du porc. La toxine Stx2e diffère de Stx2 au niveau de la sous-unité A par un acide aminé en plus que Stx2 (94 % d'homologie) et deux acides aminés en moins pour la sous-unité B (79 % d'homologie) (Weinstein et al., 1988).

La protéine codée par le variant *stx2e* possède globalement la même structure que toutes les autres Shigatoxines, mais elle diffère de celles-ci par sa fixation préférentielle au récepteur Gb4 au lieu de Gb3 (Ito et al., 1990, Gannon et al., 1990). Les souches possédant ce variant sont donc peu pathogènes pour l'homme (qui possède le récepteur Gb3 sur ses cellules) et sont impliquées dans la maladie de l'œdème du porc (espèce possédant à la surface de ses cellules le récepteur Gb4).

Un deuxième variant (Stx2c) est de plus grande importance clinique et biologique chez l'homme. La toxine Stx2c diffère de la toxine Stx2 au niveau de la sous-unité B. Le groupe de variants Stx2c comporte deux sous-variants : Stx2vh-a et Stx2vh-b. Ils ont été mis en évidence dans une même souche d'EHEC O91:H21 isolée d'un patient atteint d'un SHU (Ito et al., 1990). Le gène *stx2vh-a* présente respectivement 98,6 % et 95,5 % d'identité avec les régions de *stx2* codant les sous-unités A et B. L'opéron *stx2vh-b* présente 99 % d'identité avec *stx2vh-a* sur la totalité de la séquence d'ADN.

Le groupe de variant *stx2d* est constitué des sous-groupes *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111*. Ils ont été mis en évidence dans des souches humaines ou animales (Koch et al., 2001).

Les toxines Stx2d semblent moins pathogènes chez l'homme puisqu'elles sont le plus souvent associées à des souches isolées d'humains n'ayant pas développé de pathologies graves (Friedrich et al., 2002). Le gène codant pour la sous-unité A de ces variants présente environ 95 % d'identité avec *stx2* contre 88 % seulement pour le gène *stx2B*. Les opérons *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111* présentent entre 96,6 et 99,9 % d'identité entre eux (Piérard et al., 1998a).

Le variant *stx2f* présente 70,6 % et 98 % d'identité respectivement avec les parties codant les sous-unités A et B du gène *stx2e*. Cependant, de récentes études ont montré que les souches possédant l'opéron *stx2f* ne sont retrouvées que dans des fèces de pigeons (Morabito *et al.*, 2001). Ces animaux représenteraient donc le réservoir naturel de ces souches, mais il est encore difficile d'évaluer le danger lié à celles-ci pour l'homme. Une étude regroupant une importante collection de STEC a montré que le variant *stx2f* n'avait été retrouvé dans aucune des 626 souches étudiées, suggérant que les souches possédant *stx2f* ne sont que faiblement pathogènes pour l'homme (Friedrich *et al.*, 2002). Des études plus approfondies seraient donc nécessaires pour évaluer clairement ce risque.

Le variant *stx2g*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, présente des pourcentages d'identité compris entre 63 et 94,9 % avec les gènes précédemment décrits. La comparaison des séquences des opérons *stx2g* et *stx2* montre que la région la plus conservée correspond à celle codant la partie centrale de la sous-unité A (Leung *et al.*, 2003). La faible prévalence des souches possédant ce variant suggère qu'il s'agit certainement de souches émergentes encore peu répandues dans les élevages. Cependant, une forte homologie de séquence en acides aminés avec les toxines produites par des souches associées à des maladies humaines et une conservation des sites actifs de la protéine confèrent aux souches produisant la toxine Stx2g un caractère potentiellement pathogène pour l'homme (Leung *et al.*, 2003). D'autres études doivent être menées afin d'apprécier plus finement la virulence associée à ce variant.

La séquence nucléotidique de l'opéron du variant *stx2NV206*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, a été comparée à celles des opérons connus et montre 94,5 à 99 % d'identité au niveau du gène *stx2A* et 81,5 à 96 % d'identité avec *stx2B*. Les séquences protéiques présentent, quant à elles, respectivement 94 à 99 % et 87 à 98 % d'homologie pour les sous-unités A et B (Bertin *et al.*, 2001). A ce jour, aucune étude concernant la fréquence d'identification ou le pouvoir pathogène de ce variant n'a été menée.

Tous les variants ont les mêmes particularités génétiques que les gènes de référence, *stx1* et *stx2*. Il n'est donc pas rare, suite à l'insertion de plusieurs phages dans le chromosome bactérien, d'observer des souches possédant plusieurs variants.

Les souches STEC peuvent produire une seule toxine (Stx1 ou Stx2), ou les deux Stx1 et Stx2 (souche EDL 933) ou encore deux toxines Stx2 différentes (Karmali, 1989).

3.1.4. Association à la symptomatologie

Les toxines Stx et leurs variants n'ont pas la même importance au niveau clinique. Les souches STEC productrices de la toxine Stx2 et Stx2c sont responsables des formes graves (diarrhée hémorragique,

syndrome hémolytique urémique, PTT) des infections à STEC chez l'homme et appartiennent le plus souvent au séro-groupe O157. La toxine Stx2 est mille fois plus puissante que Stx1. De même, parmi les variants *stx2*, *stx2* est plus virulent que *stx2* et *stx2c* ou *stx2c* seul.

Le variant *stx2d* (*stx2d* encode les toxines Stx2d-Ount et Stx2d-OX3) a été impliqué dans des formes bénignes (diarrhée sans complication) ou asymptomatiques (Friedrich et al., 2002). Enfin, les souches STEC O157:H7 présentant le profil O157:H7:PT2:*stx2c:stx2c:eae:ehxA* sont considérées comme étant les plus virulentes (Eklund et al., 2002).

Le tableau 1 présente les principaux types de gènes *stx* de STEC et les variants isolés isolés chez différentes espèces animales (principaux réservoirs) et l'homme (Piérard et al., 1998a, Friedrich et al., 2002, Eklund et al., 2002, Jenkins et al., 2003, Rios et al., 1999, Bürk et al., 2003).

Le risque de SHU est significativement plus élevé lorsque la souche produit Stx2, Stx2c ou Stx2 et Stx2c. STEC de sérotype O157:H7/H- possédant *stx2, eae, ehxA* est le plus fréquemment responsable de cas de SHU à STEC. Ce pathotype a été essentiellement isolé chez des enfants âgés de moins de 5 ans qui représentent la tranche d'âge la plus sensible. D'autres sérotypes de STEC comme les sérotypes O26, O103, O111 et O145 ont été également impliqués dans les formes sévères de la maladie. Le variant *stx2d* a été plus fréquemment mis en évidence dans des cas de diarrhée non hémorragique ou dans les formes asymptomatiques. Ce variant a été plus fréquemment isolé chez les adultes (âgées de plus de 18 ans). Le gène *eae* est absent dans les souches STEC *stx2d*.

Le développement et la mise au point des méthodes de détection des gènes de virulence des STEC et du typage des variants *stx* présente un grand intérêt dans le sens où leur caractérisation apporte des renseignement sur l'évolution, le degré de sévérité de l'infection, sur la source de contamination et permet d'évaluer le risque d'apparition du SHU lié à STEC.

Variants stx	Symptômes chez l'homme			Réservoirs				
	HUS	diarrhée	asymptomatique	Homme	bovins	Ovins	porcins	Pigeons
<i>stx₁</i>	+/-	+++	++	+		+	/	/
<i>stx_{1c}</i>			++	+		+		
<i>stx_{1Ox3}</i>		+		+	+	+		
<i>stx₂</i>	+++	++	+/-	+	+		/	/
<i>stx_{2c}</i>	+	+	+	+	+		/	/
<i>stx_{2vh-a}</i>		+		+	+		/	/
<i>stx_{2vh-b}</i>				+	+		/	/
<i>stx₂/stx_{2vh-b}</i>	+			+	+			
<i>stx₂/stx_{2vh-a}</i>				+				
<i>stx₂+stx_{2c}</i>							/	/
<i>stx₁+stx_{2c}</i>	+/-	+/-	+/-				/	/
<i>stx₁+stx₂+stx_{2c}</i>							/	/
<i>stx_{2d}</i>	-	++	+++	+		++	/	/
<i>stx_{2d-Ountb}</i>								
<i>stx_{2d Ox3}</i>								
<i>stx₁+stx_{2d}</i>		++	++	+			/	/
<i>Stx2/stx_{2vh b/stx_{2d}}</i>					+		/	
<i>Stx_{2vh-a/stx_{2-b/stx_{2d}}}</i>					+			/
<i>stx_{2-NV206}</i>					+		/	/
<i>stx_{2e}</i>	-/+	-/+	+	+			+	
<i>stx_{2f}</i>		-/+						+
<i>stx_{2g}</i>								

Symptômes chez l'homme : +/- : Variants rarement associés, ++ : Variants associés à une symptomatologie, +++ : Variant fortement impliqués dans la symptomatologie.

Réservoirs : + : Présence du variant chez l'animal

/ : Pas de données

Tableau 1. Les différents types de variants *stx* isolés chez l'homme et les animaux.

3.2. La lésion d'attachement-effacement

3.2.1. La génétique

La lésion d'attachement et d'effacement a été décrite pour la première fois en 1983 (Moon *et al.*, 1983). Elle se caractérise par un attachement intime de la bactérie à l'entérocyte suivi d'un effacement des microvillosités et d'une accumulation d'actine dans l'entérocyte au point d'attachement de la bactérie. Il en résulte une image caractéristique en piédestal (figure 1).

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 *eaeA*, rebaptisé *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). Les mutants dans ce gène ne montrent pas de lésion d'attachement et d'effacement que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Jerse *et al.*, 1990). Des études de mutagenèse par transposition ont permis de décrire d'autres gènes impliqués dans ce phénomène.

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.

Le LEE est long de 35 à 43 kb selon les souches, il est présent chez toutes les souches AEEC regroupant aussi bien des EPEC que des EHEC (McDaniel *et al.*, 1995; Goffaux *et al.*, 1999) mais aussi chez *Citrobacter rodentium* (Deng *et al.*, 2001). Même si des différences sont présentes selon les souches, les caractéristiques principales sont conservées.

Le LEE comprend 3 régions (figure 2) : (i) une région proximale qui comprend les gènes codant pour un système de sécrétion de type III (TTSS) (pour revue, Tampakaki *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004; Gosh, 2004); (ii) une région centrale comprenant le gène *tir* codant pour le récepteur à l'intimine et le gène *eae* codant pour la protéine intimine; (iii) une région distale comprenant les gènes *espA*, *espB* et *espD* (pour *E. coli* secreted protein) codant pour des protéines sécrétées par le système de sécretion de type III et constituant le “translocon” permettant d'injecter les protéines effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte. Au niveau transcriptionnel, le LEE comprend 5 unités de transcription LEE1 à LEE5 (figure 2).

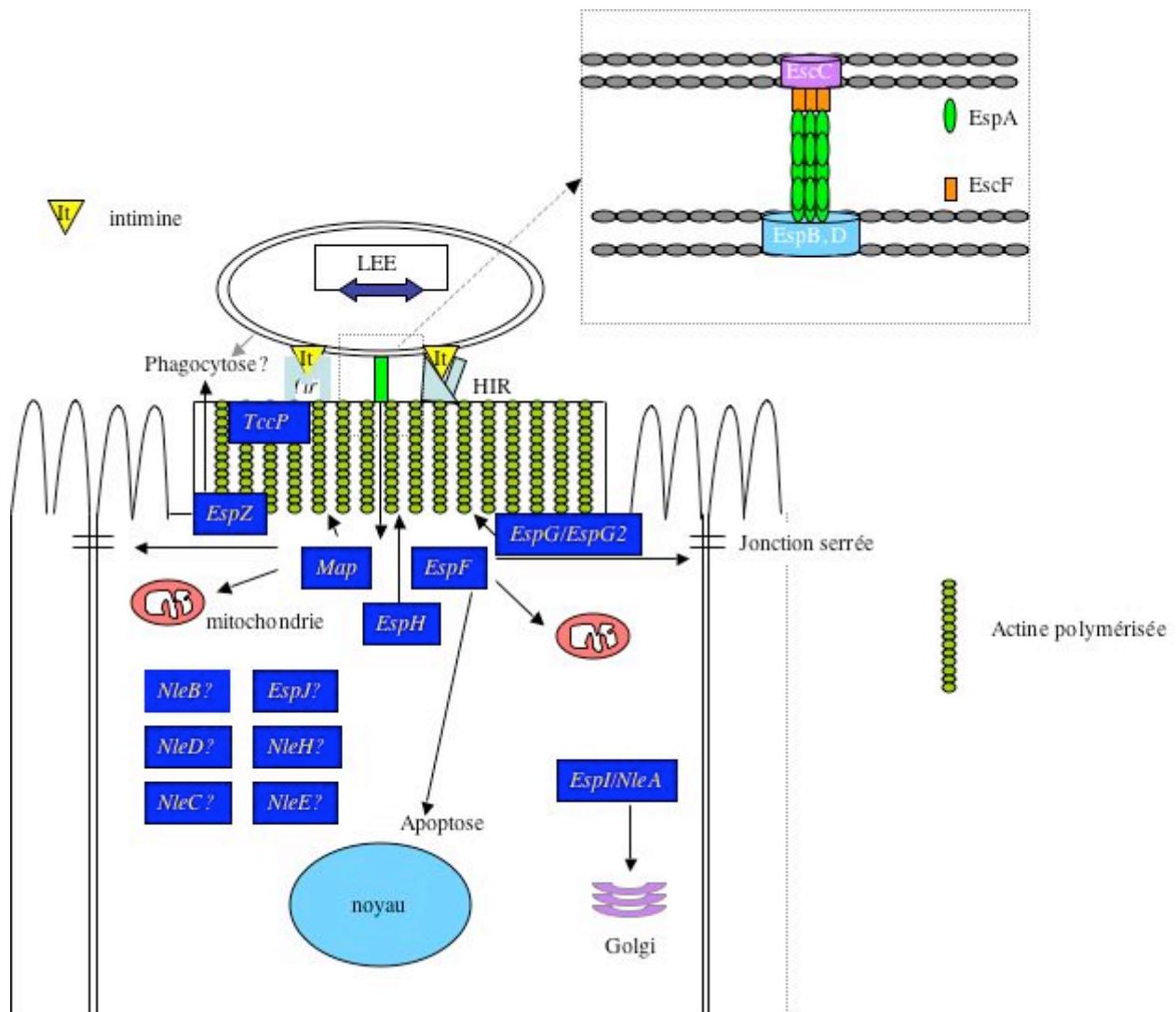


Figure 3. Schéma des mécanismes de l'interaction entre un *E. coli* porteur du LEE et un entérocyte.

La bactérie est intimement liée à l'entérocyte (A). Il en résulte une activation du système de sécrétion de type III qui conduit à la formation du translocon (B) constitué des protéines EscC, EspA, EscF et EspB et EspD. Ce translocon agit comme une aiguille moléculaire permettant l'injection des protéines effectrices que sont essentiellement Tir, EspF, espG, EspH, EspI, EspZ et Map. Ces protéines entraînent un réarrangement du cytosquelette conduisant à la formation du piédestal mais aussi à la destruction des jonctions serrées.

3.2.2. Les mécanismes de la lésion.

La clé du mécanisme réside dans le TTSS porté par le LEE. En bref, la bactérie doit entrer en contact avec la cellule cible ce qui va déclencher la transcription des gènes qui codent pour le système de sécrétion. Le TTSS est aussi appelé “ mécanisme de sécrétion par contact ”. Il agit à la manière d'une seringue moléculaire. Il consiste en une aiguille moléculaire (le translocon) qui va permettre d'effectuer la jonction entre la paroi de la bactérie et la cellule hôte. Ensuite, via cette aiguille, les protéines effectrices sont injectées du cytoplasme de la bactérie vers celui de la cellule hôte où elles vont exercer leur activité biochimique en perturbant le métabolisme de la cellule (figure 3).

