

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE INTER - ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES (E.I.S.M.V.)



ANNEE 2012

N° 39

Prévalence des souches d'*Escherichia coli*
porteuses de gènes de virulence associés aux *Escherichia coli*
entérohémorragiques (EHEC) et/ou résistantes aux
antibiotiques dans les
effluents de la station d'épuration de Cambérène et des
abattoirs de Dakar.

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 08 Décembre 2012 à 10 heures devant la
Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar pour obtenir
le Grade de:

DOCTEUR EN MEDECINE VETERINAIRE (DIPLOME D'ETAT)

Par

Mohamed Moustapha SARR

Née le 11 /12/1985 à Ziguinchor

Jury

Président :

M. Moussa Fafa CISSE

Professeur à la faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'Odonto-Stomatologie UCAD

**Directrice et rapporteur de
thèse :**

Mme Rianatou BADA ALAMBEDJI

Professeur à l'EISMV de Dakar

Membre :

M. Malang SEYDI

Professeur à l'EISMV de Dakar

Co-directeur:

Dr. Alpha Amadou DIALLO

Ingénieur d'Etudes à l'ISRA



ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES DE DAKAR

BP 5077-DAKAR (Sénégal)

Tel. (221) 33 865 10 08- Télécopie : (221) 33 825 42

COMITE DE DIRECTION

LE DIRECTEUR GENERAL

- **Professeur Louis Joseph PANGUI**

LES COORDONNATEURS

- **Professeur Germain Jérôme SAWADOGO**
Coordonnateur des Stages et de la Formation Post
– Universitaires

Coordonnateur des Etudes

- **Professeur Moussa ASSANE**

Coordonnateur de la Coopération Internationale

- **Professeur YalacéYamba KABORET**

- **Professeur Serge Niangoran BAKOU**
Coordonnateur Recherche / Développement

Année Universitaire 2011-2012

PERSONNEL ENSEIGNANT

- ☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT E.I.S.M.V**
- ☞ **PERSONNEL VACATAIRE (PREVU)**
- ☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV**

A. DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES
ET PRODUCTIONS ANIMALES

CHEF DE DEPARTEMENT : Ayao MISSOHOU, Professeur

SERVICES

1. ANATOMIE-HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE

Serge Niangoran BAKOU	Maître de conférences agrégé
Gualbert Simon NTEME ELLA	Assistant
M. Jean Narcisse KOUAKOU	Moniteur
M.Mahamadou CHAIBOU	Moniteur

2. CHIRURGIE –REPRODUCTION

Papa El Hassane DIOP	Professeur
Alain Richi KAMGA WALADJO	Maître - Assistant
M. Abdoulaye DIEYE	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mlle Rosine MANISHIMWE	Monitrice

3. ECONOMIE RURALE ET GESTION

Cheikh LY	Professeur (en disponibilité)
M. Walter OSSEBI	Docteur Vétérinaire Vacataire

4. PHYSIOLOGIE-PHARMACODYNAMIE-THERAPEUTIQUE

Moussa ASSANE	Professeur
Rock Allister LAPO	Maître – Assistant
M.Kader ISSOUFOU	Moniteur

5. PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur
Adama SOW	Assistant
Mr Kalandi MIGUIRI	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mlle Clarisse UMUTONI	Monitrice

6. ZOOTECHNIE-ALIMENTATION

Ayao MISSOHOU	Professeur
Simplex AYSSIWEDE	Assistant
M. Célestin MUNYANEZA	Moniteur
M. Fidèle ATAKOUN	Moniteur

B. DEPARTEMENT DE SANTE PUBLIQUE ET ENVIRONNEMENT

CHEF DE DEPARTEMENT : Rianatou BADA ALAMBEDJI, Professeur

SERVICES

1. HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (HIDAOA)a

Serigne Khalifa Babacar SYLLA	Maître - Assistant
Bellancille MUSABYEMARIYA	Assistante
M. Luc LOUBAMBA	Docteur vétérinaire vacataire
M. Than Privat DOUA	Moniteur

2. MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Rianatou BADA ALAMBEDJI	Professeur
Philippe KONE	Maître - Assistant
Mr Passoret VOUNBA	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mlle Fausta DUTUZE	Monitrice

3. PARASITOLOGIE-MALADIES PARASITAIRES-ZOOLOGIE APPLIQUEE

Louis Joseph PANGUI	Professeur
Oubri Bassa GBATI	Maître - Assistant
M. Mahamadou SYLLA	Moniteur
M. Steve NSOUARI	Moniteur

4. PATHOLOGIE MEDICALE-ANATOMIE PATHOLOGIQUE- CLINIQUE

AMBULANTE

YalacéYamba KABORET	Professeur
Yaghoubba KANE	Maître de conférence agrégé
Mireille KADJA WONOU	Maître - Assistante
M. Richard MISSSOKO MABEKI	Docteur vétérinaire vacataire
M. Mor Bigué DIOUF	Moniteur
Mr Omar FALL	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Alpha SOW	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Abdoulaye SOW	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Ibrahima WADE	Docteur Vétérinaire Vacataire
Mr Charles Benoît DIENG	Docteur Vétérinaire Vacataire

5. PHARMACIE-TOXICOLOGIE

Assiongbon TEKOU AGBO	Chargé de recherche
Gilbert Komlan AKODA	Maître - Assistant
Mr Abdou Moumouni ASSOUMY	Assistant
M. Richard HABIMANA	Moniteur

C. DEPARTEMENT COMMUNICATION

CHEF DE DEPARTEMENT : Professeur YalacéYamba KABORET

SERVICES

1. BIBLIOTHEQUE

Mme Mariam DIOUF	Ingénieur Documentaliste (Vacataire)
------------------	--------------------------------------

2. SERVICE AUDIO-VISUEL

Bouré SARR	Technicien
------------	------------

3. OBSERVATOIRE DES METIERS DE L'ÉLEVAGE (O.M.E.)

D. SCOLARITE

Mr Théophraste LAFIA	Chef de la Scolarité
Mlle Aminata DIAGNE	Assistante

PERSONNEL VACATAIRE (Prévu)

1. BIOPHYSIQUE

Boucar NDONG

Assistant
Faculté de Médecine et de Pharmacie
UCAD

2. BOTANIQUE

Dr Kandoura NOBA

Dr César BASSENE

Maître de Conférences (Cours)
Assistant (TP)
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

3. AGRO-PEDOLOGIE

Fary DIOME

Maître-Assistant
Institut de Science de la Terre (I.S.T.)

4. ZOOTECHNIE

Abdoulaye DIENG

Alpha SOW

El Hadji Mamadou DIOUF

Maître de conférences agrégé
ENSA-THIES
Docteur vétérinaire vacataire
PASTAGRI
Docteur vétérinaire vacataire
SEDIMA

5. H I D A O A:

Malang SEYDI

Professeur
E.I.S.M.V – DAKAR

6. PHARMACIE-TOXICOLOGIE

Amadou DIOUF

Professeur
Faculté de Médecine et de Pharmacie
UCAD

PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV

1. MATHEMATIQUES

Abdoulaye MBAYE
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD
Assistant

2. PHYSIQUE

Amadou DIAO
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD
Assistant

⌘ Travaux Pratiques

Oumar NIASS
Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

3. CHIMIE ORGANIQUE

Aboubacary SENE
Maître - Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

4. CHIMIE PHYSIQUE

Abdoulaye DIOP
Mame Diatou GAYE SEYE
Maître de Conférences
Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

⌘ Travaux Pratiques de chimie

Assiongbon TECKO AGBO
Assistant
EISMV – DAKAR

⌘ Travaux Dirigés de CHIMIE

Momar NDIAYE
Maître - Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

5. BIOLOGIE VEGETALE

Dr Aboubacry KANE
Dr Ngansomana BA
Maître - Assistant (**Cours**)
Assistant Vacataire (**TP**)
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

6. BIOLOGIE CELLULAIRE

Serge Niangoran BAKOU
Maître de conférences agrégé
EISMV – DAKAR

7. EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE

Malick FALL

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

8. PHYSIOLOGIE ANIMALE

Moussa ASSANE

Professeur
EISMV – DAKAR

9. ANATOMIE COMPAREE DES VERTEBRES

Cheikh Tidiane BA

Professeur
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

10. BIOLOGIE ANIMALE (Travaux Pratiques)

Serge Niangoran BAKOU

Maître de conférences agrégé
EISMV – DAKAR

Oubri Bassa GBATI

Maître - Assistant
EISMV – DAKAR

Gualbert Simon NTEME ELLA

Assistant
EISMV – DAKAR

11. GEOLOGIE :

⌘ FORMATIONS SEDIMENTAIRES

Raphaël SARR

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

⌘ HYDROGEOLOGIE

Abdoulaye FAYE

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

DEDICACES

A ALLAH Seigneur de l'Univers

A Son Messager et Sceau des prophètes notre bien aimé Mohamed (PSL)

A mon père Mr Assane SARR

Toujours présent à mes cotés, tu m'as sans cesse poussé vers l'avant. Je ne te dirai pas assez combien tu comptes pour moi. Je te souhaite une longue vie et beaucoup de santé.

A ma mère Mme Ramatoulaye SANGARE

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte. C'est grâce à tes encouragements que j'ai pu franchir les obstacles de la vie. J'espère que tu es fière de moi en ce jour de consécration.

A mon guide spirituel : Serigne Cheikh Sidy AL-Moukhtar MBACKE

A tous mes frères/sœurs : Samba, Mamadou, Mamadou Moro, Thierno, Lala, Aminata et Ndeye Fatou.

A ma bien aimée: Aminata GAYE

Tu m'as inondé d'amour durant toutes ses années par ton écoute et tes encouragements. Tu es restée près de moi pour le meilleur et pour le pire. Je t'aime

A toute ma famille : Ndeye Fatou NIANG, Mame TINE, Rosana COPERTINO, Néné DIALLO, Mami DIALLO, Amadou NIANG, Omar KANDE, Samba DIALLO ect.....

A la mémoire de mon condisciple Cheikh Mamadou DIOP décédé pendant les élections

Tu nous a quitté trop tôt au moment où les espoirs étaient permis. Repose en paix cher ami.

A tous les membres et condisciples du « Jama' atou Hizboullahi likhidmatil Khadim »

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos sincères remerciements :

- *Au Directeur Général de l'EISMV de Dakar, Professeur **Joseph Louis PANGUI***
- *Au **Dr. Alpha Amadou DIALLO** pour avoir initié et encadré avec rigueur ce travail*
- *Au professeur **Rianatou BADA ALAMBEDJI**, qui a toujours été présente et a contribué à la bonne marche de ce travail, malgré ses multiples occupations.*
- *A tous nos maîtres de l'EISMV de Dakar, pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont si généreusement dispensé. Hommage respectueux*
- *A tout le personnel du Laboratoire National d'Elevage et de Recherches Vétérinaires (LNERV) en particulier **Dr. Yaya THIONGANE***
- *A tout le personnel de l'Office National de l'Assainissement du Sénégal (ONAS)*
- *A tout le personnel des abattoirs de DAKAR en particulier **Drs. DATT et NDIAYE***
- *A notre grand frère aîné **Samba SARR** tu n'as pas hésité à te sacrifier pour me soutenir pendant toutes ses années. Merci beaucoup que DIEU te bénisse.*

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre Maître et Président de jury, M. Moussa Fafa CISSE Professeur à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Dakar

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider notre jury de thèse. Votre approche cordiale et la facilité avec laquelle vous avez répondu favorablement à notre sollicitation nous ont marqué. Soyez assuré, honorable président, de notre profonde reconnaissance. Hommage respectueux.

A notre Maître, Directeur et rapporteur de thèse, Mme Rianatou BADA ALAMBEDI Professeur à l'EISMV de Dakar

Vous avez su guider d'une main rationnelle ce travail, malgré vos multiples occupations. Les moments passés ensemble nous ont permis de découvrir en vous l'exemple même de la simplicité, de la bienveillance et de l'amour pour un travail bien fait. Soyez rassuré, de notre sincère reconnaissance et de tout l'amour que nous vous portons. Hommage respectueux.

A notre Maître et Juge, M. Malang SEYDI Professeur à l'EISMV de Dakar

Nous avons eu le privilège d'être parmi les étudiants que vous avez formé. Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce modeste travail malgré vos multiples occupations. Soyez rassuré de notre profonde gratitude et de notre vive admiration. Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre profonde et sincère gratitude.

“Par délibération, la faculté et l’école ont décidé que les opinions émises dans les dissertations qui leurs sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu’elles n’entendent leur donner aucune approbation ni improbation”

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AEEC : Attaching and Effacing *E. coli*

A/E : Attachement/Effacement

AFNOR : Association Française de Normalisation

BET : Bromure d’Ethidium

BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Elargi

BTP : Bâtiment et Travaux Publics

CLSI : Clinicat Laboratory Standard Institute

DAEC : Diffusely Adherent *E. coli*

EAEC : Enteroaggregative *E. coli*

E. coli : *Escherichia coli*

EHEC : Enterohaemorrhagic *E. coli*

EIEC : Enteroinvasive *E. coli*

EPEC : Enteropathogenic *E. coli*

ETEC : Enterotoxigenic *E. coli*

ExPEC : Extraintestinal Pathogenic *E. coli*

IMS : Immuno Magnétique Séparation

KDa : Kilodalton

LB : Luria Bertani

LEE : Locus of Enterocyte Effacement

LPS : Lipopolysaccharides

MDa : Mégadalton

MES : Matières En Suspension

mn : minute

MNEC: Meningitis associated *E. coli*

mTSB: modified Trypticase Soya Broth

P : Phosphore

PCR : Polymerase Chain Reaction

PTT : Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique

REUE : Réutilisation des Eaux Usées Epurées

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

SMAC : Sorbitol à la gélose Mac Conkey

SSTT : Système de Sécrétion de Type III

STEC : Shiga-like Toxin producing *E. coli*

STEP : Station d'Épuration

TAE : Tris Acétate EDTA

TIAC : Toxi-infections Alimentaires Collectives

UFC : Unité Formant Colonie

UPEC : Uropathogenic *E. coli*

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Principaux critères différentiels des espèces du genre <i>Escherichia</i>	11
<u>Tableau II</u> : Critères d'identification des EHEC majeurs.....	17
<u>Tableau III</u> : Préparation du Mix.....	37
<u>Tableau IV</u> : Les couples d'amorces utilisées.....	37
<u>Tableau V</u> : Les souches utilisées comme témoins positif et négatif.....	38
<u>Tableau VI</u> : Dénombrement des Entérobactéries et <i>Escherichia coli</i> en fonction du site de prélèvement.....	41
<u>Tableau VII</u> : Isolement des souches <i>E. coli</i>	42
<u>Tableau VIII</u> : Prévalence des gènes associés aux EHEC en fonction des sites de prélèvements.....	43
<u>Tableau IX</u> : Caractéristiques des souches <i>E. coli</i> porteuses de gènes associés aux EHEC...43	
<u>Tableau X</u> : Profil de résistance des souches <i>E. coli</i> selon les sites de prélèvements.....	44

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : schéma de la réutilisation directe et indirecte des eaux usées.....	9
Figure 2 : Sites de colonisation des <i>E. coli</i> pathogènes.....	12
Figure 3 : Définition et place des AEEC, STEC et EHEC.....	13
Figure 4 : mécanisme d'action des Shiga-toxines.....	19
Figure 5 : Modélisation des trois principales étapes de l'interaction entre une souche EHEC et un entérocyte aboutissant à la formation d'une lésion d'attachement et d'effacement (A/E).....	21
Figure 6 : épidémiologie des EHEC, transmission directe et indirecte.....	24
Figure 7 : Démarche expérimentale.....	34
Figure 8 : Image de l'électrophorèse des souches <i>E.coli</i> isolées de l'abattoir porteuses de gènes associés aux EHEC.....	42

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION	1
Première partie : Synthèse bibliographique	3
Chapitre I : Les eaux usées.....	4
I-1-Définition des eaux usées.....	4
I-1-1-les eaux usées domestiques.....	4
I-1-2-les eaux usées industrielles.....	4
I-1-3-les eaux usées urbaines.....	4
I-1-4-les eaux pluviales.....	5
I-2-Traitement des eaux usées.....	5
I-2-1-Les procédés physico-chimiques.....	5
I-2-1-1- La décantation.....	5
I-2-1-2- La coagulation et la floculation.....	5
I-2-1-3- La flottation.....	6
I-2-2-Les procédés biologiques.....	6
I-2-2-1- Elimination du carbone.....	6
I-2-2-2- Elimination de l'azote.....	7
I-2-2-3- Le traitement des boues.....	7
I-2-2-3-1- Réduction du pouvoir fermentescible ou stabilisation.....	7
I-2-2-3-2- La réduction du volume.....	7
I-3- Réutilisation des eaux usées.....	8
I-3-1-Réutilisation pour un usage alimentaire (eau « potable »).....	9
I-3-2- Les usages non potables dans les secteurs agricoles (irrigation), industriel et urbain.....	9

I-3-2-1- L' agriculture urbaine et périurbaine.....	9
I-3-2-2- Secteur industriel.....	10
Chapitre II: les Escherichia coli	11
II-1-Taxonomie.....	11
II-2-L'espèce Escherichia coli.....	12
II-2-1- Les EHEC « Enterohaemorrhagic E.coli »	13
II-2-1-1- Définition.....	13
II-2-1-2- Classification des EHEC.....	14
II-2-1-3- Critères d'identification des EHEC majeurs.....	14
II-2-1-3-1- les critères immunologiques.....	14
II-2-1-3-2- les critères génétiques.....	16
II-2-1-3-3- les critères biochimiques.....	17
II-3-Facteurs de virulence et pouvoir pathogène des EHEC.....	17.
II-3-1-Les Shiga – toxines	17
II-3-1-1- Structure et mécanisme d'action.....	18
II-3-2-Facteurs responsables des lésions d'attachement et d'effacement (A/E)	20
II-3-2-1- les lésions A/E.....	20
II-3-2-2- le LEE.....	20
II-3-2-3- l'intimine.....	20
II-4-Epidémiologie des affections liées aux EHEC.....	21
II-4-1- Réservoir.....	22
II-4-2-Mode de transmission	22
II-4-2-1- Transmission alimentaire.....	22
II-4-2-2- Transmission inter-humaine.....	22
II-4-2-3- Transmission hydrique.....	23
II-4-2-4- Contact avec les animaux et leur environnement.....	23

Chapitre III : RESISTANCE DES <i>E. COLI</i> AUX ANTIBIOTIQUES	25
III-1-Définition de la résistance bactérienne	25
III-1-1-La résistance naturelle	25
III-1-2-La résistance acquise.....	25
III-2-Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	26
III-2-1-Mécanismes biochimiques.....	26
III-2-1-1-Modification de la perméabilité de la membrane externe.....	26
III-2-1-2-Modification de la cible ou substitution.....	26
III-2-1-3- Synthèse d'enzymes d'inactivation de l'antibiotique.....	26
III-2-1-4- Efflux actif de l'antibiotique.....	27
III-2-2- Mécanismes Génétiques.....	27
III-2-2-1-Supports génétiques de la résistance.....	27
III-2-2-1-1-Les chromosomes.....	27
III-2-2-1-2- Les plasmides.....	27
III-2-2-1-3- Le transposon.....	28
III-2-2-1-4-Les intégrons.....	28
III-2-2-2-Mécanisme d'acquisition de la résistance aux antibiotiques.....	28
III-2-2-2-1- Mutation.....	28
III-2-2-2-2-Conjugaison.....	28
III-2-2-2-3-Transduction.....	29
III-2-2-2-4- La Transformation.....	29
III-3-Mise en évidence de la résistance par l'Antibiogramme.....	29
III-4 -Prévalence de la résistance des <i>E. coli</i> aux antibiotiques dans le monde.....	30
Deuxième partie : Etude expérimentale.....	31
Chapitre I : Matériel et méthodes.....	32
I-1- Contexte de l'étude.....	32
I-2- Caractéristiques des sites d'étude	33

I-2-1- Les abattoirs de Dakar.....	33
I-2-2- La station d'épuration urbaine de Cambérène.....	33
I-3- Démarche expérimentale.....	34
I-3-1- Réalisation des prélèvements d'effluents.....	35
I-3-2- Dénombrement et isolement de souches <i>E.coli</i>	35
I-3-2-1- Concentration des prélèvements.....	35
I-3-2-2- Dénombrement bactérien.....	35
I-3-2-3- Constitution d'une collection de souches.....	36
I-3-2-4- Recherche des souches d' <i>E.coli</i> porteuses des gènes <i>eae</i> , <i>stx1</i> et <i>stx2</i>	36
- Extraction d'ADN à la soude.....	36
- Recherche des gènes <i>eae</i> , <i>stx1</i> et <i>stx2</i> par PCR multiplexe.....	37
- Electrophorèse sur gel d'agarose.....	38
I-3-3- Realisation de l'Antibiogramme.....	39
I-3-3-1- Préparation de l'inoculum.....	40
I-3-3-2- Ensemencement de l'inoculum.....	40
I-3-3-3- Dépôt des disques chargés d'antibiotiques et incubation.....	40
I-3-3-4- Traitement des données.....	41.
Chapitre II : Présentation des résultats.....	41
II-1- Résultats du Dénombrement des Enterobacteries et <i>E. coli</i>	41
II-2- Résultats de criblage des gènes <i>eae</i> , <i>stx1</i> et <i>stx2</i>	42
II-3- Résultats de l'antibiogramme.....	43
Chapitre III : Discussion et Recommandations.....	45
Conclusion Générale.....	50
Références Bibliographiques et Webographiques.....	53
Annexes.....	61

INTRODUCTION

L'utilisation d'eaux usées en agriculture est une pratique de plus en plus répandue au Sénégal, en particulier dans la zone périurbaine de Dakar, où la culture pluviale ne peut se faire sur une longue période. Par ailleurs, les infrastructures d'assainissement, dans des villes à urbanisation galopante, n'arrivent pas à suivre les besoins. A partir des usines, des ménages, des marchés, des hôpitaux, etc... les eaux usées débouchent dans les rues, les lits de rivières, les canaux d'eaux pluviales ou dans des stations d'épuration à faible capacité de traitement. C'est généralement autour de ces eaux usées, plus ou moins stagnantes, que les sites de maraichage sont créés, par des populations pauvres des zones périurbaines et/ou immigrantes des campagnes. La pratique de l'utilisation de toutes sortes d'eaux usées s'y opère alors de manière non planifiée et non contrôlée dans les activités d'agriculture urbaine, incluant l'arrosage de légumes consommables crus. Le principal risque de la réutilisation des eaux usées est d'ordre sanitaire, liée à la survie des germes pathogènes dans ces eaux. L'épisode de Walkerton survenu au Canada en 2000 a démontré que ce risque n'était pas négligeable, alors que, suite à une consommation d'eau contaminée, 2 300 personnes ont nécessité des soins médicaux et 7 sont même décédées (**PHAC, 2000**). Les bactéries en cause dans cette contamination de l'eau potable étaient des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) *du sérotype* O157:H7 qui provenaient d'un fumier de bovins. Depuis 1982, ces bactéries ont souvent été incriminées lors d'épidémies de diarrhée, de colites hémorragiques et de Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU) (**CAPRIOLI, 2005; UNC et al., 2003**).

Nombreuses études indiquent que des isolats bactériens résistants et/ou pathogènes d'origine humaine ou animale sont excrétés dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux usées (**JAKOBSEN, 2008; PRADO, 2008; YANG, 2009**). Les ruminants, principal réservoir des EHEC, participent à la contamination de l'environnement qui devient alors le relais indispensable à l'entretien du cycle épidémiologique de ces pathogènes. Ils ont également été retrouvés dans les boues d'épuration des eaux usées issues des industries de transformation des produits d'origine animale (abattoir en particulier) (**HOLLER, 1999; VERNZOY-ROZAND et al., 2002**). Ainsi, l'épandage des effluents d'élevage et des boues de station d'épuration des industries agro-alimentaires peut favoriser la dissémination des EHEC à grande échelle dans les sols et les eaux superficielles. Cette pratique peut donc représenter un risque pour la Santé Publique.

Les connaissances sur le comportement et les caractéristiques des EHEC dans l'environnement, en particulier au cours des phases de traitement des eaux usées, sont mal connues et aucun plan de surveillance des EHEC dans l'environnement n'a été mis en place au Sénégal. En vue de documenter les risques microbiens liés à l'utilisation des eaux usées de la station d'épuration urbaine et des abattoirs, la présente étude a été effectuée.

Son objectif général est d'évaluer la prévalence des gènes de virulence associés aux EHEC chez les souches d'*E.coli* isolées des effluents d'abattoir et de la STEP tout en étudiant leur antibiorésistance.

Les objectifs spécifiques sont :

- d'Isoler les souches d'*E.coli* à partir des effluents d'abattoir de Dakar et de la STEP de Cambérène ;
- de rechercher des gènes de virulence des EHEC sur les souches d'*E.coli* isolées ;
- de déterminer la résistance phénotypique aux antibiotiques sur les souches d' *E.coli* possédant au moins un des gènes recherchés et sur quelques souches d'*E.coli* sélectionnées parmi les souches isolées de l'abattoir et de la STEP.

Le travail comprend deux parties :

- Une synthèse bibliographique sur les différents types d'eaux usées, les risques microbiologiques associés plus particulièrement aux EHEC et la résistance aux antibiotiques des souches d'*E.coli*.
- Une deuxième partie expérimentale qui traite du matériel et méthodes, présente les résultats qui sont ensuite discutés et suivis de recommandations.

Première partie : Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : Les eaux usées

I-1-Définition des eaux usées

Les eaux usées sont des eaux impropres ou polluées, qui doivent bénéficier d'un assainissement (traitement de l'eau) ou d'une dépollution avant leur rejet dans la nature ou leur consommation par l'homme. Elles peuvent être réparties en différents types : les eaux usées domestiques, les eaux usées industrielles, les eaux usées urbaines et les eaux pluviales.

I-1-1-les eaux usées domestiques

On distingue sous cette appellation les eaux usées issues d'une habitation individuelle. Elles comprennent les eaux ménagères et les eaux vannes.