La première étape consiste donc en un attachement de la bactérie à la cellule épithéliale. Il faut donc rechercher les adhésines qui pourraient remplir cette fonction.

Pour les STEC, plusieurs candidats ont été proposés : les “ long polar fimbriae ” (Torres *et al.*, 2002), La protéine IhA (Tarr *et al.*, 2000) et le facteur Efa1 (EHEC factor for adherence) chez les STEC non-O157 (Nicholls *et al.*, 2000). Quoi qu'il en soit, via un ou plusieurs mécanismes, la bactérie entre en contact avec la cellule cible. Il en résulte l'activation du système de sécrétion de type III qui injecte dans le cytoplasme de la cellule épithéliale différentes protéines effectrices. 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. L'intimine posséde deux types de récepteurs, un récepteur cellulaire eucaryotique comme la nucléoline pour les cellules Hep-2 (Sinclair et O'Brien, 2002) et un récepteur d'origine bactérienne Tir (Translocated Intimin Receptor). Il en résulte un attachement plus intime de la bactérie à la cellule épithéliale. L'attachement de la bactérie entraîne une cascade biochimique complexe dans le cytoplasme de la cellule eucaryotique se traduisant notamment par une action sur le cytosquelette (actine, microtubules, filaments intermédiaires) entraînant la destruction de l'actine des microvillosités et leur effacement. Parmi les modifications enregistrées, on note aussi une série de phosphorylations suite à l'activation de protéines kinase. Il en résulte une accumulation d'actine au niveau du site de fixation de la bactérie (figure 1) donnant lieu à une image en piédestal. Au niveau de la barrière intestinale, cela se traduit par (i) la destruction de la fonction de la barrière intestinale incluant une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées (Muza-moons *et al.*, 2003) et une diminution de la résistance transépithéliale; (ii) une action sur les mitochondries avec perte du potentiel de membrane (Kenny and Jepson, 2000), (iii) l'inhibition du cycle cellulaire (iv) l'induction de l'apoptose (Marches *et al.*, 2003).

Au niveau physiologique, cela se traduit par une production d'IL-8, une transmigration des polymorphonucléaires et de la diarrhée (Savkovic *et al.*, 2001).

3.2.3. Les protéines impliquées :

L'intimine

L'analyse des séquences des protéines intimine de différentes souches pathogènes montre que les régions N terminales sont fortement conservées mais que les régions C-terminales varient considérablement.

Les trois premiers quarts de l'intimine (704 acides aminés en partant de l'extrémité N-terminale) montrent 94 % d'identité, tandis que l'extrémité C-terminale présente seulement 49 % d'identité (China, 2000).

Au moins 17 variants de l'intimine ont été décrits à ce jour

($\alpha, \beta, \gamma, \varepsilon, \eta, \iota, \kappa, \lambda, \mu, \nu, \sigma, \pi, \rho, \tau, \xi, \zeta$) comprenant également des sous-types (Adu-Bobie *et al.*, 1998; Oswald *et al.*, 2000; Tarr et Whittam., 2002; Zhang *et al.*, 2002b; Jores *et al.*, 2003).

Les protéines du système de sécrétion de type III

L'archétype des systèmes TTSS est le système *ysc* (*Yersinia secretion*) de *Yersinia enterocolitica*. Par homologie, les gènes codant pour le TTSS d'*E. coli* ont été appelés *esc* (*E. coli secretion*).

Ainsi, le TTSS des souches STEC comprend au moins 12 gènes. A côté des gènes du TTSS proprement dit, on trouve les gènes codant pour les chaperonines (*ces AB*, *ces D*, *cesD2*, *ces F*, *cesT*) et les gènes codant pour les protéines effectrices.

Les protéines formant le translocon

L'aiguille moléculaire encore appelé “ translocon ” est la structure qui fait la jonction entre la bactérie et la cellule eucaryote et qui permet l'injection des protéines effectrices dans la cellule cible. Il est composé de protéines EspA (25 kDa) qui s'associent à la manière de la flagelline d'un flagelle pour constituer une structure filamentuse de 12 nm de diamètre et de 6 nm de long (Crepin *et al.*, 2005). Cette structure est ancrée dans la membrane externe de la bactérie par les protéines EscF et EscJ et à la membrane plasmique de la cellule cible par les protéines EspB (38 kDa) et EspD (40 kDa) (figure 3). Les gènes *espA*, *espD* et *espB* forment un opéron situé en aval du gène *eae* sur le LEE (figure 2).

Les protéines effectrices codées par le LEE

La protéine Tir est une protéine de 90 kDa sécrétée par le TSS des STEC et qui vient s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule cible pour y servir de récepteur à l'intimine (Deibel *et al.*, 1998). Tir agit comme récepteur sous forme d'un dimère (Luo *et al.*, 2000). La liaison de l'intimine à Tir génère un phénomène de réticulation qui lie les protéines Tir sous la bactérie adhérente (Garmendia *et*

al., 2005). La partie intracellulaire de la protéine Tir interagit alors avec des protéines d'adhésion focale et des protéines du cytosquelette conduisant à la formation d'un piédestal riche en actine sous la bactérie adhérente (Garmendia *et al.*, 2005).

Esp B, en plus de jouer un rôle dans la translocation des protéines sécrétées, agit aussi comme effecteur en agissant sur le cytosquelette via l'α-caténine (Kodama *et al.*, 2002). Il en résulte la formation de fibres de stress.

Esp F est une protéine riche en proline de 21 kDa codée par un gène situé à l'extrémité 3' du LEE. Elle joue un rôle dans la destruction de la fonction de barrière de l'intestin via une action sur les jonctions serrées (McNamara *et al.*, 2001). EspF est aussi impliquée dans la perméabilisation de la membrane des mitochondries. EspF semble aussi jouer un rôle dans l'apoptose de la cellule cible. Enfin, EspF joue un rôle direct dans le remodelage des microvillosités. Chez les EHEC, d'autres gènes *espF* appelés U et M-*espF* sont présents sur le chromosome en dehors du LEE ce qui complique l'étude de la fonction de la protéine car un simple mutant *espF* ne suffit pas (Viswanathan *et al.*, 2004).

EspG est une protéine de 44 kDa (Elliott *et al.*, 2001) qui joue un rôle dans la formation des fibres de stress et la destruction des microtubules des microvillosités en interagissant avec la tubuline (Matsuzawa *et al.*, 2004). EspG présente une certaine homologie avec la protéine VirA impliquée dans l'invasion des cellules épithéliales par *Sh. dysenteriae* (Elliott *et al.*, 2001).

EspH est une protéine de 19 kDa qui se localise dans la membrane de la cellule cible et joue un rôle dans la modulation de la structure du réseau d'actine affectant la formation du piédestal.

EspZ est une protéine sécrétée, décrite récemment qui s'accumule sous le site d'attachement de la bactérie dans la région du piédestal (Kanack *et al.*, 2005).

La protéine Map pour “ Mitochondrie-associated-protein ” est une protéine qui interagit avec la membrane de la mitochondrie. Map a trois fonctions principales (i) perturbation du potentiel de membrane de la mitochondrie, (ii) formation de filopodes au site d'attachement de la bactérie, (iii) altération des jonctions serrées et de la perméabilité intestinale. On voit donc que les actions de EspF et de Map sont synergiques (Garmendia *et al.*, 2005).

Les protéines effectrices non-codées par le LEE.

Le TTSS permet aussi la sécrétion de protéines qui ne sont pas codées par le LEE.

Parmi celles-ci, citons TccP, EspI, EspJ, NleB, NleC, NleD, NleD, NleE, NleF, et NleH. (Deng *et al.*, 2004). La protéine EspI (appelée aussi NleA pour Npn LEE Encoded protein A) est codée par un prophage et interagit avec l'appareil de Golgi de la cellule cible. La protéine EspJ est codée par le prophage CP-933U. Elle n'est pas impliquée dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement mais plutôt dans la survie du STEC chez l'hôte et dans la transmission du pathogène.

La protéine TccP (Tir cytoskeleton coupling protein) codée par le prophage cp-933 est une protéine riche en proline homologue à EspF. Elle sert de lien entre Tir et le cytosquelette en interagissant avec la protéine N-WASP qui stimule la polymérisation de l'actine. Le rôle des autres protéines n'est pas encore clairement élucidé (Garmendia *et al.*, 2005).

Un nouvel effecteur appelé Cif (Cycle inhibitory factor) a été identifié, effectivement injecté par le système codé par le LEE. Cette protéine est responsable du blocage du cycle cellulaire en phase G2/M induit par les EPEC et les EHEC. Elle est codée par un bactériophage dont le génome est inséré dans le chromosome de la bactérie (Charpentier et Oswald, 2004)

3.3. Les autres facteurs potentiels de virulence

3.3.1. Les autres îlots de pathogénicité

Un îlot de pathogénicité appelé PAI O122 est présent chez la plupart des EHEC. Pour la plupart des souches, le LEE et le PAI O122 sont liés physiquement mais ils sont éloignés chez les STEC O157 (Morabito *et al.*, 2003). Le PAI O122 code pour l'adhésine Efa1 mais le gène *efa1* est tronqué dans le PAI O122 des souches STEC O157 (Caprioli *et al.*, 2005).

Un autre îlot de pathogénicité appelé HPI (High-Pathogenicity-Island) a été reporté dans les STEC O26 mais pas chez les STEC O157, O103 et O111. Il est homologue à un PAI trouvé chez *Yersinia* qui code pour des sidérophores (Caprioli *et al.*, 2005).

3.3.2. L'adhésine SAA.

Certains STEC ne possèdent pas le LEE (LEE-) : *stx* (+), *eae*(-) et *ehx* (+) ont été impliquées à plusieurs reprises dans des épidémies de SHU. A la lumière de ces observations, il est intéressant de noter que les souches de sérotype O113:H21 O91:H21 O48:H21 (Paton *et al.*, 2001), O91:H-,

O128:H2, isolés fréquemment chez les petits ruminants (Zweifel, 2004) et O104:H21 sont également isolées en situation pathogène chez l'homme

Ces souches possèdent une adhésine appelée SAA (pour STEC Autoagglutinating Adhesin) qui est une protéine de surface de 516 acides aminés qui possède une certaine homologie avec la protéine YadA de *Y. enterocolitica* et qui est présente chez des STEC des sérotypes O113:H21, O48:H21, O91:H21 isolées de cas de SHU (Paton *et al.*, 2001).

3.3.3. L'adhésine F18

Quatre vingt pour cent des souches responsables de la maladie de l'œdème du porc expriment une adhésine F18 très souvent associée au gène *VT2e*. Elle a été mise en évidence chez 97 % des souches de sérotype O139 et 90 % des souches de sérotype O141 (*et al.*, 1998). Cette adhésine est absente chez les souches *Stx2e* isolées chez l'homme (Sontag *et al.*, 2005)

3.3.4. Les plasmides

Les STEC O157 possèdent un plasmide de 90 kDa appelé pO157. Il code pour 35 protéines dont certaines pourraient être impliquées dans la virulence (Burland *et al.*, 1998). C'est le cas de l'opéron *ehxA* qui code pour l'entérohémolysine, le gène *katP* qui code pour une catalase-peroxydase et le gène *espP* qui code pour une sérine protéase, le gène *toxB* qui code pour une adhésine proche de Eaf1. De grands plasmides sont aussi présents chez les STEC non-O157. Ils portent aussi les gènes codant pour l'entérohémolysine mais plus rarement les gènes *katP* et *espB* (Caprioli *et al.*, 2005).

3.3.5. L'entérotoxine EAST1

La toxine entéroaggrégative thermostable (EAST1) est présente chez la plupart des *E. coli* responsables de diarrhée (Nataro et Kaper, 1998). Le gène *east1* a été mis en évidence chez des EHEC responsables d'épidémies au Japon et appartenant aux sérotypes O157:H7, O26, O111 et O145.

3.3.6. La toxine CDT.

Un opéron codant pour une toxine cytolétale distendante (CDT) a été identifié chez les STEC O157:H- et les STEC O157:H7. La toxine CDT a d'abord été décrite chez les *E. coli* nécrotoxinogènes et entéropathogènes où elle exerce une activité cytotoxique en agissant sur le cytosquelette (Clark *et al.*, 2002).

4. METHODES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES STEC

Différentes méthodes de détection ont été développées pour la détection des STEC O157 et autres STEC. Elles ont recours à des méthodes immunologiques, méthodes de séparation-concentration comme l'immuno-séparation magnétique (IMS) ou des systèmes rapides de détection immunologiques comme les méthodes ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Vimont, 2006) et des méthodes génétiques.

4.1. Isolement et détection de *E. coli* O157

4.1.1. Utilisation des caractéristiques biochimiques pour l'isolement de *E. coli* O157

La plupart des réactions biochimiques des STEC sont typiques des *E.coli* et répondent au test IMVIC (indole, rouge de méthyl; Voges-Proskauer; citrate) qui permet de les différencier des autres entérobactéries. Environ 93 % des souches d'*E.coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures et sont β -glucuronidase positives, à l'inverse, la grande majorité des STEC O157 ne fermentent généralement pas le sorbitol (SOR-) et ne produit pas de β -glucuronidase active. Ainsi, L'absence de fermentation du sorbitol a justifié l'utilisation de la gélose Mac-conkey au sorbitol (SMAC) (AFSSA, 2003). Cependant, certaines des souches STEC O157 fermentant le sorbitol en 24 heures (SOR+) et possédant une activité β -glucuronidase (GUD+) ont été impliquées dans des cas d'infections de SHU (Gunzer et al., 1992; Karch and Bielaszewska., 2001) et d'épidémies probablement d'origine alimentaire à partir de saucisses contaminées (Ammon et al, 1999). Ces derniers, STEC O157 (SOR+ et GUD+) ainsi que les autres sérotypes de STEC, ne peuvent pas être mis en évidence par les méthodes officielles de contrôle des aliments. Leur détection fait généralement appel aux méthodes d'immunodiagnostiques et méthodes génétiques.

STEC O157 croît difficilement aux températures d'incubation (44°C-45°C) utilisées pour le dénombrement des *E. coli*. Il se développe rapidement à des températures comprises entre 30°C et 42°C avec un temps de génération de 0,49 heure à 37°C et 0,64 heure à 42°C (Vernozy-Rozand, 1999). Ces différentes caractéristiques justifient l'utilisation de milieux appropriés et une température d'incubation proche de 42°C pour la recherche des STEC O157.

4.1.2. Tests immunodiagnostiques utilisant des anticorps dirigés contre l'antigène O157

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

immunologiques donnent un résultat en 15 minutes (tests immunochromatographiques) ou en 2 heures (système ELISA en microplaques) après une phase d'enrichissement d'une durée de 24 heures. Par conséquent, la durée de l'analyse est réduite à un jour au lieu de trois jours nécessaires pour la majorité des méthodes conventionnelles.

Les méthodes immunologiques en une étape sont très utilisées par les industriels car rapides et simples. Le kit consiste en un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques d'*E.coli* O157:H7, un puit pour l'échantillon et une fenêtre de test et de contrôle. L'échantillon alimentaire est déposé au fond du puit 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. La limite de détection de ces tests est en moyenne de 10^5 *E. coli* O157 par ml de bouillon de pré-enrichissement. Quand elle est comparée à la méthode ISO 16.654, l'immunochromatographie se montre plus sensible (Van Amerongen et Koets, 2005).

Le système VIDAS ECO (Biomérieux, France) permet la détection entièrement automatisée de *E. coli* O157 après une phase d'enrichissement de 24 heures. Le principe de ce kit est celui d'un système ELISA. L'enrichissement très sélectif basé sur un bouillon CT-MAC permet de réduire le nombre de faux positifs. Lors d'une réponse positive pour le système VIDAS ECO une immunoconcentration est réalisée avec le système VIDAS ICE (BioMérieux) qui permet de capturer les bactéries ciblées pour les isoler sur des géloses spécifiques.