- Les eaux usées ménagères représentent des eaux de cuisine, des eaux savonneuses (bains, douche, vaisselle, lessive). Elles contiennent des matières en suspension (MES), des matières organiques ou minérales dissoutes, des graisses et surtout des détergents divers.
- Les eaux vannes sont constituées des urines et des matières fécales diluées avec l'eau de chasse.

I-1-2-les eaux usées industrielles

Les eaux usées industrielles présentent une très grande diversité de composition, telle que leur description ne peut être réellement entreprise. On peut cependant de façon simplifiée considérer : les eaux usées à charge minérale dominante (installations minières, carrières, cartonneries), les eaux usées à charge organique dominante (laiteries, abattoirs, conserveries), les eaux usées à charge chimique dominante (ateliers de traitement de surface, de bains chimiques qui peuvent contenir des métaux lourds, des substances pharmaceutiques).

I-1-3-les eaux usées urbaines

Il s'agit des eaux usées domestiques auxquelles s'ajoutent des rejets industriels, des effluents de services collectifs (hôpitaux, centres commerciaux) et des eaux de voiries (**KHALLAAYOUNE et CABARET, 2009**).

I-1-4-les eaux pluviales

L'eau de pluie se charge d'impuretés au contact de l'air (fumées Industrielles), puis, en ruisselant, des résidus déposés sur les toits et les chaussées des villes (huiles de vidange, carburants, résidus de pneus et métaux lourds etc..).

Compte-tenu des éléments présents dans les eaux usées, la réutilisation d'une eau de mauvaise qualité peut présenter des risques pour la santé et l'environnement, et poser des problèmes d'ordre technique en bouchant les conduites et les systèmes d'irrigation par exemple. D'un point de vue sanitaire, la quantité de contaminants qui parvient dans l'environnement se nomme la charge excrétée. Sa composition dépend de la population à l'origine de la production des eaux usées, et notamment de la proportion d'individus infectés et des conditions d'hygiène. Elle peut être considérablement réduite par un traitement adéquat. Ce dernier est donc impératif dans le cas d'une réutilisation des eaux usées.

I-2-Traitement des eaux usées

Par un système de canalisation, les effluents sont drainés jusqu'à la station d'épuration. Ils sont soumis à un prétraitement (dégrillage, tamisage, dessablage, dégraissage-déshuilage, bassin tampon) dont le but est de retirer mécaniquement les éléments solides et les graisses favorisant ainsi la protection des ouvrages en aval (canalisations, pompes, bassins). Le traitement proprement dit fait appel à des procédés physico-chimiques et biologiques (HERAU, 2003; PERDRIX, 2002).

I-2-1-Les procédés physico-chimiques

I-2-1-1-La décantation

Elle consiste à laisser les matières en suspension, organiques ou non, se déposer dans le fond du bassin simplement par gravité. Elles y sont raclées et évacuées formant ainsi les boues primaires.

I-2-1-2-La coagulation et la floculation

Il s'agit d'abord de neutraliser les forces de répulsion qui maintiennent les colloïdes en suspension, grâce à un coagulant (sels de fer II et III, sels d'aluminium III, composés poly-électriques), puis de favoriser leur agglomération et leur décantation grâce à un floculant (macromolécules ioniques ou neutres).

I-2-1-3- La flottation

La flottation est un procédé de séparation solide-liquide ou liquide-liquide qui s'applique à des particules dont la masse volumique est inférieure à celle du liquide qui les contient. Elle est provoquée en utilisant des bulles d'air très fines ou "microbulles" de 40 à 70 microns de diamètre, semblables à celles présentes dans "l'eau blanche" débitée par le robinet d'un réseau d'eau sous forte pression (**PETIT et al., 2007**).

I-2-2-Les procédés biologiques

Les principaux procédés biologiques utilisés pour le traitement des eaux usées peuvent être classés en deux types : les procédés à cultures fixées et les procédés à cultures libres. Dans les procédés à cultures fixées (tels que les lits bactériens ou les biofiltres), les microorganismes forment des biofilms qu'ils soient sous condition aérobie ou anaérobie. Les biofilms sont des structures biologiques constituées de cellules immobilisées en présence de substrats et enveloppées dans une matrice polymérique d'origine microbienne. Le principe du procédé à cultures libres a été décrit par Adern et Lockett en 1914 où les boues issues de la biodégradation des effluents ont été soumises à une aération continue. En présence d'oxygène, l'activité bactérienne a été stimulée par la formation d'agrégats dans le bassin biologique. Un tel procédé intensif d'épuration a été appelé boues activées (**METCALF, 2003; CHARACKLIS et MARSHALL, 1990**).

La pollution organique présente dans les eaux usées est transformée / dégradée en composés inorganiques (CO_2 , NO_3^- , NO_2^- , CH_4^+ , H_2) par des processus biologiques. Deux types de pollution organique sont observés :

- La pollution primaire : pollution carbonée, azotée et phosphorée,
- La pollution secondaire ou micro-pollution : substances contenues dans les eaux usées à des concentrations relativement faibles de l'ordre de ng ou $\mu\text{g/L}$.

I-2-2-1-Elimination du carbone

Le traitement du carbone est assuré par une biomasse hétérotrophe aérobie qui va transformer les composés apportés par l'effluent en biomasse (nouvelles bactéries hétérotrophes). Préalablement à cette transformation par assimilation (métabolisme bactérien), on distingue deux étapes dans l'élimination des polluants dans l'eau :

- Un mécanisme d'adsorption (fixation sur la paroi bactérienne) principalement pour les fractions colloïdale et particulaire. Avant assimilation, ces composés nécessitent une hydrolyse par activité enzymatique aboutissant à des composés plus facilement assimilables.
- Un mécanisme d'absorption principalement pour les composés solubles ou hydrolysés. On parle de cinétique d'assimilation ou vitesse d'assimilation. (FNDAE, 2007).

I-2-2-2- Elimination de l'azote

L'azote organique est dans un premier temps hydrolysé en azote ammoniacal qui est ensuite éliminé sous forme d'azote moléculaire au cours de réactions en deux étapes. Dans la première étape aérobie, on a la nitrification, l'ion ammonium est oxydé en nitrate NO_3^- et, dans la deuxième étape de dénitrification, le nitrate remplace l'oxygène comme accepteur final d'électrons lors de l'oxydation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes, ce qui diminue les besoins en oxygène (SORAYA, 2005).

I-2-2-3-Le traitement des boues

Les boues vont subir différents traitements en vue de réduire leur pouvoir fermentescible ainsi que leur volume :

I-2-2-3-1- Réduction du pouvoir fermentescible ou stabilisation

Trois méthodes sont utilisées à savoir la digestion anaérobie (les matières organiques complexes sont dégradées en méthane et en dioxyde de carbone), la stabilisation chimique grâce à l'incorporation de chaux $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$ et la stabilisation thermique par pasteurisation à une température de 70°C pendant 30 minutes.

I-2-2-3-2- La réduction du volume

a) La déshydratation

Ce traitement permet de faciliter le transport ou l'utilisation ultérieure des boues. Il est précédé d'un conditionnement préalable qui facilitera la déshydratation. Cette déshydratation peut être obtenue par différents procédés.

b) L'épaississement

L'**épaississement** donne des boues liquides. Il peut se faire par simple **décantation** statique (gravité), par **égouttage** ou par **flottation** c'est à dire par insufflation d'air. Cette dernière technique, qui maintient les boues en aérobie, est plus souvent mise en oeuvre sur des boues de déphosphatation biologique pour éviter le relargage de P (phosphore) anaérobie.

c) Le filtrage sur filtre à presse

Le filtre à bandes presseuses, très répandu fonctionne en trois temps: floculation avec des polyélectrolytes, drainage de la boue floculée (qui provoque un épaississement rapide de la boue), et pressage de la boue drainée. Ce traitement permet d'obtenir des résultats satisfaisants sur la grande majorité des boues organiques.

d) La centrifugation

La centrifugation permet une bonne séparation des solides sur des boues très difficiles (boues très organiques), avec un travail en continu et une surveillance réduite des machines .

e) Le séchage en vapeur d'eau surchauffée

Le principe du séchage thermique est basé sur l'évaporation de l'eau interstitielle contenue dans les boues, et donc sur son élimination. Il conduit à des boues semi- déshydratées (**GUIVARCH, 2001**).

La raréfaction des ressources en eau et la dégradation de leur qualité est un défi majeur pour le XXI^e siècle. Afin de préserver la qualité des masses d'eau et pour diminuer les prélèvements dans le milieu naturel, il convient de chercher des approvisionnements alternatifs. La réutilisation des eaux usées épurées, peut constituer l'un de ces approvisionnements.

I-3- Réutilisation des eaux usées

Près du dixième de la population mondiale consommerait des aliments produits en utilisant des eaux usées (**SCOTT et al., 2004**). En fonction des exigences de qualité des consommateurs, deux grandes classes de réutilisation peuvent être définies :

- Les usages potables qui peuvent être directs, après un traitement poussé, ou indirects, après passage dans le milieu naturel.
- Les usages non potables dans les secteurs agricoles (irrigation), industriel et urbain (LANDREAU, 1982).

I-3-1-Réutilisation pour un usage alimentaire (eau « potable »)

Le progrès technologique du métier de l'eau permet de produire une eau de très bonne qualité, même à partir des eaux usées. Toutefois, les principales contraintes pour ce type d'usage sont psychologiques et culturelles associées à la perception de l'eau usée comme dangereuse et malsaine. De ce fait, la tendance principale aujourd'hui est l'usage indirect, après un séjour temporaire de l'eau usée traitée dans le milieu naturel (voir **figure 1**) (LAZAROVA, 1998).

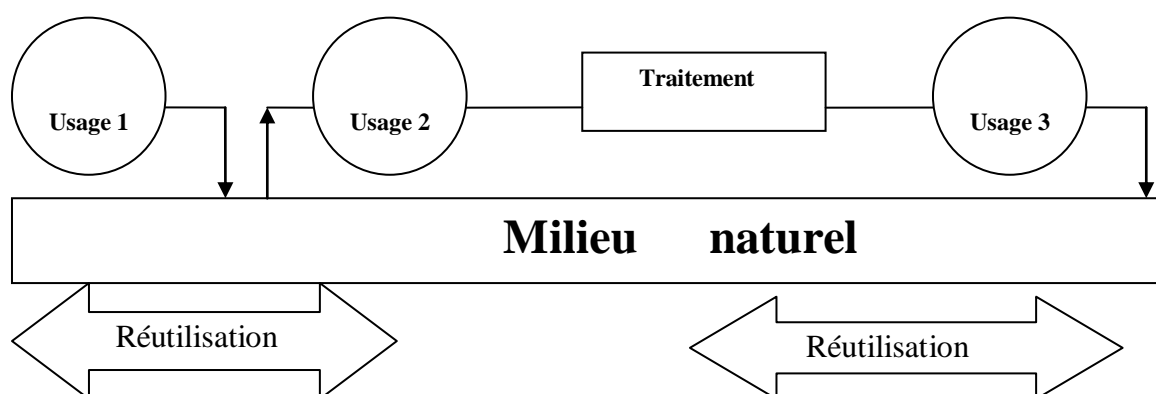


Figure 1: Schématisation de la réutilisation directe et indirecte des eaux usées.

I-3-2- Les usages non potables dans les secteurs agricoles (irrigation), industriel et urbain

I-3-2- 1- L'agriculture urbaine et périurbaine

La problématique de la réutilisation des eaux usées en Afrique de l'ouest se présente différemment en fonction de la disponibilité de la ressource en eau. En effet, la situation n'est pas la même dans les pays côtiers et dans les pays sahéliens où la ressource en eau est plutôt rare, et où les eaux usées constituent plutôt un atout et une ressource à mettre à profit dans un contexte de pauvreté urbaine. Dans la ville de Dakar, 180 000 m³ d'eaux usées sont rejetées tous les jours. Sur cette quantité, seule une faible part est réutilisée dans l'agriculture urbaine.

Comme dans la plupart des grandes villes, Dakar n'échappe pas à la règle. Des études récentes menées dans la zone périurbaine de Dakar ont montré que la population a développé une stratégie locale qui s'est traduite par une utilisation des eaux usées comme source d'eau d'arrosage (CREPA., 2002).

I-3-2- 2- Le secteur industriel

Les secteurs les plus grands consommateurs en eau sont les centrales thermiques et nucléaires (eau de refroidissement) et les papeteries (LAZAROVA, 1998). A Dakar, les eaux usées traitées sont surtout utilisées par les entreprises de bâtiment et travaux publics (BTP) pour les travaux de terrassement (www.aps.sn/spip.php?article29084).

En somme, la réutilisation des eaux usées urbaines rejetées se présente comme une alternative assez intéressante pour résoudre le problème de la disponibilité en eau de boisson ou d'irrigation. Les avantages liés à cette pratique ne sont plus à démontrer, malheureusement, il en est de même des risques sanitaires connexes. Les micro-organismes (virus, bactéries, protozoaires et helminthes) constituent le principal danger sanitaire pour la réutilisation des eaux usées épurées. Parmi ces micro-organismes nous traiterons dans le deuxième chapitre l'espèce *E. coli* et plus particulièrement les *Escherichia coli* enterohémorragiques (EHEC) qui sont considérés actuellement comme des pathogènes émergents en santé publique.

Chapitre II : les *Escherichia coli*

II-1-Taxonomie

Escherichia coli, l'une des premières espèces bactériennes étudiées par les scientifiques a été isolée pour la première fois en 1885 dans les selles de nourrissons par le pédiatre allemand Theodor Escherich qui lui donna le nom de bacille *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885). En 1919, pour rendre hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chambers ont renommé la bactérie *Escherichia coli* (GRIMONT, 1987). Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* du fait de leur isolement fréquent du tube digestif de l'homme et /ou de fèces des mammifères (GREATOREX et THORNE, 1994). Les genres appartenant à cette famille sont des bacilles à gram négatif, ne possédant pas d'oxydase, aéro-anaérobies facultatifs et parfois mobiles grâce à une ciliature péritriche. Le genre *Escherichia coli* est constitué de 5 espèces : *E. coli* ; *E. blattae* ; *E. fergusonii* ; *E. hermannii* et *E. vulneris* dont les principaux critères différentiels de 4 d'entre elles sont présentés dans le (Tableau 1) (EUZEBY, 2007).

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

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

(+) : positif; +/- : positif ou négatif; LDC : Lysine Décarboxylase ; ODC, Ornithine Décarboxylase.

II-2-L'espèce *Escherichia coli*

Escherichia coli représente une espèce bactérienne très étudiée. Il existe de nombreuses différences entre les souches de cette même espèce. On peut distinguer trois grands groupes d'*E. coli* : des bactéries commensales, des bactéries pathogènes « intestinales » (les *E. coli* Entero-hémorragiques (EHEC), les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* Entéro-pathogènes (EPEC), les *E. coli* Entéro-agrégatifs (EAEC), les *E. coli* Entéro-invasifs (EIEC) et les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)) et enfin le groupe des bactéries pathogènes « extraintestinales » (les *E. coli* uropathogènes (UPEC) et *E. coli* responsables du méningite chez le nouveau-né (NMEC) (**CROXEN et FINLAY, 2010**) (**figure 2**). Les premières sont des colonisatrices intestinales et ne présentent aucun danger pour leur hôte, celles du deuxième groupe provoquent des maladies intestinales (diarrhée, diarrhée hémorragique...) et les ExPEC (UPEC et NMEC) sont responsables de troubles au niveau de nombreux sites extra-intestinaux (**RUSSO and JOHNSON, 2000**).

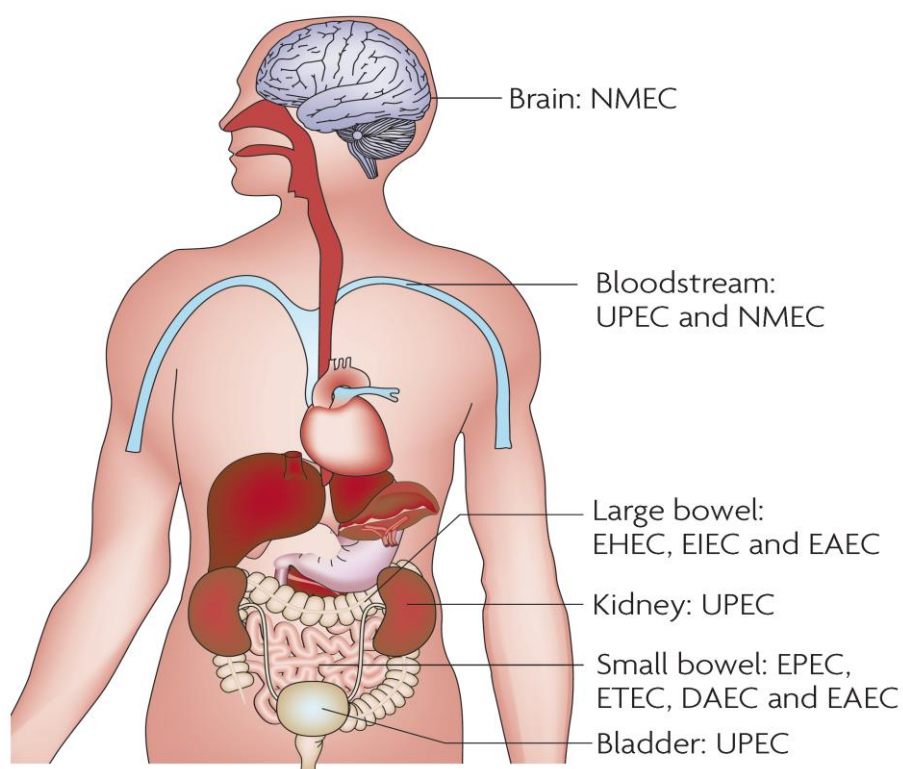


Figure 2: Sites de colonisation des *E. coli* pathogènes (**CROXEN et al., 2010**)

II-2-1- Les EHEC « Enterohaemorrhagic *E.coli* »

II-2-1-1- Définition

Les souches EHEC sont des souches pathogènes pour l'homme. Elles ont été isolées chez des individus malades, qui présentaient des colites hémorragiques ou le syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique post diarrhée particulièrement observé chez les jeunes enfants et chez les personnes âgées (AFSSA, 2008). Les souches, isolées chez ces patients, possèdent des facteurs de virulence, codés par des gènes de virulence, à l'origine de symptômes. Elles possèdent le gène *stx* qui code pour une Shiga-like toxine et elles possèdent le plus souvent le gène *eae*.

Les souches d'*E.coli* possédant le gène *stx* qui code pour une toxine sont qualifiées de STEC, tandis que les souches d'*E.coli* qui possèdent l'îlot chromosomique LEE, responsable des lésions d'attachement/effacement (A/E), sur lequel se trouve le gène *eae* sont qualifiées d'AEEC (**figure 3**). Parmi les AEEC, les souches responsables de diarrhées chez l'homme sont les EPEC. Il faut souligner que toutes les souches STEC et AEEC ne sont pas forcément pathogènes (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 2003).

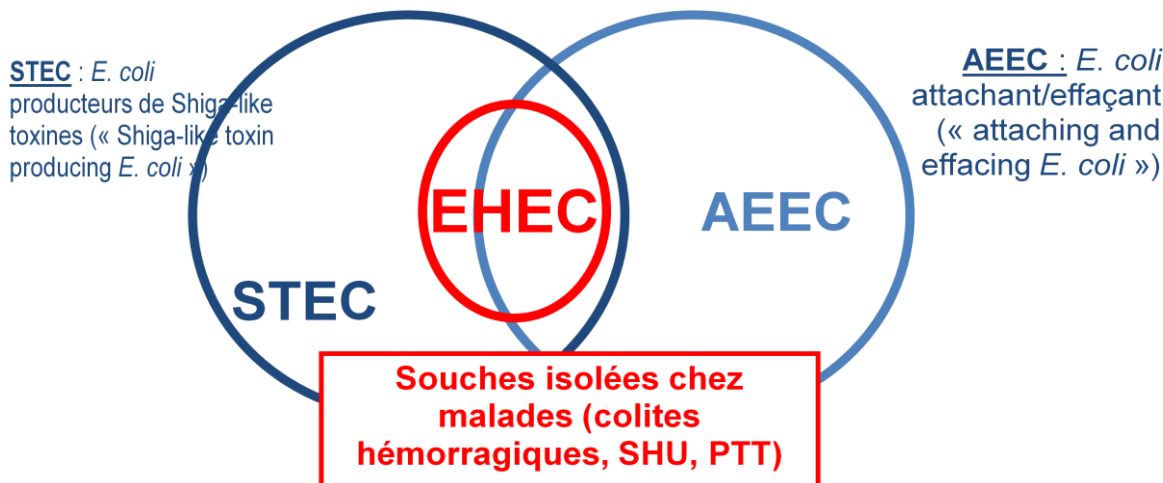


Figure 3 : Définition et place des AEEC, STEC et EHEC (VIMONT, 2007).

II-2-1-2- Classification des EHEC

La classification des EHEC s'est faite en se basant sur les travaux de **KAUFFMAN en 1947** mettant en évidence trois antigènes de surface : l'antigène somatique lipopolysaccharidique **O**, l'antigène flagellaire **H** et dans une moindre mesure l'antigène capsulaire polysaccharidique **K**. En complément du sérotype O157:H7 qui est le plus fréquemment retrouvé, les EHEC comptent 4 autres sérogroupes majeurs, classés ici selon leur importance décroissante : O26, O145, O103 et O111(**ANONYME, 2007**).

On parle « d'EHEC typique » et « d'EHEC atypique ». Les « EHEC typiques » sont considérés comme des souches capables de produire un ou deux types antigéniques de shiga-toxines (Stx1, Stx2) et possédant le locus chromosomique LEE qui porte le gène *eae* codant pour l'intimine. Ces EHEC possèdent également le plasmide EHEC de 60-MDa (**LEVINE, 1987**) (**figure 4**).

Les « EHEC atypiques » sont quant à eux des souches STEC qui ne produisent pas de lésion d'attachement et d'effacement et/ou ne possèderaient pas le plasmide EHEC. Les EHEC atypiques ne possèdent donc pas le gène *eae* mais possèdent au moins un des gènes *stx1/stx2* (**NATARO and KAPER, 1998**).

II-2-1-3- Critères d'identification des « EHEC majeurs »

Sur la base de ces études, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (**AFSSA, 2008**) a proposé une liste de souches **EHEC typiques** possédants des critères immunologique, génétique et biochimique (**tableau 2**).

II-2-1-3- 1- les critères immunologiques:

- L'antigène somatique lipopolysaccharidique correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. Il est composé de lipopolysaccharides (LPS) complexes, très toxiques, capables de provoquer dans l'organisme humain fièvre, leucopénie, bradycardie, hypotension et choc, coagulation intra-vasculaire disséminée et mort. Il est constitué d'une mosaïque d'antigènes dont certains sont des constituants communs à toutes les entérobactéries et d'autres, des constituants spécifiques de chaque espèce.

- L'antigène H n'est pas toxique. De nature protéique, il est constitué comme l'antigène O d'une mosaïque d'antigènes avec des constituants communs à toutes les entérobactéries mobiles et des constituants spécifiques à chaque espèce.

- Dans une moindre mesure *L'antigène capsulaire K* de nature polysaccharidique.

Plusieurs tests basés sur les critères immunologiques sont utilisés dans la détection des *E. coli* O157:H7

- ***Les Tests conventionnels ELISA/ELFA en microplaques***

Après une phase d'enrichissement le plus souvent de 24 heures c'est une méthode qui donne des résultats au bout de 2 heures. Le principe consiste à une fixation des anticorps spécifiques d'*E.coli* O157 au fond des puits de microplaques. Puis l'aliquote du bouillon d'enrichissement est déposé dans ces puits. Après incubation et une série de lavages, un anticorps "révéléateur" anti-O157 est ajouté pour détecter le couple anticorps-bactéries. Ce deuxième anticorps est couplé à une enzyme qui permet une révélation colorimétrique.

- ***Test en « une étape » immuno-chromatographique***

C'est aussi une méthode qui donne un résultat en 15 minutes après la phase d'enrichissement. Le principe consiste à l'imprégnation d'une membrane de particules d'or ou de latex recouvertes d'anticorps spécifiques d'*E.coli* O157:H7 tout cela soutenu par un support plastique, contenant un puits pour l'échantillon et une fenêtre de test et de contrôle. Le plus souvent 100µl de bouillon d'enrichissement est placé dans le puits où on doit mettre l'échantillon alimentaire qui diffuse le long de la membrane jusqu'à atteindre la zone test contenant l'anticorps anti-O157. Un test positif traduisant la présence d'*E.coli* O157 dans l'aliment se caractérise par l'apparition d'une ligne colorée dans la fenêtre test, après 10 à 20 minutes.

- ***Tests immunologiques automatisés***

Ces tests sont nombreux, parmi lesquels on a choisi ceux validés par l'AFNOR pour la détection d'*E. coli* O157: H7 en France à savoir le système VIDAS ECO (ISO en 16141) et la technique de séparation immuno-magnétique (IMS) (ISO en 16654).

✓ *La technique de séparation immuno-magnétique* est une méthode qui utilise des particules magnétiques couvertes d'anticorps spécifiques de l'organisme ciblé ajoutées à l'échantillon d'aliment à analyser. Par le biais d'un aimant, l'organisme cible est capturé à la surface des particules magnétiques et l'ensemble est retiré de l'échantillon. Ensuite les organismes cibles sont séparés par centrifugation des débris alimentaires et des micro-organismes qui peuvent interférer avec les différents systèmes de détection. Après

enrichissement, les billes sont généralement mises en culture sur des milieux sélectifs et les colonies caractéristiques sont ensuite confirmées à l'aide de tests biochimiques (galeries API, BioMerieux) et immunologiques (test d'agglutination latex O157, Recherche des Shiga-toxines par ELISA),

✓ La méthode VIDAS ECO consiste à un double enrichissement de l'échantillon alimentaire qui est réalisé dans du mTSB (modified Trypticase Soya Broth) pendant 6h à 42°C puis dans du bouillon MacConkey au sorbitol pendant 24h à 37°C. Une aliquote du bouillon d'enrichissement est ensuite analysée par le système VIDAS ECO. Lors d'une réponse positive avec ce système, une immunoconcentration est réalisée avec le système VIDAS ICE. Ce kit VIDAS ICE est composé des mêmes éléments que le kit VIDAS ECO (cône et barrette). Le cône est recouvert d'anticorps anti-O157 qui permettent de capturer les bactéries cibles qui sont ensuite relarguées sous forme d'un immunoconcentrat et peuvent être isolées sur des géloses spécifiques. Les colonies suspectes font, là encore, l'objet de confirmation (agglutination latex O157, identification de l'espèce, recherche de l'antigène H7, production de Shiga-toxine(s)).