Les kits décrits ne recherchent que l'antigène somatique O157 (parfois associé à l'antigène H7). Un résultat positif signe la présence de l'antigène cible et n'apporte qu'une information qui doit être confirmée en passant nécessairement par l'isolement et l'identification de la souche bactérienne à l'origine du message immunologique positif. Des réactions immunologiques croisées se produisent avec d'autres espèces bactériennes telles *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Yersinia enterocolitica* O9, *Salmonella* groupe N et *Stenotrophomonas maltophilia* 555 (AFSSA, 2003).

4.1.3. Protocole de recherche de *E. coli* O157 dans les aliments

Comme toute méthode classique d'isolement de bactéries pathogènes à partir d'un aliment, le protocole inclut i) une étape d'enrichissement en bouillon pour revivifier et multiplier les bactéries stressées de l'aliment, ii) une étape d'enrichissement spécifique ou d'immuno-concentration pour sélectionner la bactérie recherchée, iii) un étalement sur milieu sélectif et une confirmation biochimique ou immunologique des colonies caractéristiques (figure 4).

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 (mTSB-n utilisé dans la norme ISO16654) ou d'acriflavine pour réduire le nombre de microorganismes à Gram positif. Un autre milieu décrit est constitué d'eau peptonnée tamponnée additionnée de vancomycine, de cefsulodine et de cefixime pour supprimer 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 collaborateurs (1996) 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) (figure 4).

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 O157 (Vernozy-Rozand, 1999 ; Vernozy Rozand et al, 1997b). 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 immuno-magnétique (Dynabeads anti *E.coli* O157, Dynal Ltd, UK) repris dans la norme ISO16654 (ISO, 2001) ou les systèmes d'immuno-concentration type VIDAS ICE (Biomérieux, France) actuellement commercialisés permettent la détection de quelques cellules d'*E.coli* O157 dans 25 g de viande hachée de bœuf un jour plus tôt que les analyses classiques.

Isolement 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) (AFSSA, 2003). L'utilisation de ces milieux pour la détection des *E. coli* O157 fermentant le sorbitol est recommandé (De Boer et Heuvelink, 2000).

Tests de confirmation et d'identification des *E. coli* O157

Après isolement, les colonies caractéristiques de *E. coli* O157 sont confirmées par des tests biochimiques (test IMVIC ou utilisation de galeries API20E) et une agglutination par des billes de latex sensibilisées par des anticorps anti O157 (Vernozy Rozand, 1999). Le contrôle de la présence du flagelle H7 exige l'ensemencement de la souche étudiée sur une gélose mobilité, de manière à favoriser la synthèse du flagelle avant son sérotypage à l'aide d'anticorps anti H7. Ces étapes de confirmation sont simples et faciles mais longues (AFSSA, 2003).



Figure 4. Schéma de la détection et de l'identification de souches STEC O157 à partir d'aliments (norme ISO 16.154).

4.2. Détection des STEC non O157

Les STEC non-O157 n'ont pas de caractéristiques biochimiques communes permettant leur isolement sur un milieu particulier. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose «entérohémolysine». La méthode est fondée sur le fait qu'une proportion importante des STEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur gélose contenant des érythrocytes de mouton lavés, additionnés d'ions Ca^{2+} (Beutin *et al.*, 1988). Les colonies présentant une hémolyse caractéristique doivent toutes être confirmées comme STEC par mise en évidence du gène codant les shigatoxines (Beutin *et al.*, 1996). D'autre part, une proportion de STEC non-O157 et STEC O157 fermentant le sorbitol, peut ne pas produire l'entérohémolysine et ne sera pas détectée sur gélose au sang.

De ce fait, la recherche de STEC non O157 nécessite souvent d'utiliser directement la méthode de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) avec l'utilisation d'amorces spécifiques des gènes *stx* codant les shigatoxines pour confirmer leur appartenance à ce groupe de pathogènes. Il est à noter que des billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre d'autres sérotypes de STEC (O26, O111, O118, O91, O145) ont été développées (Dynabeads, Invitrogen) et permettent un enrichissement sélectif.

Dans certains cas, il est possible de résoudre le problème du milieu sélectif. En effet, la plupart des EHEC O26 ne fermentent pas le rhamnose et le dulcitol et produisent l'entérohémolysine ce qui permet de les détecter spécifiquement (Léomil et al., 2005). Des milieux d'enrichissement et d'isolement pour les STEC O26 et STEC O111 ont aussi été développés. Pour ce faire, deux procédures de détection de *E. coli* O26 et de *E. coli* O111 dans les viandes hachées de bœuf ont été décrites (Cataramé et al., 2003).

La recherche d'*E. coli* O26, consiste en une étape d'enrichissement de l'échantillon incubé à 41,5°C dans un bouillon tryptone soja additionné de cefixime (50 ug/l), de vancomycine (40 mg/l) et de tellurite de potassium (2,5 ml/l) suivie d'une étape de séparation/concentration (IMS) et d'un isolement sur milieu Mac-Conkey auquel on a ajouté du rhamnose (20 g/l), de la cefixime (50 ug/l) et du tellurite de potassium (2,5 mg/l)(CT-RMAC).

La recherche de *E.coli* O111 consiste en une étape d'enrichissement dans le bouillon tryptone soja additionné de cefixime (50 ug/l), de vancomycine (40 mg/l) mais sans adjonction de tellurite de potassium suivie d'une étape de séparation/concentration (IMS) et d'un isolement sur une gélose chromogéne (chromocult agar) additionnée de cefixime (50 ug/l), de cefsulodine (5 mg/l) et de vancomycine (8 mg/l) (Cataramé, 2003).

4.3. Méthodes de caractérisation des STEC

4.3.1. Détection de la production de Shigatoxines

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 (Stockbene *et al.*, 1985).

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).

4.3.2. Méthodes génétiques pour la détection des STEC dans les aliments

La détection des gènes codant les facteurs de virulence s'effectue soit directement sur le génome total de la bactérie isolée par hybridation avec des sondes ADN spécifiques marquées (Mainil *et al.*, 1993) soit après amplification d'une partie des gènes recherchés par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1988), par PCR ELISA ou PCR en temps réel (China *et al.*, 2002 a).

Les systèmes P.C.R.

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. Une des amorces est biotinylée. Le produit PCR est immobilisé dans les plaques multi-puits recouvertes de streptavidine qui a une affinité pour la biotine.

Le produit PCR est détecté par une sonde marquée avec une molécule cible (fluorescéine, digoxigénine). L'hybridation de la sonde est mise en évidence en utilisant un anticorps couplé à une enzyme (peroxydase ou phosphatase alcaline) et dirigé contre la molécule cible.

La fixation de l'anticorps est alors révélée par la réaction enzymatique. Cette étape permet de tester de nombreux échantillons dans un format de microplaques et en utilisant le matériel type ELISA (Fach *et al.*, 2001). Cette technique implique cependant de nombreuses opérations postérieures à la PCR.

Toutes les techniques décrites sont des méthodes en point final, on analyse les résultats en fin de PCR.

De nouveaux développements technologiques permettent de réaliser la PCR en temps réel en suivant l'amplification au cours des cycles. La "PCR en temps réel" permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de la PCR. Le fluorochrome est ajouté à la réaction de PCR. La réaction de PCR et la détection du produit de PCR sont donc simultanées. L'appareil de PCR en temps réel mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Les données concernant la quantité du produit amplifié sont enregistrées "en temps réel". Pour la détection de l'amplicon, on peut utiliser un marquage non spécifique ou spécifique.

Le marquage non spécifique utilise comme fluorochrome le SybrGreen® qui se lie à l'ADN bicaténaire. Son manque de spécificité lui permet de se lier indifféremment aux produits de PCR spécifique et non spécifique. Pour vérifier la spécificité du signal obtenu, on réalise une courbe de dissociation permettant de déterminer la température de fusion de l'amplicon.

Le marquage spécifique est utilisé à l'aide d'une sonde spécifique. Dans le cas d'une sonde Taqman™, la sonde est marquée deux fois : un fluorochrome "quencher" et un fluorochrome "reporter". La fluorescence émise par le reporter est absorbée par le quencher situé dans son voisinage et aucune fluorescence n'est détectée. Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase dégrade la sonde située sur son chemin et libère le reporter du quencher. Les fluorophores sont plus éloignés entre eux et l'émission du reporter est augmentée. L'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore reporter est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR. Signalons que d'autres types de sondes peuvent être utilisées tels les "molecular beacons" ou les sondes d'hybridation mais elles sont d'un usage plus restreint (China *et al.*, 2002 b).

Les principaux systèmes PCR développés pour détecter ou caractériser les STEC sont présentés dans le tableau 2. Les cibles génétiques principales 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 β -glucuronidase dont la séquence (mutation du gène à +93) est spécifique de ces souches (Yoshitomi, 2006).

PCR-M-C-EG-H= PCR multiplex classique-électrophorèse en gel d'agarose et hybridation

PCR-S-C-GE = PCR simplex classique-électrophorèse en gel d'agarose. PCR-M-C-GE = PCR multiplex classique-électrophorèse en gel d'agarose. PCR-S-C-EG-RFLP= PCR simplex-classique-électrophorèse en gel d'agarose- restriction fragment length polymorphism. PCR-M-RTST= PCR mulitplex en temps réel avec sonde Taqman. RSS - PCR Restriction-site-specific PCR. PCR-S-RT-MB PCR simplex en temps réel avec sondes moléculaires de type "beacons". PCR-S-RT-ST : PCR simplex en temps réel avec sonde Taqman. PCR-M-RTSG= PCR muliplex en temps réel avec sybrgreen. PCR-S-RTSG= PCR simplex en temps réel avec sybrgreen

Tableau 2. Exemples de systèmes PCR utilisés pour la détection des STEC

L'hybridation ADN/ADN

La détermination du pathotype de la souche peut aussi être effectuée par la technique d'hybridation sur colonies (Karch et Mayer, 1989b, Mainil et al., 1993). Cette technique consiste à immobiliser l'ADN génomique dénaturé de la colonie à étudier sur une membrane et d'utiliser en solution des sondes marquées spécifiques des gènes recherchés (*eae*, *stx1*, *stx2*).

Cette technique très populaire dans les années 80, a eu tendance à être supplantée dans les années 90, par les techniques rapides de PCR. Cependant, récemment, l'hybridation a de nouveau connu un essor certain grâce à la miniaturisation du procédé sous forme de puces à ADN. Dans cette configuration, des sondes oligonucléotidiques sont fixées sur un support solide, le plus souvent, une lame de verre de type lame de microscopie. Ces sondes correspondent à des gènes de virulence et forment un damier sur la surface solide. L'avantage de la robotisation du procédé est la capacité à pouvoir multiplier presque à l'infini (plusieurs milliers de sondes par cm carré) le nombre de sondes fixées. Il sera donc possible de détecter pour une même souche la présence de nombreux gènes d'intérêt. Il peut s'agir de gènes de virulence ou de gènes codant pour une résistance à un antibiotique. D'un autre côté, soit l'ADN des gènes d'intérêt est amplifié par PCR à l'aide d'amorces dont l'une est marquée (biotine, fluorochrome) soit l'ADN génomique est directement marqué (Bekal et al., 2003). Ensuite on effectue l'hybridation «sonde-cible» afin de détecter la présence des gènes d'intérêt. Il est à remarquer que dans l'hybridation sur filtre classique, c'est l'ADN cible qui est fixé et la sonde marquée qui est en solution alors que dans la technologie des puces à ADN, ce sont les sondes qui sont fixées sur le support solide et l'ADN cible marqué qui se trouve en solution.

4.4. Le typage moléculaire des STEC

Il est possible de comparer entre elles les souches isolées afin de déterminer leur degré de parenté. Il s'agit d'identifier la source d'une contamination ou de comparer des souches isolées d'endroits différents. Ces méthodes de typage sont principalement phénotypiques et génotypiques. Le typage phénotypique est basé, entre autres, sur des différences dans la production de certaines protéines comme des enzymes (“multi locus enzyme electrophoresis typing” ou MLEE) ou des récepteurs pour les bactériophages (lysotypage Wentworth, 1963). Le typage génotypique ou génotypage est basé sur la conservation de la séquence d'ADN. Puisque le séquençage du génome reste long et fastidieux, des méthodes indirectes sont utilisées. Elles sont basées soit sur la conservation de sites de restriction (ribotypage, électrophorèse en champs pulsés), sur la PCR (Random Amplification of polymorphic DNA ou RAPD (De Wolf et al., 2004); Repetitive element-PCR ou Rep-PCR (Jones et al., 2005) ou

sur les deux techniques (Amplification of random polymorphic DNA ou AFLP (Jones *et al.*, 2005)). Enfin, dans le multi loci sequencing typing (MLST) (Urwin et Maiden, 2003), la séquence de différents gènes est comparée entre les souches et les mutations ponctuelles sont repérées. Le pouvoir de discrimination d'une méthode peut être défini comme le nombre de patrons différents obtenus sur le nombre de souches testées (China, 2002b).

Ainsi, Grif et Collaborateurs (1998) ont comparé 47 souches de STEC O157 (d'origine humaine, alimentaire ou animale) par différentes méthodes : le ribotyping, la RAPD, l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) et le lysotyping. Le ribotyping s'est montré peu discriminant, le lysotyping a montré un pouvoir discriminant de 21 % (10 patrons différents pour 47 souches). La PFGE a montré 16 patrons majeurs (soit un pouvoir de discrimination de 34 %). La RAPD quant à elle, a permis de discriminer toutes les souches entre-elles excepté pour les souches isolées du même échantillon de lait. Le problème majeur de la RAPD est son faible degré de reproductibilité. Dans une étude, au Japon les auteurs (Izumiya *et al.*, 1997), ont comparé 825 souches de STEC O157:H7 isolées de cas humains au Japon par PFGE. Six patrons électrophorétiques (pulsotypes) ont été mis en évidence. Les souches isolées d'une même épidémie montraient le même pulsotype. Smith et collaborateurs (2000) ont comparé 71 souches de STEC O157 par PFGE et AFLP. Ces deux méthodes ont montré le même pouvoir de discrimination avec 27 patrons différents. En raison de son pouvoir discriminant important et sa bonne reproductibilité, la PFGE tend à s'établir comme la méthode de référence en matière de typage moléculaire bactérien. Des réseaux de banques de données sont constitués tant au Etats-Unis qu'en Europe via les réseaux PulseNet (Gerner-Smidt et Scheutz, 2006 <http://www.fsis-pfge.org/pulsenet.html>). La technique de MLST pratiquée sur 9 gènes de STEC O157 s'est montrée incapable de distinguer des souches qui, par ailleurs, montraient un pulsotype différent (Noller *et al.*, 2003). Par contre, Beutin et collaborateurs (2005) ont analysé 54 STEC O103 par PFGE et MLST. La MLST a montré 7 profils différents et la PFGE, 6 patrons différents. La MLST fait aussi l'objet de banques de données qui permettent de comparer une nouvelle souche avec les souches de la banque (www.mlst.net; www.shigatox.net). La MLST et la PFGE semblent être les méthodes les plus prometteuses en termes de reproductibilité et de pouvoir discriminant.

4.4.1. Relations clonales entre les souches O157:H7.

Les études de clonalité réalisées sur les souches de sérotype O157:H7 suggèrent la répartition mondiale d'un seul clone, très conservé (Allison, 2000). Cependant, Baker et collaborateurs (AFSSA, 2003) ont suggéré qu'aux Etats-unis, deux clones existeraient : un associé au réservoir bovin moins transmis et moins pathogène pour l'homme et un deuxième retrouvé fréquemment en situation pathogène chez l'homme.

4.4.2 Relations clonales entre les STEC non O157

Les souches pathogènes de même sérotype isolées dans différents pays à plusieurs années d'intervalle sont génétiquement proches et appartiendraient à un même clone.

Par contre, des différences importantes existeraient entre les souches de sérotypes différents. Les STEC O26, O103:H2, O111:H-, O157:H7 appartiennent à des lignées différentes qui auraient émergé indépendamment les unes des autres. Certaines de ces lignées pourraient être particulièrement aptes à subir des événements de transferts horizontaux, comme cela a été montré pour O91:H21 (AFSSA, 2003; Pradel, 2002).

5. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR LES STEC

Les STEC sont des agents zoonotiques. Les ruminants et essentiellement les bovins sont considérés comme le réservoir majeur de ces pathogènes responsables de maladies humaines. Les infections à STEC/EHEC sont souvent sporadiques, mais elles peuvent aussi donner naissance à des épidémies de grande ampleur. Le sérotype O157 a été le premier et le plus fréquemment impliqué dans les formes graves des infections à STEC sur plusieurs continents. L'apparition de nombreux foyers d'infections à d'autres sérotypes de STEC a permis d'appréhender de nouvelles approches pour mieux détecter ce type de pathogènes. Le développement des moyens de diagnostic a permis de mieux connaître différents aspects de l'épidémiologie de ces souches.

5.1. Emergence des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines

Les STEC montrent une pathogénicité variable pour l'homme. La virulence d'une souche varie en fonction du nombre et du type de facteurs de virulence qu'elle héberge et exprime mais aussi en fonction du statut immunologique de l'hôte. On a montré que l'implication de bactériophages dans le transfert de gènes de virulence alliée aux mutations, permet une évolution rapide des bactéries, et peuvent être à l'origine d'émergences. Les STEC tels qu'ils sont définis auraient probablement acquis récemment la plupart de leurs gènes de virulence par transfert horizontal de matériel génétique. C'est ce que semble montrer l'analyse moléculaire et la comparaison de la distribution des gènes spécifiques de virulence de cette famille (Caprioli *et al.*, 2005).

L'explication logique de l'émergence des STEC comme agents pathogènes serait la présence de ces gènes sur des éléments mobiles, comme les gènes *stx1* et *stx2* situés sur des prophages, le gène *eae* (intimine) sur un îlot de patogénicité et le gène *ehxA* et *katP* sur un plasmide qui auraient été transmis horizontalement en plusieurs étapes. Les variations situées au niveau de ces éléments génétiques seraient à l'origine de l'évolution du génome d'*E. coli* (Caprioli *et al.*, 2005).

Différentes hypothèses ont été développées quant à l'émergence des STEC/EHEC. Les relations clonales entre les EPEC et les STEC ou EHEC sont très complexes et de nombreuses souches appartiennent à des sérotypes communs aux deux pathovars.

Les EHEC seraient un groupe de clones dérivant des *E. coli* entéropathogènes hébergeant le gène d'attachement effacement (*eae*). L'acquisition des gènes *stx* par deux types de clones EPEC aurait conduit à l'émergence de deux lignées majeures d'EHEC : (i) la lignée EHEC-1, constituée de souches O157:H7 et O145:H-, considérée comme hautement pathogène pour l'homme, où le LEE aurait été acquis et intégré au niveau du site *selC* et (ii) la lignée EHEC-2, constituée de souches O26:H11 et O111:H8 où le LEE aurait été acquis au niveau du site *pheU* (AFSSA, 2003).

L'acquisition d'ADN étranger par une bactérie est un mode d'évolution bien connu. Elle peut se faire entre deux bactéries de la même famille (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Erwinia*) ou même entre bactéries de familles différentes. Les mécanismes qui sont intervenus lors de l'émergence et l'évolution des clones EHEC ne sont pas complètement élucidés. Cependant les différences génétiques observées dans le génome de ces pathogènes et *E. coli* K-12 révèlent l'existence de nombreux échanges génétiques et la présence d'îlots de gènes supplémentaires appelés les îlot O (Caprioli *et al.*, 2005).

Les EHEC O157 se distinguent des autres *E.coli*, notamment, par le fait qu'ils produisent plusieurs toxines Stx, qu'ils ne fermentent pas le sorbitol et qu'ils n'expriment pas d'activité β -glucuronidase. Le gène qui code pour cette dernière activité, *uidA*, est susceptible de subir des mutations silencieuses. Grâce à des techniques moléculaires, on a comparé ces différentes caractéristiques génotypiques et phénotypiques chez plusieurs souches EHEC O157 et d'autres souches apparentées. En se basant sur ces propriétés, on a pu reconstituer le puzzle jusqu'à un ancêtre commun et déduire les différentes étapes ayant conduit à l'EHEC O157 et aux autres souches apparentées.

Un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7 a été proposé par Feng et collaborateurs (1998) sur base des évènements qui seraient intervenus à partir d'un ancêtre génétiquement le plus proche des O157: H7, d'un EPEC O55:H7 (GUD+, SOR+) (figure 5).

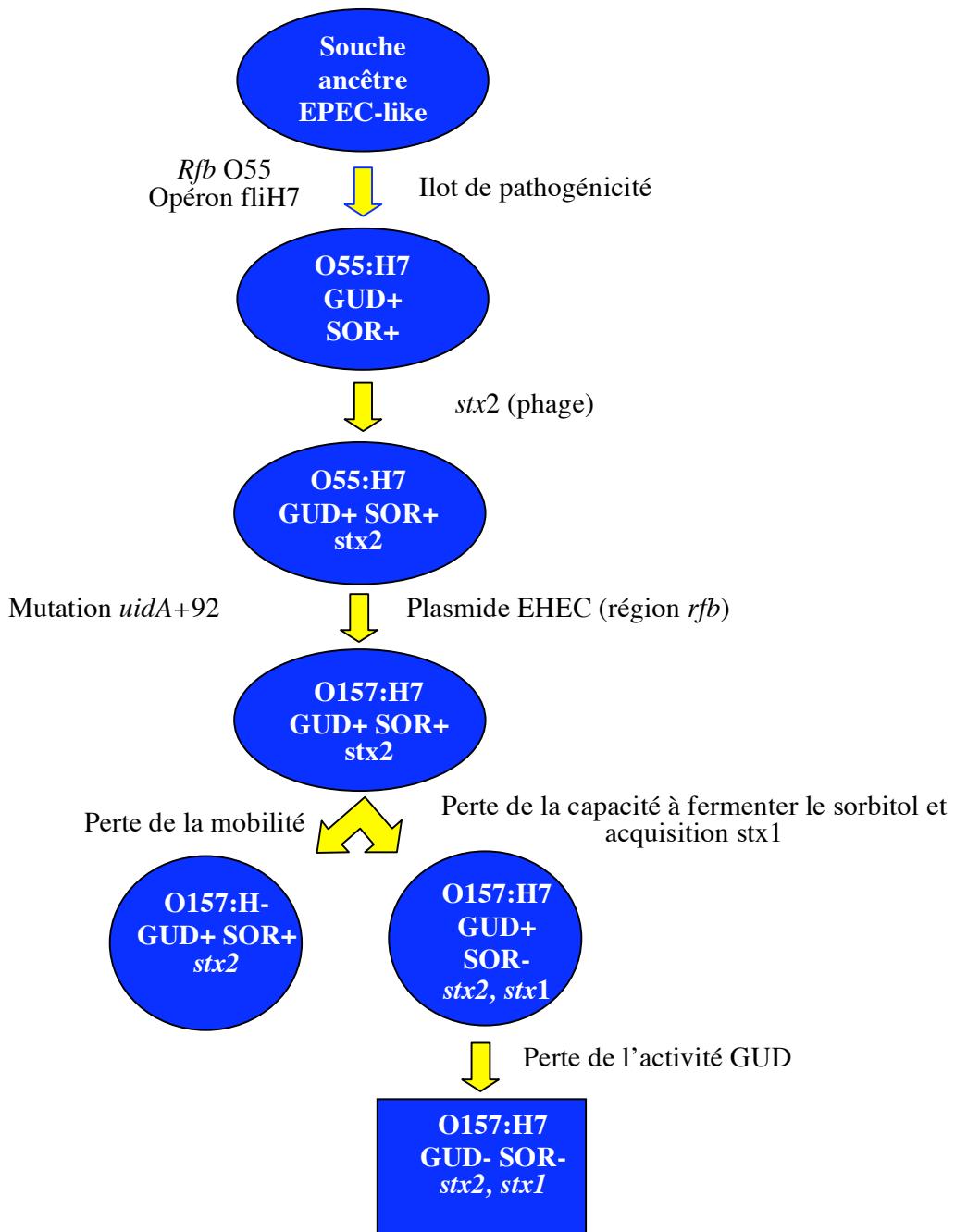


Figure 5. Apparition des clones épidémiques STEC O157. Le modèle commence avec une souche EPEC-like, capable de fermenter le sorbitol (SOR+) et d'exprimer une activité β -glucuronidase (GUD+). A partir de là, cette souche a acquis les gènes codant l'antigène somatique O55 et pour l'antigène flagellaire H7 et le LEE (Mc Daniel *et al.*, 1995). Le LEE peut être localisé au niveau de différents sites dans le chromosome bactérien. L'étape suivante a été l'acquisition du gène *stx2*, probablement par transduction avec un bactériophage, il en résulte l'émergence du clone O55:H7 *stx2*. Deux changements sont ensuite apparus, l'acquisition du plasmide EHEC codant les hémolysines et l'acquisition de la région *rfb* nécessaire à la synthèse de l'antigène O157 modifiant l'antigène O55 en O157. Cette région code pour l'antigène somatique O157 ainsi que pour un système de sécrétion de type III (Levine *et al.*, 1987 ; Tarr *et al.*, 2000). C'est à cette étape que la souche acquiert une mutation silencieuse en position +92 du gène *uidA*. On a donc à ce stade, une souche EHEC O157 productrice de Stx2, mais SOR+, GUD+. A partir de cette souche, deux lignées d'évolution existent. L'une, va perdre sa mobilité, mais garder son activité SOR+ et GUD+ alors que l'autre perd sa capacité à fermenter le sorbitol et acquiert le gène de *stx1* grâce à un bactériophage. L'étape ultime sera la perte de l'activité β -glucuronidase (par mutation de *uidA*) (Monday *et al.*, 2001) et engendrera le prototype EHEC O157 producteur de Stx1 et/ou Stx2, SOR- et GUD-.

5.2. Epidémiologie humaine

Toute personne est potentiellement sujette au risque et peut développer une diarrhée si elle ingère des STEC. Cependant, les jeunes enfants de moins de 5 ans, les personnes âgées de plus de 65 ans ou les personnes ayant pris un traitement antibiotique récemment sont plus susceptibles de développer la maladie (Griffin *et al.*, 1990).

5.2.1. Sérogroupes incriminés

Les sérotypes les plus incriminés lors d'infections sporadiques ou d'épidémies sont les sérotypes O157:H7 et O157 non mobiles ou H-. En 1984, le sérotype O145:H- a été impliqué lors d'une épidémie affectant plus de 100 enfants au Japon. Il a été ensuite isolé chez les bovins aux Etats-Unis, Canada puis en Europe (Padola *et al.*, 2002). Plus de 200 autres sérogroupes sont aussi mis en cause dans la survenue d'infections à EHEC et leur fréquence ne cesse d'augmenter. Parmi les plus fréquemment isolés chez les patients citons les sérogroupes : O26, O103, O111 et O145. De nouveaux clones dont O118:H16 et O121:H19 ont récemment été isolés dans des cas d'infections humaines (Beutin *et al.*, 2004). Notons que la recherche des STEC est souvent limitée au seul sérotype *E.coli* O157:H7 (SOR-; GUD-) dont le biotype est particulier et pour lequel il existe des méthodes de détection validées à l'échelon international. Néanmoins, des cas de SHU ont été également associés à des souches STEC O157:H- (SOR+ GUD+). Les STEC O157:H- fermentant le sorbitol ont été impliqués pour la première fois en 1988 lors d'une épidémie de SHU affectant des enfants d'Allemagne. Ce nouveau phénotype est à l'origine de la majorité des cas de SHU en pédiatrie dans cette région d'Allemagne (Gunzer *et al.*, 1992). Ce pathotype possède en commun avec les STEC O157 sorbitol négatifs le plasmide de 90kb, les phages de conversion pour *stx2* et le gène *eae*.

5.2.2. Incidence des infections humaines aux STEC:

L'incidence des cas d'infections humaines à STEC varie considérablement d'un continent à un autre et d'une région à une autre. Dans les pays les plus touchés (Etats-Unis, Canada, Ecosse, Angleterre, Allemagne, Suède, Argentine et Japon) l'incidence annuelle de ces infections peut être supérieure à 8 pour 100 000 habitants (Mead et Griffin, 1998).

Aux USA, de 1982 à 2002, 350 épidémies responsables de 8.598 cas, 1.493 hospitalisations (17 %), 354 cas de SHU (4 %) et 40 décès (0,5 %) furent rapportés dans 49 Etats. Les aliments ont été impliqués dans 52 % des épidémies, l'eau dans 9 %, la contamination interhumaine dans 14 %. Le contact avec un animal contaminé dans 3 % et 0,3 % ont eu pour cause une contamination de

laboratoire. La viande hachée de bœuf a été responsable de 41 % des épidémies d'origine alimentaire (Rangel et al., 2005).

Les plus importantes épidémies remontent à la fin de l'année 1992 et en début de 1993 lorsque quatre Etats de l'Ouest firent l'expérience d'une sévère épidémie liée à des hamburgers mal cuits contaminés provenant d'une même chaîne de restauration rapide. Plus de 700 personnes dans quatre Etats différents (Washington, Idaho, Californie, Nevada) furent infectées. Il y eut 51 cas de SHU et quatre morts. Depuis cette vague épidémique, l'incidence des infections à EHEC O157 n'a pas cessé d'augmenter jusqu'en 2000 (626 cas d'infections à STEC O157 et 57 cas à STEC non O157). A partir de cette année là, une légère diminution du nombre de cas a pu être observée : en 2001 (560 cas à STEC O157 et 61 à STEC non O157), en 2002 (638 cas à STEC O157 et 35 cas de STEC non O157) et en 2003 (444 cas à STEC O157 et 4 à STEC non O157) (<http://www.cdc.gov/foodnet/reports.htm> 2004)

Aux Etats-Unis, la fréquence estimée des infections liées aux EHEC non-O157 est aussi importante que celles dues au sérogroupe O157. Les STEC non-O157 causent environ 37.000 cas d'infections annuellement. Les sérotypes O26, O111 et O103 sont prédominants. O26 est le plus fréquemment rencontré lors d'infections à STEC non O157 et STEC O111 est considéré comme le deuxième agent responsable des cas de SHU après STEC O157:H7 (Brooks *et al.*, 2005).

Une forte prévalence d'infections à STEC O157 (5 fois plus élevée qu'en Amérique du Nord) est enregistrée dans les régions de l'Amérique du Sud et spécialement en Argentine où le SHU est endémique (Mead et Griffin, 1998). En moyenne, 300 nouveaux cas et une incidence de 9,2 pour 100.000 habitant (enfants de moins de cinq ans) sont reportés annuellement en Argentine.

Dans les deux hémisphères, les infections surviennent plus fréquemment en été qu'en hiver.