II-2-1-3- 2- les critères génétiques

La majorité des souches retrouvées dans des cas de pathologies humaines et responsables de symptômes typiques des souches EHEC possèdent au moins un des gènes codant pour une Shiga-toxine (Stx1/Stx2) ainsi que le gène *eae* codant pour l'intimine, responsable des lésions d'attachement et d'effacement des entérocytes. Il existe des variants de l'intimine dû à un domaine C – terminal peu conservé. D'après les études épidémiologiques, les types d'intimine correspondant aux sérotypes les plus incriminés sont les suivants, *eae-α*, *eae-β*, *eae-ε*, *eae-ζ*, *eae-δ*. Le typage de l'intimine nous renseigne sur l'origine humaine ou animale de cette protéine. En effet, une intimine alpha sera caractéristique d'une souche EHEC humaine classique tandis qu'une intimine bêta sera caractéristique d'une souche EHEC animale (OSWALD *et al.*, 2000).

Tableau II : Critères génétiques d'identification des « EHEC typiques majeurs »

Souches	Gènes antigène lipopolysaccharidiques	Gènes antigène flagellaire	Gènes Shiga toxines	Gènes et variants intimine
EHEC O26:H11	<i>wzx_{O26}</i>	<i>flic_{H11}</i>	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae-beta</i>
EHEC O103:H2	<i>wzx_{O103}</i>	<i>flic_{H2}</i>	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae-epsilon</i>
EHEC O111:H8	<i>wbd1_{O111}</i>	<i>flic_{H8}</i>	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae-theta</i>
EHEC O145:H28	<i>ihp1_{O145}</i>	<i>flic_{H28}</i>	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae-gamma</i>
EHEC O157:H7	<i>rfbE_{O157}</i>	<i>flic_{H7}</i>	<i>stx1</i> et/ou <i>stx2</i>	<i>eae-gamma</i>

II-2-1-3- 3- les Critères biochimiques

A la différence de la fermentation du sorbitol et de l'activité β -glucuronidase la plupart des réactions biochimiques d'*E.coli* O157:H7 sont typiques des *E.coli* (LINGWOOD et al., 1987). Environ 93% des souches d'*E.coli* isolées chez l'homme fermentent le sorbitol en 24 heures par contre *E.coli* O157: H7 ne le fermente pas (NEAVES et al., 1994). De ce fait l'incapacité à fermenter le sorbitol a permis la mise au point d'un milieu particulier pour l'isolement d'*E.coli* O157: H7; la gélose Mac Conkey au sorbitol (SMAC) (OKREND et al., 1990). *E.coli* O157: H7 étant β -glucuronidase négatif et sorbitol négatif forme des colonies blanches tandis que les colonies sorbitol négatives et β -glucuronidase positives virent au vert ou au bleu (TESH et al., 1991).

II-3-Facteurs de virulence et pouvoir pathogène des EHEC

II-3-1-Les Shiga-toxines

Les EHEC sont caractérisés par leur capacité à produire une ou plusieurs toxines responsables de l'essentiel des signes cliniques observés. Anciennement appelée vérotoxine du fait de sa toxicité sur les cellules Véro (cellules rénale du singe vert d'Afrique *Cercopithecus aethiops sabaeus*), la toxine présente une certaine homologie avec la toxine de *Shigella dysenteriae* type 1 ce qui est à l'origine de son appellation actuelle

Shiga-toxines (ST) ou Shiga-like toxines (SLT) (**O'BRIEN et al., 1982; STROCKBINE et al., 1988**).

II-3-1-1-Structure et mécanisme d'action

Les shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70 KDa et possèdent deux sous unités, une sous unité A de 33 KDa et 5 sous unités B de 7.7KDa. Les toxines Stx1 et Stx2 sont composées de deux sous unités, A et B qui sont liées entre elles. Les sous unités A de ces deux toxines présentent 55% d'homologie au niveau de leur séquence nucléotidique et les sous unités B présentent 57% d'homologie.

- La sous unité A (pour activity) est organisée en deux peptides, A1 et A2. Ces deux peptides sont liés par un pont dissulfure. Le peptide A1 possède une activité enzymatique et le peptide A2 permet de lier le peptide A1 à la sous unité B (pour binding).

- La sous unité B, pentamérique, est elle-même constituée de cinq sous unités. Ces sous unités, assemblées en anneau, permettent la fixation de la toxine sur un glycolipide membranaire spécifique, le globotriosylcéramide (Gb3) qui est présent à la surface des cellules eucaryotes (**LINGWOOD et al., 1987**). Une fois la toxine fixée sur le récepteur, elle est internalisée par endocytose dans la cellule cible. Ensuite, elle est transportée vers l'appareil de Golgi puis vers le réticulum endoplasmique.

La sous unité A est scindée en deux parties A1 et A2 par réduction du pont disulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme où elle agit sur la sous unité ribosomale 60S. En effet, elle exerce une activité N-glycosidase sur l'adénosine située en position 2348 de l'ARN ribosomal 28S qui se traduit par l'inhibition de la synthèse protéique. La sous unité 60S du ribosome n'est alors plus capable d'interagir avec les facteurs d'élongation EF1 et EF2, ce qui conduit à l'arrêt des synthèses protéiques et finalement à la mort cellulaire (**NATARO et KAPER, 1998**).

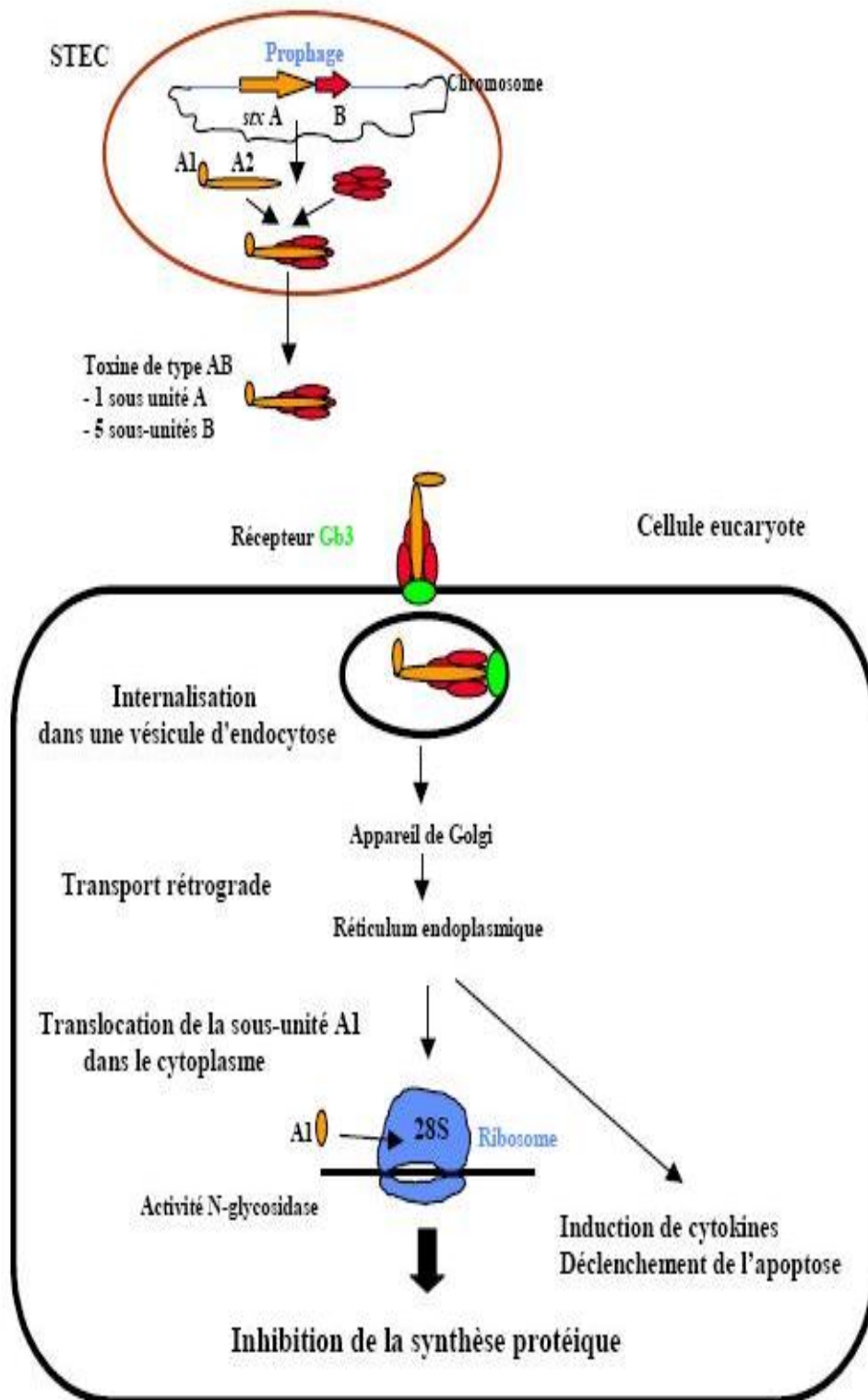


Figure 4 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (adapté de PRADEL, 2001)

II-3-2-Facteurs responsables des lésions d'attachement et d'effacement (A/E)

II-3-2-1-Les lésions A/E

Les EHEC sont connus par leur capacité à provoquer des lésions d'attachement/d'effacement des entérocytes. En effet, elles se caractérisent par une disparition des microvillosités intestinales au niveau des zones de contact entre la bactérie et la cellule cible (**DONNENBERG et al., 1993**). Ceci est dû à une dépolymérisation des filaments d'actine constituant les villosités, ce qui entraîne une accumulation suivie d'une repolymérisation et la formation d'un piédestal sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon étroite (structure pouvant s'allonger jusqu'à 10µm ressemblant à un pseudopode) (**NATARO and KAPER, 1998**).

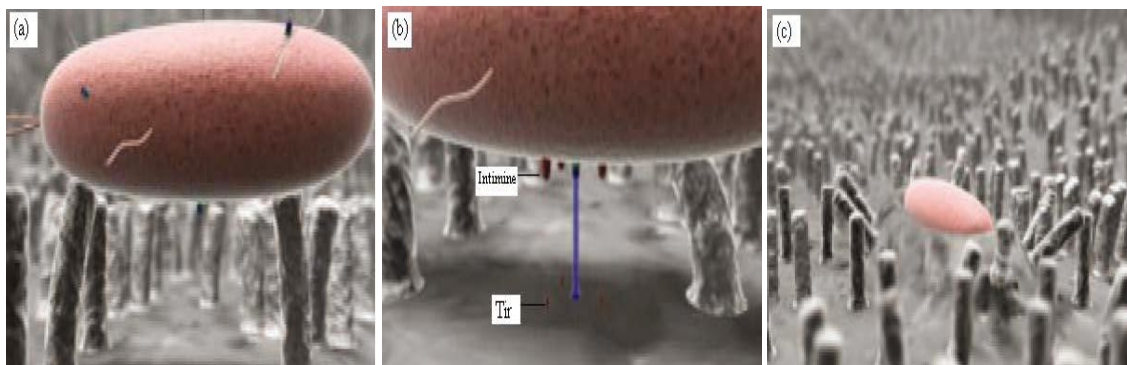
II-3-2-2-Le LEE

Les gènes nécessaires à ces lésions (A/E) sont localisés sur un îlot génomique de pathogénicité appelé le LEE (Locus d' Effacement des Entérocytes). Il est composé de trois régions fonctionnelles :

- La région 5' code pour plusieurs protéines de régulation et de structure du système de sécrétion de type III (SST3)
- La région centrale code à la fois pour l'intimine et pour son récepteur Tir (Translocated intimin receptor), transloqué dans la cellule cible
- La région 3' code pour d'autres effecteurs bactériens et d'autres protéines structurales impliquées dans la translocation (**JUNKAL GARMENDIA et al., 2005**).

II-3-2-3-L'intimine

C'est une protéine de membrane externe de 94 kDa. La fonction "adhésion" de l'intimine est assurée par les 280 acides aminés situés en C-terminal (**FRANKEL et al., 1998; JERSE et KAPER, 1991**) (**figure 5**). L'intimine est codée par le gène *eae* (pour « *E. coli* attaching and effacing ») au niveau du LEE 5.



(a)- Adhésion initiale d'une souche EHEC (représentée en rose) aux microvillosités intestinales (représentées en gris). (b)- Mise en place des composants de la seringue moléculaire (représentée en bleu) du SSTT (système de sécrétion de type III), l'intimine, et son récepteur cellulaire le Tir. (c)- Adhésion intime de la bactérie à la cellule hôte et lésion d'A/E.

Figure 5: Modélisation des trois principales étapes (a, b et c) de l'interaction entre une souche EHEC et un entérocyte aboutissant à la formation d'une lésion d'attachement et d'effacement (A/E) (LOUKIADIS, 2007).