Année	Pays	état-Région	Sérogrupe	cas	SHU	décès	Source
1982	USA	Oregon-Michigan	O157:H7	46			Viande hachée
1984	USA	Nebraska	O157:H7	34			Hamburger
1985	Royaume uni	Angleterre	O157:H7	24	1		Légumes
							Viande hachée
1986	USA	Washington	O157:H7	37			de bœuf
1987	USA	Utah	O157:H7	51	8		Viande hachée de bœuf
1988	USA	Wisconsin	O157:H7	61			roti de bœuf
1988	USA	Minesota	O157:H7	32			pâté de bœuf
1989	USA	Missouri	O157:H7	243	2	4	eau de distribution
1990	Japon		O157:H7	42	14		eau de distribution
1990	Royaume uni		O157:H7	4			eau de distribution
1990	USA	Dakota du nord	O157:H7	70	2		Rôti de bœuf
							Viande hachée
1991	Canada		O157:H7	152	22	2	de bœuf et de caribou
1991	Royaume uni	Angleterre	O157:H7	16	5		Yaourt
1991	USA	Massachusset	O157:H7	23	5		Jus de pomme
1992	Swaziland		O157:NM	>2500			eau de distribution
1992-93	USA	Washington	O157:H7	501	45	3	Hamburger
1992-93	USA	4 Etats	O157:H7	583	41	3	Hamburger
		Angleterre et pays de Galles	O157	17			Hamburger
1993	Royaume uni	Angleterre	O157	7			lait cru
1994	Royaume uni	Angleterre	O157:H7	70	9		lait pasteurisé
		Washington					
1994	USA	Californie	O157:H7	23	2		Salami sec
1994	USA	Montana	O104:H21	18			lait cru
1995	Australie		O111:H-	23	23	1	Saucisse sèche fermentée
1995	Canada	Ontario	O157:H7	21			Salade
1995	Royaume uni	Angleterre	O157	14	2		Plats froids (bœuf, porc)
1995	Suède		O157	110	29		inconnue
1995	USA	Oregon	O157:H7	11			Viande de cerf
1995	USA	Montana	O157:H7	>70	1		Laitue
1996	Canada		O157:H7	70	14	1	Jus de pomme
1996	Japon		O157:H7	9451		12	Radis blanc
1996	Japon		O157:H7	183			Salade de pommes de terre
1996	Royaume uni	Ecosse	O157:H7	512	34	17	viande de bœuf
1996	USA	Connecticut	O157:H7	61			Laitue
1996	USA	Connecticut	O157:H7	14			Jus de pomme
1996	USA	Canada et MWUSA	O157:H7	70	14	1	Jus de pomme
1997	Espagne	Iles canaries		39	1		eau de distribution
1997	Japon		O157	20	2		Repas d'école
1997	Japon	Okayama	O157	58			Repas d'hôpital
1997	Royaume uni	Ecosse	O157:H-	37			Gâteau à la crème
1997	Royaume uni	Angleterre	O157	3	2		Contact avec des chèvres
1997	Royaume uni	Angleterre	O157	8	1		Environnement contaminé
1997	USA	Colorado	O157:H7	15			Hamburger
1997	USA	Mich-Virg.	O157	108	4		Luzerne
1998	Canada	Ontario	O157:H7	39			Salami
1998	Canada	Manitoba	O157:H7	9			Hamburger
1998	Japon			36		3	Salade

Année	Pays	état-Région	sérogroupe	cas	SHU	décès	Source
1998	Royaume uni	Angleterre	O157	7			Crème non pasteurisée
1998	USA	Wisconsin	O157:H7	55			Fromage frais caillé
1998	USA	Californie	O157	14	3		Légumes
1998	USA	Indiana	O157:H7	33			Coleslaw
1998	USA	Caroline du nord		142			Coleslaw
1998	USA	Ontario	O157:H7	10			Jus de pomme
1998	USA	Wyoming	O157:H7	157	4		eau de distribution
1999	Canada	Manitoba	O157:H7	10			Viande hachée de bœuf
1999	Canada		O157:H7	143			Salami
1999	Royaume uni	Pays de Galle	O157	28			Fromage lait cru
1999	Royaume uni		O157	38			lait cru
1999	Royaume uni	Ecosse	O157:H7	6			Eau de source
1999	Royaume uni	Angleterre	O157:H7	14	1		eau de baignade
1999	Texas		O111	8	2		Salade
1999	USA	3 Etats	O157:H7	13	3		tacos de bœuf
1999	USA	Ohio		30			Coleslaw
1999	USA	Nebraska	O157:H7	72			Laitue
1999	USA	New York	O157:H7	116	11	3	eau de distribution
1999	USA	Texas	O157:H7	22			eau de distribution
1999	USA	Washington	O157:H7	5	1		eau de baignade
2000	Canada	Ontario	O157:H7	>2000	26	14	eau de distribution
2000	Royaume uni	Angleterre	O157	61	1		lait cru
2000	USA		O157:H7	30		1	Restauration
2000	USA	Minnesota	O157:H7	55	4		Viande hachée
2000	USA	Ohio	O157:H7	29			de bœuf
2000	USA	Pennsylvanie-Washington	O157:H7	56	16		eau de surface
2001	Autriche		O157:H-	2	1		Ferme pédagogique
2001	Canada	Colombie britannique	O157:H7				lait de chèvre cru
2001	Japon		O157	264			lait de chèvre cru
2002	USA	Colorado	O157:H7	18	2		Viande
2002	USA		O157:H7	29			viande de bœuf
2002	USA	colorado	O157:H7	9	1		Laitue
2002	USA	7 états	O157:H7	28	5		Viande hachée de bœuf
2003	Franec		O157	2			Viande hachée de bœuf
2003	Irlande		O157	5			Concombre
2003	Irlande		O157	3			Restauration
2003-2004	Danemark	Copenague	O157:H-	25	0	0	Restauration
2004	Japon	Okinawa	O157:H7	3			Lait
2004	Royaume uni	Cornuailles	O157	7			Viande hachée de bœuf
2004	USA	Caroline du nord	O157:H7	108	15		eau de baignade
2005	Canada		O157	3			Zoo
2005	Pays-bas		O157	21			lait cru
2005	Suède		O157	110	7		steak tartare
2005	Suisse	Freiburg	O157	7	2		Laitue
2005	USA	Oregon	O157:H7	18			eau de distribution
2005	USA	Or-Wash.		21			Poisson
2005	USA	Floride	O157:H7	63	7	1	lait cru
2005	USA	Arizona	O157:H7	2			zoo
2006	Norvège		O103	7			Zoo
2006	Royaume uni	Ecosse	O157	13	4		Viande hachée
2006	Royaume uni	Manchester	O157	5	3		garderie
2006	USA	26 états	O157:H7	192	30	1	pataugeoire
							Epinards

La source d'information principale est le Promed-mail. (<http://www.promedmail.org>)

Tableau 3. Exemples d'épidémies à STEC O157 dans le monde

Deux mille trois cent vingt neuf cas d'infections à STEC ont été enregistrés dans 18 pays d'Europe en 2004 au lieu de 2.026 en 2000 soit une augmentation d'environ 15 % de cas enregistrés. Une prédominance du sérogroupe O157 a été constatée dans la majorité des pays d'Europe non continentale (Irlande, Royaume Uni) tandis que dans certains pays d'Europe continentale comme le Danemark, l'Italie, l'Allemagne, le Luxembourg et la Slovénie, les STEC non O157 sont plus importants. Les systèmes de surveillance n'étant pas les mêmes dans tous les pays, il est difficile de comparer les différentes données néanmoins le nombre de cas d'infections enregistrés en 2004 est élevé en Ecosse (214), en Suède (200), en Angleterre (702) et au Danemark (168), (European Commission, EFSA, 2004) (tableau 4, figure 6).

L'Ecosse est le pays européen qui a connu les deux plus grandes épidémies à STEC O157. Plus de 100 personnes dont 69 cas confirmés par le laboratoire et un décès ont été rapportés suite à une contamination à partir de lait cru en 1994.

Lors de la deuxième épidémie, survenue en 1996, 500 personnes ont été malades, 272 cas ont été confirmés par le laboratoire et 20 personnes sont décédées. La consommation de viande contaminée provenant d'une même boucherie a été la cause de l'épidémie (Cowden *et al.*, 1997).

En 2000, l'Ecosse a enregistré 5 épidémies (deux d'origine alimentaire) affectant plus de 31 personnes en 2000, 10 épidémies en 2001 et plus de 44 personnes atteintes.

L'Angleterre et le pays de Galles ont aussi enregistré un plus grand nombre de cas d'infections à STEC pendant les années 1999 à 2000 (17 cas d'infections à STEC par million d'habitant en Angleterre, 751 cas cliniques confirmés de SHU et 16 épidémies en 2001). Quatre des épidémies enregistrées en 2001 ont impliqué comme source de contamination les matières fécales de lapins sauvages. L'année suivante (2002), la présence de STEC O157 dans les matières fécales d'oiseaux a été à l'origine d'une épidémie en Grande Bretagne (European Commission, 2002).

En Suède, le nombre de cas d'infections à STEC a varié entre 69 et 96 cas entre 1998 et 2001. La Suède a enregistré trois épidémies à STEC O157, une en 2000 affectant trois personnes qui ont été exposées aux animaux dans une ferme, deux autres en 2002 impliquant pour l'une l'eau de mer et pour l'autre des saucisses fumées de fabrication artisanale (European Commission, 2002).

En Allemagne, L'incidence des cas d'infections à STEC est importante : 795 cas STEC ont été enregistrés en 2004. L'Allemagne a connu deux épidémies en 2002 impliquant particulièrement des STEC O157 non mobiles, fermentant le sorbitol (European Commission, 2002).

En France, aucune épidémie à STEC n'a été identifiée jusqu'en 1992, date à laquelle des cas SHU ont été décrits chez quatre personnes ayant consommé du lait cru de vache et de chèvre. L'agent causal

n'a pas été identifié. Depuis, plusieurs épidémies à STEC ont été rapportées dont une à STEC O157 en 2001 à partir de couscous avec merguez (10 cas, 1 SHU et 0 décès), une en 2002 à STEC O148:H8 à partir de viande de mouton (11 cas; deux SHU et 0 décès) (AFSSA, 2003) et une épidémie à STECO157 :H7 en 2004 à partir de fromage de chèvre contaminé (European Food Safety Autorithy, EFSA, 2006). Deux importantes épidémies ont été signalées en France en 2005. Au cours de la première, 69 personnes dont 57 enfants ont été victimes d'une contamination à STEC O157 à partir de steak haché surgelé. Seize enfants ont présenté un SHU, 7 ont été dialysés, aucun décès n'a été enregistré. La deuxième épidémie a impliqué un fromage "type camembert" au lait cru contaminé par STEC de sérotype O26. L'Institut de Veille Sanitaire a fait état de cas de SHU chez 6 enfants dans le Nord de la France. Les fromages furent très vite retirés du commerce (Institut de Veille Sanitaire, <http://www.invs.santé.fr>, consulté en avril 2007).

En France, du fait de l'absence de surveillance épidémiologique des infections gastro-intestinales à STEC intégrant ou non des colites hémorragiques, la répartition des sérogroupes n'est connue que dans le cadre de SHU d'enfants de moins de 15 ans. Il apparaît une forte proportion (45 %) du sérogroupe O157 sur la période 1996-2003 (Espié *et al.*, 2004). Les autres sérogroupes impliqués dans des cas de SHU depuis 2002 sont les sérotypes O145, O91, O17, O26, O103, O128, O111 (Espié *et al.*, 2004).

En Belgique, deux petites épidémies à STEC O157 ont été signalées. La première en 2001 due à l'ingestion de filet américain provenant du même boucher et impliquant au moins 5 personnes (Ducoffre, Institut de Santé Publique (ISP), 2004). La seconde en 2004, dans une institution psychiatrique a donné lieu à 4 cas de SHU et à l'identification d'un porteur au sein du personnel de cuisine (Ducoffre, ISP, 2005).

Le Danemark a enregistré les premières épidémies en 2004. Le sérotype STEC O157 a été impliqué dans la plus importante, affectant plus de 25 personnes contaminées à partir de produits laitiers. Le contact d'enfants avec des animaux de ferme excréteurs a été également une des causes des épidémies (European Food Safety Autorithy, EFSA, 2006).

En Italie, le nombre de cas d'infections à STEC a été de 24 cas en 2004. Les STEC non O157 et particulièrement le sérogroupe O26 a été responsable de la majorité des cas (40 %) des infections. En 2004, une épidémie a été enregistrée suite à la consommation de saucisse fabriquée à partir de viande de porc (EFSA, 2006).

année	Pays	Cas	O157	NonO157	SHU	O157	NON-O157	épidémies
2001	Autriche	35	20	15	10	5	5	
	Allemagne	1018	156	478	60	32	9	
	Angleterre	768	768	-2	17	17	0	16
	Belgique	46	30	16	6	5	1	1
	Danemark	90	24	65	7	2	4	1
	Espagne	13	13	0	13	13	0	
	Ecosse	236	236	0				10
	France	42	33	8	42	33	8	
	Finlande	17	8	7	2	1	1	
	Irlande	56	52	4	3	3	0	
	Italie	23	4	15	16	1	11	
	Portugal	17	5	12				
	Suède	99	96	3	9	6	3	
	Norvège	15	6	9				
Irlande du nord	Irlande du nord	52	52	0				1
	Pays-bas	41	35	6				
2002	Autriche	42	28	14	12	7	5	
	Allemagne	1253	-	-	144	-	-	20
	Angleterre	596	595	1	17			
	Belgique	39	26	13	1	0	1	
	Danemark	137	23	114	1	0	1	2
	Espagne	9	-	-	0	-	-	-
	Ecosse	229		0				
	France	43	27	16	43	27	16	
	Finlande	16	8	7	2	2	0	
	Irlande	71	70	1	5	5	0	
	Italie	27	7	20	0		9	
	Suède	110	110	0	14	14	0	2
	Norvège	16	11	5	2	0	2	
	Irlande du nord	27		0				
	Pays-bas	49	49	0	37	37	0	
2003	Autriche	39	28	11	11	10	1	
	Allemagne	1161	163	436	61	44	6	3 décés
	Angleterre	677	675	2	665	663	2	
	Belgique	47	21	26	8	7	1	
	Danemark	131	30	96	3	3	0	
	Ecosse	174	165	9	20	19	1	
	France	51	42	18	51	42	18	
	Finlande	15	6	9	1	0	1	
	Irlande	95	88	7	5	4	1	
	Italie	18	3	15	13	1	12	
	Portugal	12	0	12	3	0	3	
	Suède	58	6	52	6	6	0	
	Norvège	17	13	4	2	1	1	
	Irlande du nord	51		0				1
	Pays-bas	58	57	1	7	7		
2004	Autriche	45	13	32	10	9	1	
	Allemagne	903	90	813	42	67		
	Royaume Uni	898	889	9	37	35	2	
	Belgique	36	16	20	9	9	0	
	Danemark	163	44	119	5	3	2	
	France	61	50	11	61	50	11	
	Finlande	10	40	60				
	Irlande	57	88	12	4	50	0	
	Italie	20	7	13	17	4	13	
	Portugal	25	3	22	1	1	0	
	Suède	149			5	5	0	
	Norvège	12	7	5				
	Pays bas	30	30	0	5	5	0	
	slovaquie	16	0	16				
République tchèque	République tchèque	1743	314	-				
	Pologne	81	80	1				
	Hongrie	7	5	2	2	0	2	
	Grèce	84			84			

Les données sont reprises des rapports annuels « trends and sources of zoonosis, agents and antimicrobial resistance in EU » de l'EFSA (<http://www.efsa.eu.int>).

Tableau 4. Incidence des infections à STEC O157 en Europe

cas/million hab.

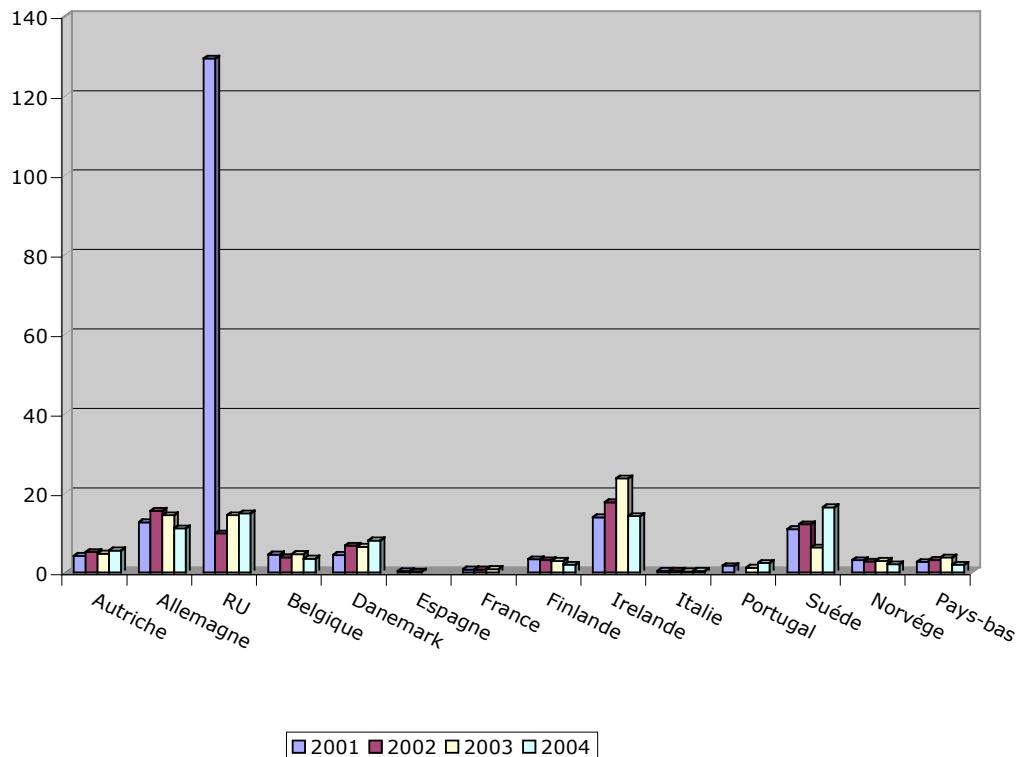


Figure 6. Incidence des infections à STEC O157 dans divers pays européens en nombre de cas par million d'habitants

En Australie, la première épidémie date de 1995 suite à la contamination de saucisses sèches fermentées par des STEC O111:H-. Vingt-trois cas de SHU et un décès ont été signalés lors de cette épidémie (Center for Disease Control, CDC, 1995).

Au Japon, une importante épidémie est survenue en juillet 1996 dans la ville de Sakai où 5.727 personnes furent contaminées par des germes de radis blancs dans une cantine scolaire. Dans ce pays, le nombre de cas a varié de 100 à 1250 entre 1994 et 2000, puis s'est élevé à 2771cas en 2004 (Michino *et al.*, 1999; European Commission., EFSA, 2004).

En Irak, une étude rapporte une prévalence de 11,5 % d'EHEC O157:H7 dans les selles de 200 enfants atteints de diarrhées hémorragiques (Shehib *et al.*, 2003)

En Afrique, très peu de données sont disponibles. La première épidémie de diarrhée hémorragique est survenue en Afrique du Sud en novembre 1992. STEC O157 non mobile a été retrouvé dans l'eau et dans la viande de bœuf (probablement à l'origine de la contamination) (Effler *et al.*, 2001).

Entre novembre 1997 et le 20 avril 1998, 298 personnes ont été atteintes de diarrhées sanguinolentes au Cameroun. Les analyses de laboratoire réalisées pendant l'épidémie (taux de létalité de 16,4 %) ont montré une amibiase chez un patient sur trois et trois types de bactéries pathogènes : *Shigella dysenteriae* multirésistante de type 1, *Sh. boydii* et *Escherichia coli* entéro-hémorragique (Cunin *et al.*, 1999).

5.3. Modes de transmission

Les trois voies principales d'infection sont l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminée, la transmission de personne à personne et le contact direct avec les animaux ou l'environnement des fermes.

5.3.1. La transmission alimentaire

La majorité des infections est due à l'ingestion d'aliments contaminés (tableau 5). La viande de bœuf constitue la principale source de contamination suite à une cuisson insuffisante qui ne permet pas d'atteindre à cœur une température suffisante pour éliminer les bactéries pathogènes (Roberts *et al.*, 1995). Les résultats de plusieurs enquêtes ont montré que les viandes de bœuf crues ou insuffisamment cuites, les viandes hachées (Heuvelink, 1999 b), le lait non pasteurisé et les produits laitiers (fromage au lait cru, fromage frais) (Arimi, 2005); les produits fermentés (saucisse sèche fermentée) (Paton *et al.*, 1996); 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) et les pousses de radis ont été impliqués dans des cas d'infections à STEC (Michino *et al.*, 1999).

L'hypothèse d'une contamination croisée avec des aliments contaminés ou lors de l'utilisation d'ustensiles souillés a été avancée. C'est le cas d'ouvriers au Royaume-Uni qui se seraient infectés lors de la manipulation de légumes crus contaminés. Toutefois, ces légumes n'ont pas transmis directement la maladie aux personnes qui les avaient consommés (Morgan *et al.*, 1988).

Pays	année	denrée alimentaire	STEC 0157	référence
Suède	1996	carcasse bovine	0,21%	EC, Trends and sources, 1998
Suède	1997	carcasse bovine	0, 31%	EC, Trends and sources, 1998
Danemark	1997	viande bovine	0, 10%	EC ,Trends and sources, 1998
Allemagne	2004	viande bovine	2, 90%	EFSA, Trends and sources, 2004
Irlande	2004	viande bovine	0, 2 et 0, 3%	EFSA, Trends and sources, 2004
Italie	2004	viande bovine	38, 20%	EFSA, Trends and sources, 2004
Pologne	2004	viande bovine	8, 30%	EFSA, Trends and sources, 2004
Espagne	2004	viande bovine	4%	EFSA, Trends and sources, 2004
Italie	2004	lait de vache	0, 20%	EFSA Trends and sources, 2004
Irlande	2004	viande de porc	1, 80%	EFSA ,Trends and sources, 2004
Italie	2004	Viand de porc	0, 80%	EFSA Trends and sources, 2004
Espagne	2004	viande de porc	0, 70%	EFSA,Trends and sources, 2004
Irlande	2004	viande de mouton	0, 80%	EFSA, Trends and sources, 2004
Danemark	2001	carcasse bovine	0, 70%	EFSA,Trends and sources, 2001
Danemark	2002	carcasse bovine	4, 60%	EC, Trends and sources, 2002
Norvège	2003	carcasse bovine	0, 04%	EC, Trends and sources, 2003
Norvège	2003	carcasse de mouton	0, 08%	EC, Trends and sources, 2003
USA	2000	carcasse bovine	17, 80%	Elder et al., 2000
Italie	2001	carcasse bovine	12%	Bonardi et al., 2001
Irlande	2003	carcasse bovine	11%	McEvoy et al., 2003
Turquie	2003	carcasse bovine	3, 60%	Gun et al., 2003
Royaume Uni	2001	carcasse bovine	1, 40%	Chapman et al., 2001
Belgique	2003	carcasse bovine	1, 02%	Tutene et al., 2003
Tchéquie	2004	carcasse bovine	1%	Lukasova et al., 2004
Espagne	2004	lait de brebis	0, 30%	Rey et al., 2006
Corée du Sud	2000-2002	viande de bœuf	2%	Jo et al., 2004
Corée du Sud	2000-2002	viande de porc	2, 50%	Jo et al., 2004
Irlande	2003	Viande de bœuf	2, 40%	Carney et al., 2006
Irlande	2003	carcasse bovine	3%	Carney et al., 2006
Irlande	2003	tête de bœuf	3%	Carney et al., 2006
USA	2005	Viande hachée	1, 10%	Samadpour et al., 2006
Kenya	1999	lait de brebis	0, 30%	Arimi et al., 2005
Irlande	2004	cuir de bovin	7, 30%	O'Brien et al., 2005
Australie	2004	Carcasse bovine	6%	Fegan et al., 2005
Maroc	2003	Produits laitiers	9, 10%	Benkerroum et al., 2004
Maroc	2003	viande bovine	11, 10%	Benkerroum et al., 2004
USA	2003	carcasse bovine	1, 20%	Barkocy-Gallagher et al., 2003
Espagne	1995-1998	viande bovine	1%	Mora et al., 2007
Pays bas	1999	Viande hachée de bœuf	1%	Heuvelink et al., 1999
Royaume Uni	2000	viande bovine	1%	Chapman et al., 2000
Canada	1987	viande bovine	31%	Doyle et Schoeny, 1987
France	2001	Viande hachée de bœuf	0, 12%	Vernozy-Rozand et al., 2002
Ecosse	2001	viande bovine	0, 20%	Coia et al., 2001
Australie	2001	carcasse de mouton	0, 70%	Phillips et al., 2001
Australie	2001	viande de mouton	1, 30%	Phillips et al., 2001
Irlande	1997-1999	carcasse bovine	3, 20%	McEvoy et al., 2003

Tableau 5. Exemples de prévalences de STEC O157 au niveau de denrées alimentaires.

5.3.2. La transmission inter-humaine

La transmission interhumaine 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).

5.3.3. La transmission par contact direct avec les animaux

La transmission d'infections à *E. coli* O157 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leur déjections, a été décrite lors d'investigations de cas isolés (Heuvelink *et al.*, 2002) et lors d'épidémies (Crump *et al.*, 2002).

Durant l'été 2000, 56 personnes malades et 19 hospitalisées ont été contaminées après contact avec des animaux porteurs lors de sorties dans les fermes pédagogiques en Pensylvanie et à Washington. 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. Ils ont été à l'origine de nombreuses épidémies en Angleterre, au Canada, et aux Etats-Unis dans les années 1999 à 2000. Des guides et des recommandations ont été publiés pour prévenir les cas d'infections dans ces pays (CDC, 2001). Cependant des cas de portage sain ont été décrits chez des personnes en contact avec un réservoir animal excréteur de STEC. Une étude portant sur des familles vivant dans des fermes produisant du lait a montré que 6,3 % des membres des différentes familles excrétaient des STEC dans leurs matières fécales (Wilson *et al.*, 1996) et 12 % des personnes avaient des anticorps dirigés contre le LPS de *E. coli* O157. Aucune maladie ne s'est déclarée chez les résidents des différentes fermes, ce qui pourrait témoigner d'une protection induite par une immunité digestive.

5.3.4. Les autres modes de transmission

Des cas de contaminations de laboratoire ont été décrits dans la littérature (Burnens *et al.*, 1993). Actuellement, il est recommandé de manipuler les STEC O157 en laboratoire d'un niveau de sécurité suffisant (P3) afin d'éviter toute contamination du personnel ou de l'environnement.

5.4. Epidémiologie environnementale

5.4.1. Le portage par les animaux d'élevage

Le tractus digestif des ruminants et spécialement des bovins est un important réservoir des *E. coli* O157. Ils ont été également isolés chez les ovins, les caprins, les zébus, les daims, les porcins, les animaux de compagnie, les mouettes et les pigeons. D'autres sérotypes pathogènes pour l'homme tels O26:H11; O103:H2; O11:NM; O113:H21 ont été isolés des matières fécales d'ovins, de veaux et de bovins (Caprioli *et al.*, 2005).

Portage par les bovins

Depuis l'apparition des séries d'épidémies à STEC O157 impliquant le plus souvent l'espèce bovine et ses sous-produits, de nombreuses enquêtes ont été menées afin de définir si le portage par ces animaux pouvait être une source de contamination des aliments. L'éventail des aliments incriminés dans des cas d'épidémies est large, mais il semblerait que la principale origine soit la contamination par les matières fécales des bovins. C'est pourquoi la grande majorité des études effectuées concerne les ruminants, et notamment les bovins, considérés comme le réservoir principal de STEC (Whipp *et al.*, 1994; Hussein et Bollinger., 2005).

Chez le bovin adulte en bonne santé, plus de 200 sérotypes STEC en combinaison avec différents sérogroupes H ont été isolés. Plus d'une centaine ont été retrouvés chez l'homme. Un ou plusieurs types peuvent être retrouvés chez un même animal. Les STEC peuvent persister pendant plusieurs années dans le même troupeau ce qui prouve encore une fois le rôle important des bovins comme réservoirs des STEC. La prévalence des STEC chez les bovins varie en général de 0,1 à 63 % et de 0,3 à 87 % au niveau des troupeaux (Mainil et Daube, 2005).

Chez les bovins de boucherie, la prévalence semble être plus élevée chez les animaux qui vivent en pâturage. Ces derniers contaminés par les matières fécales favorisent la transmission des STEC à d'autres animaux et propagent les STEC au niveau de l'environnement. Une prévalence élevée est également observée chez les animaux nourris à base de céréales et chez ceux qui sont soumis à l'engraissement. Ces derniers hébergent une large variété de sérotypes avec une prédominance pour le sérotype O157. La prévalence varie de 0,3 à 19,7 % chez les bovins de boucherie à l'engraissement à 0,7 à 27,3 % chez les animaux mis en pâturage et à 0,3 à 6,9 % pour les bovins parqués dans des enclos. Les tests effectués au niveau des abattoirs chez les bovins ont montré un taux de prévalence des STEC O157 variant de 0,2 % à 27,8 % (Hussein et Bollinger, 2005).

La prévalence des STEC non O157 varie en général de 2,1 % à 70,1 %. Elle varie de 4,6 % à 55,9 % chez les animaux mis à l'engraissement et de 4,7 % à 44,8 % chez les bovins au pâturage. La prévalence des STEC non O157 chez les bovins de boucherie est élevée à tous les stades et dans tous les systèmes de production. Environ 250 sérotypes ont été isolés dont 42 sont potentiellement pathogènes pour l'homme (Hussein et Bollinger, 2005).

D'importantes variations (tableau 6) sont enregistrées au niveau des prévalences. Elles varient en fonction de l'âge, du sexe de l'animal, du stade de production, des saisons (plus élevée durant les mois chauds), de l'alimentation, de l'environnement et des différentes pratiques au niveau des systèmes de management des élevages (densité des animaux, type d'élevage).

Chez les vaches laitières, les prévalences des STEC O157 présentent aussi des variations importantes. Elles varient de 0,4 % à 48,8 % (Hussein et Bollinger, 2005). Elles sont de 0,5 % au Canada (Clarke *et al.*, 1994) à 16,1% au Royaume Uni (Chapman *et al.*, 1997). Ces dernières présentent un facteur de risque important pour la santé publique puisque la viande de ces animaux est souvent orientée vers la transformation en viande hachée.

En ce qui concerne la prévalence des STEC non O157, elle varie chez les bovins laitiers entre 0,4 % à 52 % chez les vaches, de 1,7 à 74 % chez les génisses et de 1,3 à 68,7 % chez les veaux (Hussein et Bollinger, 2005). Pour les STEC non O157, La prévalence semble être plus élevée chez les adultes que chez les plus jeunes animaux (Garber *et al.*, 1999).

Le portage des STEC O157 par les bovins est le plus important durant les mois chauds (juin à octobre) et inversement, le moins élevé en hiver (novembre et décembre).

Conditions de survie des STEC dans les matières fécales de bovins.

L'excrétion des STEC par les bovins est intermittent, il fluctue en fonction de la durée de l'engraissement et en fonction des saisons (Hussein et Bollinger, 2005) (tableaux 5 et 6).

Le nombre de STEC O157 est de l'ordre de 10^2 à 10^5 ufc par gramme de matières fécales (Caprioli *et al.*, 2005). Dans une étude au Japon, il a été de l'ordre de 10^4 ufc/g et a persisté chez un animal pendant 10 semaines pour les STEC O157 et de 10^2 ufc/g pendant trois semaines pour le sérototype O26. Les souches isolées des fèces de bovins après plusieurs jours de stockage peuvent conserver leur capacité de virulence et produire leurs toxines Stx1 et Stx2 après 49 jours à 37°C, 56 jours à 22°C et 70 jours à +5°C (Wang *et al.*, 1996).

Influence des conditions d'élevage sur la survie et la résistance des STEC

Des *E. coli* présents à une dose de l'ordre de $9 \cdot 10^8$ ufc/g dans un mélange “ sédiments et féces ” ont survécu pendant au moins 245 jours dans un réservoir d'eau d'abreuvement pour animaux (Hancock *et al.*, 2001; Lejeune *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré que les souches d'*E. coli* ayant pu survivre pendant ces mois étaient toujours infectieuses pour des veaux âgés de 10 semaines qui, par la suite, excrétaient eux mêmes des *E. coli* O157. Les souches qui ont été isolées et caractérisées chez ces animaux pendant au moins 8 mois sont identiques à la souche initiale.

L'eau des abreuvoirs contaminée par un animal excréteur représente donc une source de contamination et de transmission de ces germes d'un animal à un autre.