II-4-Epidémiologie des affections liées aux EHEC

Les premiers EHEC sont apparus en 1982 lors de deux épidémies de colites hémorragiques sévères, aux Etats-Unis (Oregon puis Michigan), après la consommation de hamburgers insuffisamment cuits provenant d'une chaîne de restauration rapide. Une souche d'*Escherichia coli* d'un nouveau sérotype O157:H7 a été mise en évidence dans les selles des malades et dans la viande de bœuf d'où provenaient les hamburgers.

Plusieurs épidémies importantes dues aux EHEC sont survenues notamment à Washington en 1993 liées à la consommation de hamburgers avec 501 malades, 45 SHU et 3 décès, en Ecosse en 1996 liées à de la viande de bœuf avec 137 malades et 10 décès ou encore au Japon en 1996 liée à des radis blanc avec 9451 malades et 12 décès. Aussi, les EHEC sont considérés dans les pays industrialisés comme pathogènes émergents en santé publique.

Récemment, en France, deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été détectées, une première en décembre 2000, liée à *E. coli* O157:H7 (10 cas) (HAEGHEBAERT et al., 2002) et une seconde en juin 2002, liée à *E. coli* O148:H8, incriminant de la viande de mouton (ESPIE et LECLERC, 2003). De plus, 2 épidémies de SHU ont eu lieu en 2005, elles avaient une origine alimentaire (steak haché congelé et fromage au lait cru) (VERNOZY-ROZAND et al., 2003).

Au Sénégal, à l'état actuel des connaissances, aucun cas d'EHEC n'a été déclaré.

II-4-1- Réservoir

Les ruminants et notamment les bovins sont considérés à l'heure actuelle comme le réservoir principal d'EHEC. Néanmoins, ces bactéries ont été retrouvées dans l'intestin de nombreuses autres espèces animales (porcs, chevaux, petits ruminants, volailles, chiens, chats, mouettes, cerfs...). Le portage et l'excrétion de souches EHEC par les ruminants domestiques sont, le plus souvent, asymptomatiques, ce qui ne facilite pas le dépistage des animaux porteurs de souches EHEC qui peuvent alors entrer dans la chaîne alimentaire (**LOUKIADIS, 2007**).

II-4-2-Mode de transmission

Les principaux modes de transmission des infections à EHEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins) (**GRIFFIN et al., 2000**) (**figure 6**).

II-4-2-1-Transmission alimentaire

La consommation d'aliments contaminés est la voie principale de transmission. Parmi les aliments contaminés on peut citer :

- des produits carnés : principalement de la viande de bœuf, mais aussi des produits transformés à base de porc ou de la viande de cerf (**VAILLANT et ESPIE, 2002**) ;
- du lait et des produits laitiers non pasteurisés (**ALLERBERGER et al., 2001**) ;
- des légumes crus (salade, radis, etc.) (**BREUER et al., 2001**) ;
- du cidre et du jus de pommes non pasteurisés (**HILBORN et al., 2000**).

La consommation d'aliments contaminés de manière croisée à partir de viande de bœuf hachée crue, notamment lorsque le personnel de cuisine ne se lave pas les mains après avoir touché la viande, a aussi été rapportée (**NATARO et KAPER, 1998**).

II-4-2-2-Transmission inter- humaine

La transmission de personne à personne s'effectue par voie oro-fécale, les épidémies faisant intervenir une transmission de personne à personne sont confinées dans les établissements de soins aux jeunes enfants, aux personnes âgées et aux personnes présentant des déficiences physiques ou mentales à cause des pratiques d'hygiène individuelle moins développées qu'en population générale. La très faible dose infectante peut faire craindre un fort taux de

transmission de personne à personne parmi les cas sporadiques (**PARRY et SALMON, 1998**).

II-4-2-3-Transmission hydrique

La consommation d'eau de puits, d'eau douce privée et d'eau de distribution non traitées ainsi que l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignade dans un lac ou toute autre étendue d'eau (y compris les piscines) ont été à l'origine de cas d'infections humaines dues aux EHEC (**CAPRIOLI et al., 2005**).

II-4-2-4-Contact avec les animaux et leur environnement

Le contact direct avec des animaux de ferme ou avec leurs déjections peut être à l'origine de cas isolés, sporadiques ou d'épidémies. En Suède, en 1997, une exploitation laitière a été impliquée dans un cas d'infection à STEC. La même souche a été isolée sur un échantillon fécal de la personne malade et des bovins. La visite occasionnelle de fermes a été associée à de nombreux cas d'infections sporadiques à O157 en Angleterre (**O'BRIEN, 2001**).

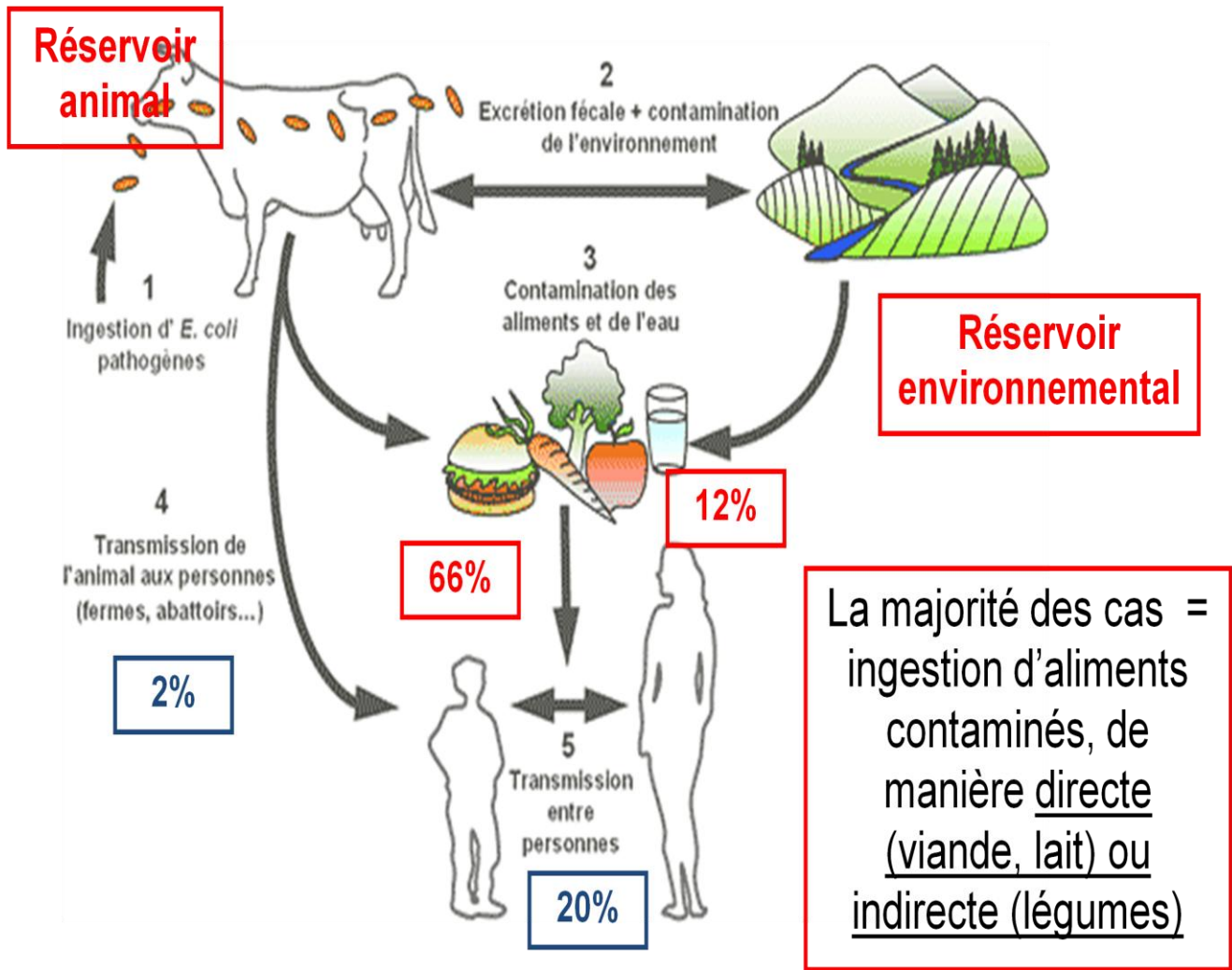


Figure 6 : Epidémiologie des EHEC, transmission directe et indirecte

Chapitre III : RESISTANCE DES *E. COLI* AUX ANTIBIOTIQUES

III-1-Définition de la résistance bactérienne : La résistance bactérienne se définit comme la capacité d'une bactérie à croître ou de survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant. Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance et suivant son caractère inné ou acquis, on distingue la résistance naturelle de la résistance acquise. La résistance naturelle est programmée sur le génome et constante à l'intérieur du taxon ; elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce. Les résistances acquises sont quant à elles consécutives à des modifications de l'équipement génétique.

III-1-1-La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est essentiellement due à la présence de gènes chromosomiques ; elle est donc commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle peut être due à des particularités structurales s'opposant à l'action de l'antibiotique sur sa cible comme la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif les rendant naturellement résistantes aux antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides.

III-1-2-La résistance acquise

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition « de novo » de gènes de résistance exogènes. La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'évènements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaines leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu.

III-2-Mécanismes de résistance aux antibiotiques

III-2-1-Mécanismes biochimiques

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques aussi bien par la destruction de la molécule que par la modification de structures particulières (porines) aboutissant à minimiser la pénétration de l'antibiotique ou même à le rejeter (pompes d'efflux actif). L'échappement est obtenu par modification de la cible de l'antibiotique le rendant inopérant par défaut de substrat.

III-2-1-1-Modification de la perméabilité de la membrane externe

L'imperméabilisation est un phénomène observé chez les bactéries à Gram négatif. La structure même de leur paroi et plus particulièrement la présence d'éléments dédiés à la pénétration de molécules exogènes est à l'origine de ce type de résistance. Les structures en cause sont les porines qui sont des glycoprotéines trimériques et transmembranaires permettant le passage de molécules hydrophiles au travers de la bicouche lipidique.

III-2-1-2-Modification de la cible ou substitution

Ce mécanisme de résistance se traduit par une diminution de l'affinité entre la cible et son antibiotique consécutive à la modification de ladite cible. Ce mode de résistance touche plusieurs classes d'antibiotiques et notamment les β lactamines, les quinolones et les macrolides. Il s'agit là d'une résistance par échappement puisque l'antibiotique n'est ni soustrait ni détruit mais simplement rendu inefficace.

III-2-1-3- Synthèse d'enzymes d'inactivation de l'antibiotique

Elle se traduit par la destruction de la molécule ou en son inactivation supprimant ainsi l'interaction avec sa cible. C'est l'expression d'enzymes spécifiques d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques qui permet leur destruction ou leur modification. Ce mode de résistance est très répandu dans le monde bactérien et touche essentiellement les lactamines (qui produisent les lactamases).

III-2-1-4- Efflux actif de l'antibiotique

Les systèmes d'efflux actifs sont constitués de protéines transmembranaires capables de transporter activement du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur une variété de substrats suivant le type de pompe impliquée. La protéine d'efflux enchâssée dans la membrane interne est responsable de la prise en charge du substrat et constitue l'élément de pompage actif du système en couplant l'entrée de proton à l'évacuation du toxique. Les autres parties jouent essentiellement le rôle de canaux permettant d'évacuer les substrats vers le milieu extérieur. Cependant, la membrane externe des bactéries à Gram négatif s'oppose à la pénétration de grosses molécules ou de molécules hydrophobes nocives, elle constitue également un obstacle pour les systèmes d'efflux de ces bactéries (**THOMAS, 2011**).

III-2-2- Mécanismes Génétiques

III-2-2-1-Supports génétiques de la résistance

III-2-2-1-1-Les chromosomes

Comme tous les procaryotes, les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui est le support de l'information génétique. L'ADN chromosomique est constitué d'une double hélice d'ADN circulaire. Cette double hélice est pelotonnée, surenroulée dans le cytoplasme grâce à l'action des topoisomérases (au nombre de 4 chez les bactéries). Déplié, le chromosome bactérien a près de 1 mm de long (1000 fois la longueur de la bactérie) et 3 à 5 nanomètres de large.

Les deux chaînes de nucléotides se répliquent selon le schéma de Watson et Crick, chaque chaîne assurant la répllication de la chaîne complémentaire selon un mode semi-conservatif. L'analyse chimique de l'appareil nucléaire indique qu'il est composé à 80 % d'ADN (le chromosome), à 10 % d'acide ribonucléique ou ARN et à 10 % de protéines. Les constituants de l'appareil nucléaire sont la cible d'action de plusieurs antibiotiques : les quinolones inhibent les topoisomérases et les rifamycines inhibent les ARN polymérases, tandis que les nitromidazolés entraînent la fragmentation de l'ADN chez les anaérobies stricts.

III-2-2-1-2- Les plasmides

Les plasmides sont définis comme étant des structures d'ADN double brin, circulaire et autonome du chromosome bactérien par rapport à leur contrôle et leur répllication. Leur taille varie de quelques kilobases à quelques centaines de kilobases. Ils peuvent être transférés horizontalement par conjugaison ou mobilisation, entre bactéries de même espèce ou non. Ce sont les éléments du génome les plus mobiles.

Contrairement à la mutation qui conduit à la résistance à un seul antibiotique, le plasmide peut véhiculer la résistance à plusieurs antibiotiques à la fois.

III-2-2-1-3- Le transposon

C'est un gène mobile, appelé gène « sautant », codant pour une résistance aux antibiotiques et qui possède des séquences d'insertion et la capacité de se transférer d'un plasmide vers le chromosome, d'un chromosome vers un autre chromosome ou d'un plasmide vers un autre plasmide. Il peut véhiculer plusieurs gènes de résistance. Il ne peut pas se répliquer mais code pour des éléments de transposition. La transposition étant un phénomène qui consiste à additionner des gènes de taille définie au sein du chromosome bactérien ou du plasmide.

III-2-2-1-4-Les intégrons

Systèmes d'éléments génétiques capables d'acquérir ou de perdre des gènes. Ils ne se répliquent pas mais constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes.

Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique de site. Les intégrons sont véhiculés par un chromosome, un plasmide, ou un élément transposable (**KERN-BERNAIBOUT, 2006**).

III-2-2-2-Mécanisme d'acquisition de la résistance aux antibiotiques

III-2-2-2-1- Mutation

La mutation est un changement, spontané ou provoqué par un agent mutagène, héréditaire (stable), brusque (discontinu), rare (10^{-6} à 10^{-9}) et indépendant dans les caractères d'une bactérie, et qui est lié à une modification du génome bactérien (ADN).

III-2-2-2-2-Conjugaison

Elle consiste en une transmission de plasmides de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Lors de la conjugaison, la bactérie donneuse (F+) va synthétiser des pili, qui vont lui permettre de s'arrimer à une bactérie receveuse (F-). Le plasmide F va ensuite être répliqué sous forme de simple brin, et la copie transférée vers la bactérie receveuse. Longtemps considéré comme un canal de transfert, le pili serait maintenant vu comme une première étape d'arrimage, avant que les deux bactéries ne se rapprochent et que le transfert s'effectue par accollement des membranes. L'ADN simple brin transféré est ensuite transformé en double brin. Un double crossing-over permet d'intégrer les exogènes

homologues dans le génome de la bactérie receveuse. L'ADN exogène linéaire après cet épisode ne peut se maintenir dans la bactérie, et finira par être dégradée.

III-2-2-2-3-Transduction

Dans la transduction, le vecteur est un bactériophage. En se répliquant, le virus intègre son ADN à celui de la bactérie. Lorsqu'il quitte la bactérie, il emporte avec lui cet ADN contenant parfois quelques gènes de résistance. Comme le bactériophage infecte bon nombre de bactéries, il transmettra les gènes de résistance à d'autres bactéries. La transduction est efficace mais seulement pour des souches de bactéries très ressemblantes.

On parle de conversion lysogénique lorsque l'acquisition par une bactérie d'un caractère somatique particulier est déterminée par le génome d'un prophage spécifique. Son expression dans toutes les bactéries est liée à l'état lysogène. Il disparaît avec la perte du prophage.

III-2-2-2-4- La Transformation

La transformation permet l'acquisition et l'intégration d'ADN nu. Cet ADN « libre » peut provenir d'une bactérie morte par exemple. L'ADN nu est à l'extérieur de la bactérie et est alors capté par celle-ci. Une fois capté, l'ADN est incorporé à l'ADN de la bactérie et pourra être transmis par la suite. Si des gènes de résistance étaient présents dans l'ADN nu, ces gènes pourront eux aussi être transmis. Ce mécanisme est peu répandu mais il permet un brassage génétique entre des bactéries qui sont très différentes (**FOURNIER, 2003**).

III-3-Mise en évidence de la résistance par l'Antibiogramme

L'antibiogramme a permis de déterminer in vitro la sensibilité des souches d'*E. coli*. C'est une méthode rapide, très utilisée et qui correspond à une mise en contact, dans une boîte de pétri, de la souche bactérienne avec des disques imprégnés des différents antibiotiques supposés être efficaces sur la bactérie, d'après son spectre théorique de résistance. La diffusion des antibiotiques dans la gélose entraîne une inhibition de la culture de la bactérie plus ou moins importante selon les antibiotiques. On mesure le diamètre d'inhibition autour du disque, et on se réfère à des tables qui permettent de supposer que la souche sera : "sensible" ou "résistante" à l'antibiotique étudié, s'il est donné à doses habituelles, ou : "intermédiaire" c'est-à-dire sera "sensible" si on augmente les doses (**FLUIT et VISSER., 2001**).

III-4 -Prévalence de la résistance des *E. coli* aux antibiotiques dans le monde

Ces dernières années, dans le monde entier, l'antibiorésistance a pris des proportions inquiétantes. Pour comprendre ce phénomène et tenter d'y apporter des solutions, des études ont été menées un peu partout dans le monde. C'est ainsi que la résistance aux antibiotiques de 101 isolats d'*E. coli* pathogènes isolés au Bangladesh a été déterminée par diffusion en gélose Mueller-Hinton par **HASSAN et al., (2011)**. Les résistances les plus fréquemment observées étaient contre : la tétracycline (45,5%), le triméthoprime-sulfaméthoxazole (26,7%), et l'ampicilline (25,7%).

En France, **MARTEL et al., (1983)** ont isolé des souches d'*E. coli* à partir de fèces de bovins par la méthode de dilution étalement sur différents milieux gélosés. Les résultats obtenus montrent des niveaux de résistance très élevés qui dépassent 50% pour l'ensemble des souches d'*E. coli* étudiées vis à vis de l'ampicilline, la streptomycine, la kanamycine, le chloramphénicol, la tétracycline; et les sulfamides.

Par ailleurs, **OUBRIM et al., (2012)** ont montré que sur un total de 63 souches d'*E. coli* (O26, O128, O111, O157 isolées des eaux brutes épurées et des cultures au Maroc par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Les pourcentages les plus importants de résistance ont été détectés chez les *E. coli* O157 avec 50% à la Triméthoprime/Sulfaméthoxazole, 50% à l'Ampicilline et 25% à la Tétracycline, alors qu'aucune résistance n'a été observée chez les souches d'*E. coli* O26 et O128 vis à vis de la céfotaxime et de la céftazidime.

En outre, plusieurs études ont démontré que près de 75% des *E. coli* résistant à l'Ampicilline étaient également résistants à la Streptomycine et la Tétracycline (**SCHROEDER et al., 2002**).

C'est dans le but de vérifier la présence de souches potentiellement EHEC dans les effluents d'abattoir de Dakar et de la station d'épuration urbaine de Cambérène, de les caractériser afin de préciser leur importance en terme de santé publique, puis d'évaluer leur sensibilité aux antibiotiques que nous avons entrepris cette étude. Elle fait l'objet de la deuxième partie de notre travail.

Deuxième partie : Etude expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et méthodes

I-1- Contexte de l'étude

Dans les pays en voie de développement confrontés à la sécheresse, l'augmentation des quantités d'eaux usées urbaines rejetées en rapport avec l'accroissement des villes se présente comme une alternative assez intéressante pour résoudre le problème de la disponibilité en eau d'irrigation. C'est ainsi que, l'utilisation d'eaux usées en agriculture est une pratique de plus en plus répandue au Sénégal, en particulier dans la zone périurbaine de Dakar, où la culture pluviale ne peut se faire sur une longue période. Par ailleurs, les infrastructures d'assainissement, dans des villes à urbanisation galopante, n'arrivent pas à suivre les besoins. A partir des usines, des ménages, des marchés, des hôpitaux, etc. Les eaux usées débouchent dans les rues, les lits de rivières, les canaux d'eaux pluviales ou dans des stations d'épuration à faible capacité de traitement. C'est généralement autour de ces eaux usées, plus ou moins stagnantes, que les sites de maraichage sont créés, par des populations pauvres des zones périurbaines et/ou immigrantes des campagnes. La pratique de l'utilisation de toutes sortes d'eaux usées s'y opère alors de manière non planifiée et non contrôlée dans les activités d'agriculture urbaine, incluant l'arrosage de légumes consommables crus. La principale préoccupation de la réutilisation des eaux usées est d'ordre sanitaire, liée à la survie des germes pathogènes dans ces eaux. En effet, les eaux usées transportent toutes sortes d'organismes pathogènes (Niang, 1996). Les *Escherichia coli* sont parmi les pathogènes retrouvés dans ces eaux usées et sont considérés à l'heure actuelle comme des pathogènes émergents en Santé publique. Les différents pathovars de colibacilles décrits chez l'homme sont également présents dans différentes espèces animales où ils font souvent l'objet d'un portage asymptomatique. L'excrétion humaine et animale peut expliquer la contamination de l'environnement incriminée dans différentes épidémies. La valorisation agricole par épandage des effluents et des boues de station d'épuration peut participer à l'entretien du cycle épidémiologique des *E. coli* pathogènes. La contamination des eaux superficielles est alors une source potentielle non négligeable de contamination de l'homme. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé nos travaux de recherche au laboratoire national d'Etudes et de Recherches Vétérinaires au sein de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (LNERV-ISRA) en collaboration avec l'unité mixte de recherche (UMR) INRA-ENVT 1225 « Interaction hôte-Agents Pathogènes » située à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Ce travail permettra d'aider à développer des méthodes originales de prédiction du risque lié à l'existence d'*E. coli* potentiellement pathogènes dans les effluents des stations d'épuration et dans l'environnement. Il devra permettre également d'aider à formuler des

recommandations en matière de surveillance et d'analyse de la qualité microbiologique des effluents et en matière de gestion des effluents des stations d'épuration.

I-2- Caractéristiques des sites d'étude

L'étude a été réalisée à l'abattoir de bovins de Dakar et à la station d'épuration urbaine de Cambérène.

I-2-1- Les abattoirs de Dakar

Les abattoirs de Dakar sont les plus grands abattoirs au Sénégal, le seul lieu d'abattage à Dakar permettant la mise sur le marché des chairs d'animaux (bovins, ovins, caprins et porcins) parce qu'ils constituent le seul établissement garantissant un contrôle vétérinaire exhaustif des animaux à leur entrée et leur sortie. Ils comportent une salle d'abattage pour les bovins (abattoir de bovins), une salle pour les ovins et les caprins, une salle pour les porcins et à côté de cette dernière, est aménagé un local pour l'abattage des chevaux qui est l'espèce faiblement exploitée destinés à nourrir les animaux sauvages au niveau des parcs zoologiques. Ils traitent majoritairement les bovins (environ 74 % du tonnage annuel), les ovins (environ 19 % du tonnage annuel) et en quantité moindre les porcins (environ 1 % du tonnage annuel). Les abattoirs sont de moyenne capacité et se caractérisent par un tonnage annuel de 10 tonnes. La consommation moyenne en eau du site s'élève à environ 150 m³/j. Les abattoirs ne sont pas équipés d'un système de prétraitement ni de traitement des eaux usées. Tous les déchets d'abattage (liquide physiologique et eau pour les taches de nettoyage) sont déversés directement dans le système de canalisation qui débouche sur la baie de Hann au niveau de la mer de Yarah. Seule la partie solide du contenu gastrique est recalée afin de protéger les ouvrages en aval de l'arrivée de gros éléments susceptibles de provoquer des bouchages dans les unités de l'installation. Cette partie est utilisée dans l'épandage en culture maraichère.

I-2-2- La station d'épuration urbaine de Cambérène

La station d'épuration a une capacité de production d'eau brute de 5 300 m³ par jour. Elle reçoit les eaux des ménages, des effluents des hôpitaux et les eaux des pluies mais pas celles des abattoirs. Cette eau traitée est utilisée dans l'irrigation des productions horticoles, le terrain de golf du technopole et fournie en eau dans la moindre mesure certaines entreprises. Les boues issues du traitement sont valorisées, séchées, recyclées et revendues en compost à des associations agricoles locales. Dans une autre mesure, la filière de traitement des boues

par digestion permet de produire du biogaz (méthane) qui alimente un groupe électrogène qui procure à la station de l'électricité à 30 % ; ce qui favorise l'économie d'énergies fossiles.

Durant cette étude, des prélèvements ont été réalisés durant le mois d'Août 2011 aussi bien à l'abattoir qu'à la STEP pour l'isolement des souches d'*Escherichia coli*.

I-3- Démarche expérimentale

La démarche expérimentale qui a été adoptée lors de notre étude est schématisée dans la **Figure 7**.