Le type de régime alimentaire auquel sont soumis les animaux peut influencer la survie et la persistance des STEC. On note une plus grande résistance chez les animaux nourris aux céréales par opposition à ceux qui ont une alimentation fourragère. En Suède, d'autres études ont montré que les animaux qui étaient gardés à l'étable pendant l'été, consommant un aliment concentré à base de céréales continuaient à excréter la bactérie contrairement à ceux qui avaient été mis au pré et qui consommaient de l'herbe. L'alimentation à base de céréales, entraînant une acidification du contenu digestif pourrait favoriser l'excrétion d'*E. coli* O157:H7. Cependant, d'autres auteurs ne montrent pas dans leurs résultats des différences d'excrétion entre les bovins nourris avec du foin ou avec des céréales. La contamination de l'herbe par des féces d'animaux couplée à de mauvaises conditions d'ensilage peut favoriser la persistance et le développement des STEC O157 chez les ruminants (AFSSA, 2003)

Pays	Année	Prévalence en %	Référence
<i>Australie</i>	2002	0, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Kansas)</i>	2000	0, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA(Washington)</i>	1994	0, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada</i>	1994	0, 4	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Washington)</i>	1994	0 , 7	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Kansas et Nebraska)</i>	1999-2000	0, 9	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Nevada)</i>	1999	1, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Nevada)</i>	1999-2000	1, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada et MWUSA*</i>	1997	1, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Brésil</i>	1996 -1997	1, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Dakota)</i>	2003	1, 4	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada et MWUSA</i>	1996	1, 5	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Corée</i>	2000-2002	1, 7	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Japon</i>	1992-1994	1, 8	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Idaho, Washington, Oregon)</i>	1997	3, 6	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Japon</i>	1998-1999	4	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Turquie</i>	2000-2001	4, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>MWUSA*</i>	2001-2002	5, 9	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada et MWUSA</i>	1996	6	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Argentine</i>	2000	6, 8	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Dakota du Nord)</i>	2003	6, 9	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA (Kansas)</i>	1997	6, 9	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA</i>	2005	11, 4	Keen et al., 2006
<i>USA</i>	2005	11, 7	Calleway et al., 2006
<i>Canada et MWUSA*</i>	1996	13, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA</i>	2000	13, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada et MWUSA*</i>	1997	14, 1	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada et MWUSA</i>	1996	15, 8	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada et MWUSA</i>	1997	18, 7	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Japon</i>	1997-1998	27, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Canada et, MWUSA</i>	1997	27, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA</i>	1999	27, 8	Hussein et Bollinger, 2005
<i>USA</i>	2005	28	Sanderson et al., 2006

: MWUSA : Midwestern USA

Tableau 6. Prévalence des STEC O157 dans les matières fécales de bovins hors Europe

Pays	Année	Prévalence en %	Référence
<i>Allemagne</i>	2003	17, 3	Trends and Sources
<i>Allemagne</i>	2004	13, 6	Trends and Sources
<i>Belgique</i>	1998-1999	6, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Belgique</i>	2004	3, 4	Trends and Sources
<i>Danemark</i>	2000	2, 8	Trends and Sources
<i>Danemark</i>	2001	3, 2	Trends and Sources
<i>Danemark</i>	2002	5, 5	Trends and Sources
<i>Danemark</i>	2003	7, 1	Trends and Sources
<i>Danemark</i>	2004	8, 4	Trends and Sources
<i>Ecosse</i>	2002	7, 5	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Finlande</i>	1997	1, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Finlande</i>	2000	13, 2	Trends and Sources
<i>Finlande</i>	2001	2, 7	Trends and Sources
<i>Finlande</i>	2002	0, 1	Trends and Sources
<i>Finlande</i>	2004	1, 2	Trends and Sources
<i>Irland</i>	1998-1999	2, 4	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Italie</i>	1995	3, 6	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Italie</i>	2004	1	Trends and Sources
<i>Norvège</i>	1991-1995	4, 6	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Norvège</i>	1998 -1999	0, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Norvège</i>	2003	0, 2	Trends and Sources
<i>Pays-bas</i>	1995-1996	6, 3	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Pays-bas</i>	2000	12, 4	Trends and Sources
		(troupeaux)	
<i>Pays-bas</i>	2001	10, 7	Trends and sources
<i>Pays-bas</i>	2004	8, 5	Trends and sources
<i>Pologne</i>	1999	0, 7	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Royaume Uni</i>	1987	1	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Royaume Uni</i>	1994 -1995	1, 2	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Royaume Uni</i>	1997-1998	12, 9	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Royaume Uni</i>	1998-1999	17	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Royaume Uni</i>	1999-2000	4, 7	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Royaume Uni</i>	2003	4, 7	Trends and Sources
<i>Suède</i>	2001	0, 3 à 1, 7	Trends and Sources
<i>Suisse</i>	2002 -2003	1, 6	Hussein et Bollinger, 2005
<i>Tchéquie</i>	1997-1998	19, 7	Hussein et Bollinger, 2005

Tableau 7. Prévalences des STEC O157 dans les matières fécales de bovins en Europe

5.4.2. Le portage par d'autres espèces de ruminants

Le portage fécal de STEC chez les moutons et les chèvres, a fait l'objet de nombreux travaux. Des chiffres élevés de contamination ont été rapportés par différents auteurs, entre 63 % et 66,6 % chez les moutons et entre 45 % et 56,1 % chez les chèvres (Beutin *et al.*, 1993 ; Randall *et al.*, 1997). D'une manière générale, les sérotype O157:H7 a rarement été détecté lors de ces études (Zhang *et al.*, 2002a). Les sérotypes les plus fréquemment isolés sont les sérotypes : O91:NM, O128:H2 et O146:H21 (Koch *et al.*, 2001)

En 2001, une étude portant ainsi sur 1.623 fèces d'ovins, a révélé la présence de STEC chez 85 % des agneaux et 95 % des moutons testés (Djordjevic *et al.*, 2001). Parmi les souches isolées, 47,5 % des STEC possédaient les gènes *stx1*, *stx2* et *ehxA*.

Les ovins australiens semblent être porteurs de souches STEC possédant le variant *stx2d* (Ramachandran *et al.*, 2001).

Le buffle, les ruminants sauvages, les daims et autres gibiers sont également de potentiels réservoirs pour ce groupe de pathogènes. Le portage des STEC par ces animaux sauvages favorise la propagation et la dissémination de ces germes dans l'environnement.

5.4.3. Le portage des STEC par des animaux de compagnie.

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

5.4.4. Le portage chez les oiseaux

Enfin, il existe très peu d'études permettant de préciser la prévalence des STEC dans les élevages de volailles. Le portage est probablement fécal, le taux de contamination des fèces varie de 0 % en Allemagne (Beutin *et al.*, 1993) à 9,6 % en Slovaquie (Pilipcinec *et al.*, 1999). Cette dernière étude a révélé la présence d'*E. coli* O157:H7 producteurs de toxines Stx1 et Stx2. Ces pathogènes ont été isolés dans les sous-produits de volailles et dans le contenu intestinal des dindes.

D'autres études expérimentales ont montré que les STEC colonisent parfaitement le cæcum de poussins pendant de longues périodes (Beery *et al.*, 1985; Caprioli *et al.*, 2005).

Le pigeon semble être un réservoir de souches STEC possédant le variant *stx2f* (Morabito *et al.*, 2001).

5.4.5. L'environnement

L'environnement peut devenir une véritable niche écologique pour les STEC qui ont la capacité de résister dans le fumier. En 1992, dans le Maine, aux Etats-Unis, une infection par *E. coli* O157:H7 a été décrite chez un patient qui avait consommé les produits de son jardin fertilisé avec du fumier de bovins présentant une sérologie positive pour *E. coli* O157. D'autres cas similaires d'infections ont été décrits à partir de pommes de terre fertilisée à partir de fumier de bovins (AFSSA,2003).

Au niveau du sol, des facteurs tels que la température, le degré d'humidité, la flore de compétition ou le ratio sol/fumure semblent jouer un rôle dans la survie d'*E. coli* O157:H7. La population STEC O157 a persisté pendant 231 jours à 21°C à humidité constante après une contamination artificielle du sol. Les STEC persistent plus longtemps lorsque le ratio fumure/sol est de 1/25 à 1/100 que lorsqu'il est de 1/10. La présence d'une flore compétitive réduirait le nombre de ces pathogènes présents sur le sol.

La nature ou le type de sol aurait une influence sur la survie de ces pathogènes. Elle est beaucoup plus longue pour les sols argileux et de terreau que pour les sols sablonneux.

La bactérie peut encore être isolée après 25 et 41 jours après son dépôt sur un sol en jachère, mais jusqu'à 92 et 96 jours après son dépôt sur un sol après fauchage d'une récolte de luzerne ou de seigle.

E. coli O157:H7 est très résistant dans l'environnement. Un délai de 3 semaines entre la présence d'animaux d'élevage sur un terrain et son usage pour diverses activités de loisir semble insuffisant pour éviter le risque de contamination des humains par des souches de *E. coli* O157:H7 (Brown *et al.*, 2002).

L'eau de ruissellement, le niveau de précipitations des pluies et les eaux usées contaminées augmentent le risque de pollution de l'eau au niveau des sols et de l'environnement. Les boues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines ayant subi des traitements (chaulage, séchage en lit ou en silo, compostage) réduiraient l'introduction de STEC dans l'environnement (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002b).

6. L'EVALUATION DU RISQUE LIE AUX STEC O157

En plus de l'application des nouveaux standards en matière de méthodes d'analyses et de critères microbiologiques pour les STEC O157:H7 dans la viande hachée, les services d'inspection du ministère de l'Agriculture en Amérique (FSIS) ont annoncé en 1998, la mise en place de plans d'évaluation des risques microbiologiques sur toute la chaîne alimentaire de l'étable à la table.

La méthodologie d'évaluation quantitative du risque microbiologique comme outil d'évaluation des risques liés aux denrées alimentaires est à l'heure actuelle en plein développement. L'évaluation du risque est une technique qui est utilisée pour estimer la probabilité d'occurrence d'un danger et la sévérité de l'effet adverse. L'ensemble est fondé sur une base de données scientifiques collectées à tous les niveaux du processus de la production à la consommation du produit. A partir d'une modélisation mathématique, elle définit le ou les paramètre(s) et le ou les niveau(x) d'interventions que l'on pourra moduler pour minimiser ou réduire le risque auquel est soumis le consommateur.

L'architecture de base pour mener une analyse du risque microbiologique lié à *E. coli* O157 correspond à celle définie par le Codex Alimentarius (FAO, Commission du Codex Alimentarius, 1995). Elle comprend quatre étapes à savoir (i) l'identification des dangers, (ii) l'évaluation de l'exposition, (iii) la caractérisation du danger et (iv) la caractérisation du risque

6.1. L'identification des dangers

L'identification du danger consiste en l'identification d'un agent biologique (micro-organismes ou toxines), chimique ou physique présent dans un aliment ou dans un groupe d'aliments causant un effet adverse sur la santé humaine. STEC O157 est définitivement considéré comme un agent responsable d'infections gastro-intestinales parfois fatales chez les personnes sensibles. L'incidence croissante du nombre de cas et d'épidémies enregistrées et déclarées depuis 1982 ainsi que la sévérité des formes compliquées de la maladie justifient pleinement l'intérêt accordé à ce pathogène. La maladie est devenue à déclaration obligatoire dans de nombreux pays, aux Etats-Unis depuis 1994, en Suède, en Allemagne et au Danemark depuis 1998. Des plans de surveillance au niveau des denrées alimentaires considérées à risque sont mis en place dans le monde.

La viande hachée, l'eau de boisson, les produits laitiers et autres aliments contaminés sont les principales sources de contamination pour l'homme. La transmission inter-humaine notamment dans les nurseries et les collectivités agrave l'étendue, la propagation et la gravité des cas.

La population composée d'enfants de moins de 5 ans et de personnes âgées est la plus sensible aux formes graves des infections à EHEC O157.

STEC O157 possède la faculté de persister et de résister à différents paramètres physico-chimiques (Aw, pH, température) ce qui lui permet de survivre et de s'exprimer dans différents écosystèmes (aliment, environnement, animal, sol) lorsque les conditions lui sont optimales.

6.2. L'évaluation de l'exposition.

L'évaluation de l'exposition est une évaluation qualitative et/ou quantitative de la présence d'agents biologiques, chimiques et physiques dans un aliment qui correspond à l'exposition du consommateur. Cette étape doit décrire les différentes possibilités par lesquelles un agent pathogène entre dans la chaîne alimentaire au niveau de la production, de la distribution jusqu'à la consommation. En ce qui concerne les STEC O157, plusieurs modèles d'évaluation quantitative du risque ont été développés notamment en ce qui concerne la production de viande hachée de bœuf considérée comme un des plus importants facteurs de risque pour STEC O157 (Duffy *et al.*, 2006). Les modèles décrivent le comportement de l'agent pathogène à travers toute la chaîne de la production jusqu'à la consommation pour estimer le niveau d'exposition. Les effets de chaque étape sur la croissance du microorganisme sont prises en compte pour quantifier deux paramètres importants : La prévalence des troupeaux et des animaux infectés ainsi que la concentration du pathogène sur toute la filière de production jusqu'au consommateur. Tous les facteurs augmentant ou réduisant le nombre de microorganismes sont analysés (type d'animaux, influence des saisons, contamination des animaux par le cuir au cours du transport, facteurs de contamination des carcasses, du conditionnement et de la température de stockage des viandes). Lorsque les informations à un niveau donné sont manquantes ou insuffisantes, des modèles de microbiologie prédictive ont été utilisés pour simuler la croissance ou la survie de STEC O157:H7 dans des conditions les plus proches de la réalité. Ces modèles simulent la croissance et le déclin d'*E. coli* en fonction des différents paramètres environnementaux (température, pH, Activité hydrique). La simulation de Monte Carlo a permis de générer la distribution la plus représentative du risque. Des informations sur les habitudes alimentaires, la nature et le type de population sont aussi nécessaires pour caractériser l'exposition.

6.3. La caractérisation du danger

La caractérisation du danger est une évaluation qualitative et ou quantitative de la nature de l'effet adverse en relation avec l'agent pathogène présent dans l'aliment. Cette étape caractérise la nature, la sévérité et la durée du danger. Elle doit être détaillée et toutes les variables bien documentées. La sévérité de la maladie est liée à l'interaction de trois facteurs : l'hôte, l'aliment et l'agent pathogène.

Lorsque toutes les données sont disponibles, une évaluation dose-réponse peut être menée.

L'objectif du modèle dose-réponse est de déterminer la relation entre la magnitude de l'exposition (dose) au pathogène et la sévérité de la réponse. Il y a quatre réponses possibles à considérer : la probabilité de l'infection (après ingestion), la probabilité de la maladie (morbilité), la probabilité des séquelles et la probabilité de la mortalité.

La réponse est le résultat de l’interaction de différents paramètres : le microorganisme, la voie de contamination, la dose ingérée, le type de population exposée, sa sensibilité, la réponse de l’hôte, la durée et la multiplicité de l’exposition. L’ensemble des données épidémiologiques, expérimentales et leurs effets respectifs sont introduits dans des modèles mathématiques pour estimer la probabilité de l’apparition de l’infection ou de la maladie suite à l’ingestion d’une dose d’un agent pathogène. Dans ce contexte, les modèles mathématiques utilisés sont nombreux. Le modèle dose-réponse peut être une simple relation exponentielle de type Béta-Poisson. Cette relation considère qu’en dessous d’une certaine dose (seuil), aucune réponse ne sera observée et que la probabilité de survie et de croissance d’un seul microorganisme est la même quelque soit la dose et l’agent pathogène et les caractéristiques de l’hôte. Cette relation définit un risque moyen pour la population.

D’autres études ont introduit dans leurs modèles dose-réponse toutes les variables liées aux interactions entre le pathogène et l’hôte. Le modèle décrit par Cassin et collaborateurs (1998) considère que la probabilité d’être malade varie avec la dose ingérée et propose un modèle de bêta-binomial modifié. Powell et collaborateurs (2000) proposent une démarche différente. Ils décrivent la loi dose-réponse pour STEC O157:H7 non par une courbe unique mais par une série de courbes. Cette série est définie d’un côté par un modèle *Béta-Poisson* ajusté sur des données humaines associées à des *Shigella* et de l’autre côté avec un modèle *Béta-Poisson* ajusté sur des données humaines avec des EPEC. La relation dose réponse de STEC O157:H7 doit se situer entre les deux relations dose-réponse. Ces auteurs considèrent qu’étant donné le manque de données relatives à STEC O157, il est plus raisonnable de considérer cette série de courbes que de considérer une courbe dose-réponse unique grossièrement validée par des données épidémiologiques insuffisantes.

6.4. La caractérisation du risque

La caractérisation du risque est le résultat des trois premières étapes. C’est l’étape finale de l’évaluation du risque. Toutes les variables auront été analysées pour estimer la sévérité de l’infection pour une population donnée. La réponse peut être qualitative (faible, moyenne, élevée) ou quantitative permettant une estimation du nombre de personnes atteintes.

Au niveau quantitatif, les modèles intègrent deux notions celle de l’incertitude lorsque les données sont manquantes et celle de la variabilité quand les données ne sont pas constantes.

Toutes les valeurs sont intégrées et analysées grâce à des simulations de Monte Carlo. Cette méthode permet d’obtenir à différents points, une estimation complète des différentes possibilités du risque. Le moindre changement à un niveau donné nécessitera une réévaluation du risque.

En Belgique, une étude portant sur l'évaluation du risque STEC O157 dans la viande hachée de bœuf (filet américain) produite en Belgique, a identifié des points faibles pour lesquels certaines informations étaient manquantes et des points sensibles de contrôle au niveau des étapes de production dont la maîtrise permet de réduire le risque à son minimum. L'étude a montré une insuffisance de données concernant la prévalence de STEC O157 à l'échelle des troupeaux, des animaux, de leur concentration au niveau des matières fécales des animaux et du niveau de contamination au niveau des carcasses à l'abattoir. De même, l'influence des processus de refroidissement, de préparation et de stockage sur la survie ou la multiplication de l'agent pathogène dans le filet américain n'avait pas été déterminée. En 1998, sur une population belge de plus de 10 millions d'individus, 250 à 500 cas d'infections intestinales (diarrhées) chez les enfants de moins de 5 ans ainsi que 42 cas de SHU dont 25 chez les enfants de moins de 5 ans et 2 cas chez les personnes âgées de plus de 65 ans ont été prédis. Le pourcentage de mortalité par an observé était 1 cas pour chacune des populations les plus à risque alors qu'en théorie, la mortalité est de 5 % des cas de SHU chez les enfants de moins de 5 ans et 12 % chez les plus de 65 ans (Daube et al., 1998).

D'autres études d'évaluation du risque lié aux STEC O157 dans les viandes hachées de bœuf ont été réalisées. Ces études ont montré pour la majorité d'entre-elles que certaines variables comme la concentration de STEC O157 dans les matières fécales des animaux destinés à l'abattoir et sur les carcasses suite à l'abattage ainsi que les températures de stockage et de cuisson sont les points essentiels sur lesquels des actions devraient être menées pour diminuer le risque. De même, les données qui sont introduites dans le modèle dose réponse jouent un rôle important dans le résultat final et la probabilité d'être malade. Le modèle bêta-binomial basé sur les données de *Shigella* développé par Cassin et collaborateurs (1998) ainsi que le modèle exponentiel décrit par Nauta et al (1999) semblent surestimer la probabilité du risque. Les estimations sont plus faibles lorsque le modèle Bêta-Poisson développé par Powel et al (2000) est utilisé. Ainsi, les auteurs s'accordent pour conclure à ce sujet qu'il est nécessaire de développer et valider les modèles mathématiques à partir de données épidémiologiques complètes et clairement documentées (Duffy et al., 2006).

7. EVOLUTION DE LA REGLEMENTATION EUROPEENNE EN MATIERE DE SECURITE DES ALIMENTS

La directive 92/117/CE (Anonyme, 1992) concerne les mesures de protection contre certaines zoonoses et certains agents zoonotiques chez les animaux et dans les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infection et d'intoxication dus à des denrées alimentaires. Elle stipule, qu'il est nécessaire de prévenir et de réduire par des mesures de contrôle appropriées l'apparition, par le biais d'aliments d'origine animale, de zoonoses menaçant en particulier la santé humaine. `

Il faut aussi asseoir des procédures et structures pour la collecte des données épidémiologiques et des informations sur l'incidence des zoonoses au sein de la population humaine, chez les animaux domestiques, dans les aliments des animaux et au sein de la faune sauvage et de combiner les données de la chaîne alimentaire avec les données chez l'homme.

Chaque Etat-membre veille à ce que les mesures prises conformément à la directive par l'autorité compétente soient coordonnées à l'échelon national et local, en particulier pour ce qui est des enquêtes épidémiologiques. Les autorités compétentes sont assistées par les laboratoires nationaux de référence agréés pour les zoonoses et les agents zoonotiques.

Les Etats-membres veillent à ce que les exploitants ou gestionnaires agréés conservent pendant une période minimale, à déterminer par l'autorité compétente et communiquent à celle-ci, les résultats des examens concernant le recherche de zoonoses, l'isolement et l'identification d'agents zoonotiques ou l'établissement de toute autre preuve de leur présence. Cet aspect incombe au responsable du laboratoire ou, lorsque l'identification est effectuée ailleurs que dans un laboratoire, à la personne responsable de l'examen. Le diagnostic et l'identification d'un agent zoonotique doivent être notifiés à l'autorité compétente. Celle ci collecte des informations sur les agents zoonotiques dont la présence a été confirmée lors de tests ou examens effectués ainsi que sur les cas cliniques concernant les zoonoses chez l'homme ou les animaux

Une information régulière des autres Etats-membres sur les cas cliniques constatés doit avoir lieu au sein du comité vétérinaire permanent.

La Commission européenne suit l'évolution de la situation concernant les zoonoses dans la communauté, en se fondant notamment sur les informations collectées. Elle mène à bien des études spécifiques pour l'évaluation des risques créés par les agents zoonotiques, les procédures de diagnostic et les mesures de contrôle, en collaboration avec les laboratoires nationaux compétents, les laboratoires communautaires de référence et le comité scientifique vétérinaire. Elle détermine les méthodes de collecte des échantillons et d'examens dans les laboratoires nationaux agréés, définit les orientations pour les mesures concernant la lutte contre les zoonoses.

La directive prévoit également la possibilité de contrôle par les experts de la Commission pour vérifier si les Etats-membres assurent le respect des dispositions de la directive. La commission informe l'autorité compétente du résultat des contrôles effectués qui prend les mesures nécessaires.

La directive 92/117/CE (Anonyme, 1992) (modifiée par les directives (97/22/CE et 99/72/CE) en vigueur jusqu'en 2004, a permis d'asseoir les structures et les procédures nécessaires à son application dans les Etats-membres. Néanmoins les données rassemblées étaient difficilement exploitables du fait de la non participation de quelques états qui ne rapportent pas leurs données, du manque d'harmonisation dans leur collecte malgré les efforts d'élaboration de guides. Il a été constaté également une insuffisance dans l'interprétation statistique des données, l'absence de données quantitatives, une insuffisance ou une estimation erronée du nombre de cas chez l'homme et l'absence de cohésion entre les données humaines, celles de la santé animale et de la sécurité alimentaire.

De ce fait, une révision en profondeur de la législation européenne a été menée afin de collecter des données plus pertinentes sur les agents zoonotiques, de diminuer l'incidence des toxi-infections alimentaires et des agents zoonotiques et de contrôler les zoonoses au niveau de la production primaire.

La nouvelle législation vise à mettre en œuvre une politique harmonisée pour assurer la sécurité sanitaire de l'alimentation humaine et animale à savoir :

1. Assurer un niveau élevé de protection de la santé du consommateur en tenant compte de la santé et du bien être des animaux, de la santé des plantes et de l'environnement
2. Garantir la sécurité sanitaire des aliments
3. Harmoniser les systèmes de surveillance et de contrôle dans l'Union européenne et les pays tiers
4. Permettre la libre circulation des produits : des denrées alimentaires qu'elles proviennent de végétaux ou d'animaux, ainsi que des aliments pour animaux.

A la fin de l'année 2003, le Parlement européen et le Conseil ont adopté un ensemble de textes concernant les zoonoses et comprenant une directive et un règlement :

- La directive 2003/99/CE (Anonyme, 2003b) sur la surveillance des zoonoses et agents zoonotiques modifiant la décision 90/424/CEE du conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du conseil.
- Le règlement (CE) N°2160/2003 (Règlement CE, 2003) sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire.

Le but de la directive est d'assurer que les zoonoses, les agents zoonotiques et les résistances antimicrobiennes liées soient convenablement gérés, et que les crises de la chaîne alimentaire reçoivent une investigation épidémiologique convenable, pour permettre la collecte au sein de la Communauté d'informations nécessaires pour évaluer les tendances et les sources : Analyse du risque, surveillance dans les aliments, au niveau des animaux, et investigation au niveau des épidémies sur la base de systèmes nationaux de surveillance.

Les principaux objectifs sont:

- Collecter des données comparables pour évaluer et gérer le risque.
- Surveiller la chaîne alimentaire et collecter les données humaines à travers une coopération entre les différents secteurs de la santé animale et de la santé publique.
- Collecter les données et les rapporter à la Commission. La Commission fait suivre ces rapports à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) sous un canevas (format) approprié qui examine et publie une synthèse des documents à la fin de novembre de chaque année.

Le but de la réglementation est d'assurer que des mesures propres et efficaces soient prises pour détecter et contrôler les agents zoonotiques à toutes les étapes appropriées de la production, du traitement et de la distribution, particulièrement au niveau primaire de production, incluant les aliments, afin de réduire leur fréquence et le risque qu'ils posent pour la santé publique (management du risque; communauté cible, programmes de contrôle, méthodes de contrôle, règlements nécessaires).

La nouvelle réglementation sur les zoonoses révise et remplace la directive 92/117/CE (Anonyme, 1992) avec mise en application à partir du 12 juin 2004. La directive 2003/99/CE cite les principaux agents zoonotiques qui doivent obligatoirement être surveillés au sein de l'UE. Les STEC en font partie.

Un ensemble complémentaire de textes à savoir les règlements relatifs à l'hygiène, le règlement concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires et les règlements relatifs aux contrôles officiels applicables aux aliments pour animaux et aux denrées alimentaires visent à renforcer et à harmoniser l'action de l'Union européenne dans le domaine de la sécurité des aliments. Ces réglementations sont basées sur les textes suivants:

1. Règlement (CE) N°178/2002 sur la législation alimentaire européenne
2. Règlement (CE) N°852/2004(a) (relatif à l'hygiène des denrées alimentaires complété par le règlement (CE) N°2073/2005 relatif aux critères microbiologiques
3. Règlement (CE) N°853/2004(b) qui fixe les règles spécifiques relatives aux denrées alimentaires d'origine animale
4. Règlement (CE) N°882/2004© relatif aux contrôles officiels des denrées alimentaires
5. Règlement (CE) N°854/2004 relatif aux règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels des denrées alimentaires d'origine animale

Le règlement (CE) N°178/2002 du 28 janvier 2002, établit la législation alimentaire européenne, institue l'EFSA comme l'autorité européenne de sécurité des aliments, fixe les procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires, de façon harmonisée en Europe au travers de grands principes, définit les obligations d'hygiène pour tous les professionnels de la chaîne alimentaire « de la fourche à la fourchette » de la production primaire à la transformation jusqu'à la distribution de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux.

Les principes reposent sur :

- L'information à travers l'étiquetage des denrées alimentaires,
- Le principe de précaution et garantie d'un niveau élevé de protection de la santé humaine et animale,
- La création d'une procédure de retrait/rappel de produits.
- Le principe de transparence et de responsabilité de l'exploitant ainsi qu'un renforcement des contrôles par les autorités compétentes.

Ces principes sont applicables à travers un système de management du risque avec obligation de traçabilité en amont/aval des aliments pour tous les établissements alimentaires.

Le Règlement (CE) N°852/2004 (CE, 2004a) établit les règles générales d'hygiène applicable à partir du 1^{er} janvier 2006 et remplace la directive 93/43/CE relative à l'hygiène des denrées alimentaires (mise en œuvre obligatoire des démarches HACCP) en renforçant ses grandes lignes directrices. Il encourage l'application de bonnes pratiques d'hygiène pour tous les acteurs de la filière alimentaire (y compris production primaire). Il invite les acteurs de la filière alimentaire à élaborer et diffuser des guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP au travers de l'Europe.

Le règlement (CE) N°2073/2005 (CE, 2005) concerne les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

Un critère microbiologique définit l'acceptabilité d'un produit, d'un lot de denrées alimentaires ou d'un procédé, sur la base de l'absence, de la présence ou du nombre de micro-organismes, et/ou de la quantité de leurs toxines/métabolites, par unité de masse, de volume, surface ou lot.

Ce règlement a fixé les critères d'hygiène du processus qui sont autant de signaux d'alerte qui permettent de détecter une perte de maîtrise des risques biologiques. Les mesures en cas de dépassement de ces critères sont variables mais nécessitent, un examen voire une modification des mesures de maîtrise. Ce règlement fixe les seuils les plus importants pour préserver la santé publique au sein de l'UE. La philosophie générale est que c'est à l'industriel de prouver qu'il gère bien la qualité (Daube, 2006).

Il est à noter qu'aucun critère n'est prévu pour les STEC. Au niveau des carcasses de bovins, de porcins, d'ovins, de caprins et d'équidés, des critères concernent uniquement le nombre de colonies aérobies et le nombre d'entérobactéries ainsi que l'absence de Salmonelles. Pour la viande hachée et la viande séparée mécaniquement, les critères concernent le nombre de colonies aérobies et le nombre d'*E. coli*.

Le règlement (CE) N°853/2004 (CE, 2004b) établit les règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale dans tous les secteurs.

Les règlements (CE) N°882/2004 et (CE) N°854/2004 (CE, 2004c et d) fixent les règles spécifiques pour l'organisation des contrôles officiels concernant les denrées alimentaires et les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

Aucun de ces textes n'aborde spécifiquement les STEC mais ce sont eux qui définissent les règles qui devraient permettre leur maîtrise et la vérification de celles-ci.

OBJECTIFS

Au début de cette étude, la situation en termes de contamination des denrées alimentaires d'origine animale (DAOA) par les STEC en général et par les STEC O157 en particulier était en grande partie inconnue en Belgique.

Le premier objectif était donc d'approcher le plus précisément possible la situation en Belgique dans les principales filières de production de DAOA. Pour atteindre cet objectif, les études suivantes ont été entreprises :

- Une étude préliminaire de la contamination par les STEC O157 des carcasses de bœuf et de porc (étude I).
- Une étude visant à la détermination du taux de contamination des viandes hachées de bœuf par les STEC dont ceux de sérotype O157 (étude II).
- Des études extensives basées sur des plans annuels de surveillance couvant toute la production nationale visant à établir le taux de prévalence et l'évolution temporelle de la contamination par les STEC O157 dans les principales DAOA (denrées alimentaires d'origine animale) mais surtout dans la filière de la viande de bœuf. Les plans de recherche de ces pathogènes ont été couplés à la détermination du nombre d'*E. coli* totaux. Ce paramètre permet de juger du niveau de maîtrise de la contamination fécale dans les établissements afin d'apporter des éléments quantitatifs pour une évaluation du risque lié aux STEC (étude III).

Le second objectif visait à déterminer le taux de contamination par les STEC et les STEC O157 dans deux abattoirs algériens, l'un de bœuf (étude IV), l'autre de moutons (étude V) afin de savoir si ces pathogènes posaient des problèmes de santé publique en Algérie. Comme en Belgique, le niveau de contamination fécale a été étudié afin de juger de la maîtrise de l'hygiène de l'abattage.

Au cours de ces études, les méthodes de recherche des STEC O157 par culture ont dû être optimisées et des méthodes moléculaires de typage ont été développées afin d'obtenir une confirmation rapide du potentiel de virulence des souches.