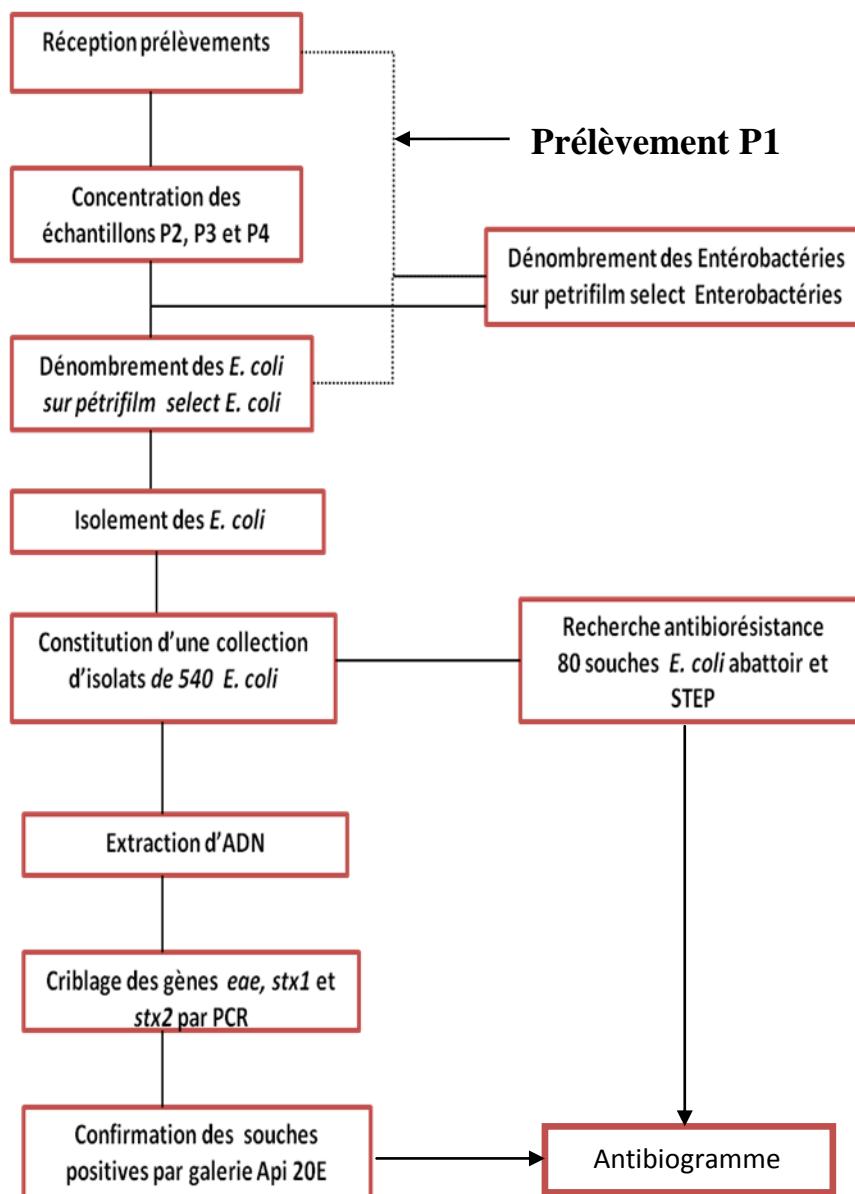


Figure 7 : Schématisation de la démarche expérimentale

I-3-1- Réalisation des prélèvements d'effluents

Au niveau des abattoirs de Dakar, les prélèvements ont été effectués à un seul point appelé P1 : Eaux usées provenant de l'abattoir des bovins. Et pour mieux cibler la période de forte activité de l'abattoir, les séances de prélèvements ont été réalisées le matin entre 8h et 10h et un volume d'environ 10 litres est recueilli directement dans des bidons stériles et transféré au laboratoire national d'Etudes et de Recherches Vétérinaires au sein de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (LNERV-ISRA) dans un conteneur avec des carbo-glaces.

A la station d'épuration urbaine (STEP), les prélèvements ont été réalisés à trois niveaux :

- Prélèvement P2 à l'entrée de la STEP: effluent brut dessablé (EBD) ;
- Prélèvement P3 après traitement physique: eau clarifiée (EC) ;
- Prélèvement P4 après chlorification : Rejet Final (RF).

Pour chaque point de prélèvement, un volume de 10 litres a été recueilli et transféré au laboratoire dans les mêmes conditions que le prélèvement P1 de l'abattoir.

I-3-2- Dénombrement et isolement de souches d'*E.coli*

I-3-2-1- Concentration des prélèvements

5000 ml (5 litres) d'échantillons ont été recueillis en P2, P3 et P4. Ils ont été traités le jour même de leur prélèvement. Les échantillons ont tout d'abord subi une étape de concentration par centrifugation à 10 000 tours pendant 10 minutes. Les culots bactériens ont ensuite été mis en suspension dans 5ml de diluant tryptone. Ainsi les échantillons P2, P3 et P4 ont été concentrés mille fois . Par contre les 5000 ml (5 litres) d'échantillons recueillis en P1, n'ont pas été concentrés.

Remarque : les échantillons P2, P3, P4 concentrés (1000 fois) et P1 constituent les solutions mères.

I-3-2-2- Dénombrement bactérien

Des dilutions décimales des suspensions bactériennes des solutions mères ont été réalisées etensemencées sur pétrifilms select Entérobactéries (Pétrifilm 3M) pour le dénombrement des Entérobactéries et sur pétrifilm select *E. coli* (Pétrifilm 3M) pour le dénombrement des *E. coli*. Les pétrifilms select *E. coli* ont été incubés à 42°C pendant 18 à 24 heures et les pétrifilms select Entérobactéries à 37°C pendant 18 à 24 heures.

I-3-3-3- Constitution d'une collection de souches

Pour chacun des trois prélèvements P1, P2 et P3, 1 ml des dilutions permettant d'avoir de colonies bien isolées a été ensemencé sur pétrifilms select *E. coli* 3M. Après une incubation de 18 à 24 heures à 42°C, les colonies issues de chaque prélèvement ont été repiquées à l'aide des cures dents stériles dans des plaques de 96 puits contenant 150µL de bouillon Luria Bertani (LB) bouillon. Les plaques sont incubées de nouveau pour permettre aux *E. coli* de pousser. Enfin, 30% de glycérol ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été conservées à -80°C.

I-3-3-4- Recherche des souches de E.coli porteuses des gènes eae, stx1 et stx2

Compte tenu des faibles prévalences des gènes attendus, nous avons procédé par pool pour le criblage des gènes associés aux EHEC. Tout d'abord la recherche des gènes a été effectuée par demi-plaque de 96 puits (dans lesquels sont conservées les souches de *E. coli*), puis sur toutes les colonnes des demi-plaques positives et enfin sur tous les puits des colonnes positives. Le but est d'éliminer les souches négatives et de limiter le nombre de manipulations.

a) Screening par ½ plaque (une ½ plaque contient 6 colonnes et une colonne 8 puits)

Les plaques sont poolées par ½ plaque. 20µl de suspension bactérienne sont prélevés dans chaque puits de la demi-plaque ce qui permet d'obtenir une suspension bactérienne de 960µl (20µl X 8 X 6 = 960 µl). La suspension bactérienne est répartie dans 3 tubes eppendorfs. Ainsi, sont mis dans les tubes :

- Tube 1 : 320µl de suspension bactérienne + 6µl de suspension de souche témoin positif (sakai)
- Tube 2 : 320µl de suspension bactérienne + 6µl de témoin négatif (MG1655)
- Tube 3 : 320µl de suspension bactérienne + 6µl de milieu LB

Sur ces échantillons sont réalisées les opérations suivantes:

- Extraction d'ADN à la soude

L'extraction de l'ADN a été effectuée par lyse alcaline. Après incubation pendant 18 à 24 heures à 37°C, la suspension bactérienne a été centrifugée à 12 000 tr/min à 4°C pendant 5 minutes. Après aspiration du surnageant, 25 µL de NaOH à 0,5 mol/L ont été ajoutés dans les tubes. Nous avons laissé agir la soude pendant 20 minutes et avons rajouté 25 µL d'acide chloridrique (Tris) à 1mol/L et 450 µL d'eau distillée.

- Recherche des gènes *eae*, *stx1* et *stx2* par PCR multiplex

La réalisation de la PCR a nécessité la préparation d'une solution mère ou master-mix dont les différents composants sont représentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Préparation du Mix

Réactifs	Concentration Initiale	Concentration Finale	1 réaction
Tampon	10X	1X	5µL
dNTP	100mM/l (chacun)	0.2mM (chacun)	0.4µL (pool)
Primers (6)	100mM	1mM	0.5µL/primer
Taq pol	5U/µl	1U/50µl	0.2µL
Eau			36.4µL
ADN	20 à 50µg/ml	0.2 à 0.5µg/ml	5µL

Les séquences d'amorces utilisées pour la recherche des gènes (*eae*, *stx1* et *stx2*) sont confinées dans le **Tableau 4** et les caractéristiques des souches de contrôle positive et négative sont représentées dans le **Tableau 5**.

Tableau 4 : Les couples d'amorces utilisées

Gènes cibles	Amorces sens et anti-sens	Produit PCR (pb)	référence
<i>eae</i>	<i>eae</i> AF : GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	Paton & Paton, 1998
	<i>eae</i> AR : CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>stx1</i>	<i>stx1</i> F : ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	
	<i>stx1</i> R : AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>stx2</i>	<i>stx2</i> F : GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	
	<i>stx2</i> R : TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		

Tableau 5 : Les souches utilisées comme témoins positif et négatif

Souche	Pathotype	Sérotype	Facteurs de virulence d'intérêt	Référence
MG1655 (témoin négatif)	<i>E.coli</i> K-12	Orough : H48	-	U00096
SAKAI (témoin positif)	EHEC	O157 : H7	<i>eae, stx1, stx2</i>	(Hayashi,T., <i>et al.</i> ,2001)

La PCR a été réalisée selon des cycles de températures appropriés suivant un gradient et qui sont représentés à l'**Annexe 1**.

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

❖ Préparation du gel d'agarose

La préparation d'un gel d'agarose à 2.5% a été réalisée selon la procédure suivante :

- ✓ Mettre 5 pastilles (AGATABS-EUROGENTEC) de 0.5g d'agarose chacune dans 100ml de TAE (Tris, Acétate, EDTA) (1x molaire)
- ✓ Laisser dissoudre complètement les pastilles
- ✓ Introduire la solution dans le micro-ondes
- ✓ Chauffer pendant 1mn, puis 30 secondes et enfin 30 secondes
- ✓ Laisser la solution se refroidir
- ✓ Verser le tout dans la plaque d'électrophorèse une fois les peignes placés (permet l'obtention de puits) et laisser reposer environ 1 heure pour que le gel se solidifie.

❖ Réalisation de l'électrophorèse

Les échantillons à tester ainsi que les contrôles positif et négatif, ont été préalablement mélangés à 2µl de bleu de bromophénol (tampon de charge 6x molaire). Ainsi, le premier puits du gel a reçu 10µl de solution de 100 paires de bases (marqueur de poids moléculaire 1Kb (Biolabs) servant de repère à la lecture) à laquelle le bleu de bromophénol (tampon de charge) était mélangé. Les deux puits suivants, ont reçu chacun, 10µl d'échantillon d'amplicons des contrôles positif et négatif ensuite les puits suivants, ont reçu chacun 10µl d'échantillon d'amplicons à tester. La migration électrophorétique des échantillons d'ADN

s'est faite sous un voltage constant de 50V pendant environ 45min. Le gel ainsi obtenu est plongé dans du bromure d'éthidium (BET) (Promega) à 2mg/l pendant environ 15min. Enfin le gel est lu au chemidoc par lumière UV, un échantillon est positif à un gène lorsqu'une bande claire apparaît sur sa zone de migration et lorsque cette bande se situe sur la même ligne que celle de la bande du contrôle positif (celle-ci est repérée grâce au marqueur de poids moléculaire).

Sur les ½ plaques donnant un résultat positif pour au moins un des gènes, un screening colonne est réalisé.

b) Screening par colonne (une colonne comprend 8 puits)

40µl de suspension bactérienne sont prélevés par puits, on obtient ainsi (40µl x 8 = 320µl) de suspension bactérienne. Une extraction d'ADN est réalisée sur cette suspension suivie d'une PCR. Sur les colonnes donnant un résultat positif pour au moins un des gènes, un screening puits est réalisé.

c) Screening par puits

10µl de chaque puits sontensemencés dans du milieu LB. Les bouillons sont incubés 24h à 37°C sous agitation. Ensuite, une extraction d'ADN est réalisée suivie d'une PCR.

d) Confirmation par Galerie API 20E

Sur les puits ayant donné un résultat positif, pour au moins un des gènes recherchés, une gélose LB estensemencée à partir du puits et incubée pendant 24h à 37°C. A partir d'une colonie, une galerie API 20E estensemencée afin de vérifier si la souche étudiée est bien un *E.coli*.

e) Confirmation des gènes de virulence :

Les colonies confirmées *E. coli* par galerie API 20E ont été cultivées en bouillon liquide LB. Après extraction de l'ADN nous avons pu confirmer par PCR les gènes de virulence précédemment retrouvés.

I-3-3- Réalisation de l'Antibiogramme

En plus des souches possédant au moins un des gènes recherchés (*eae*, *stx1*, *stx2*), la résistance aux antibiotiques a été étudiée sur 40 souches d'*E.coli* isolées de l'abattoir et 40 souches d'*E. coli* isolées de la station d'épuration urbaine.

Les antibiogrammes ont été effectués selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2006). Nous avons utilisé un milieu gélosé non sélectif de Mueller-Hinton. Afin de cibler les principales familles d'antibiotiques, 16 disques d'antibiotiques (Biorad) ont été utilisés: ampicilline (10 µg), amoxicilline (20 µg) + acide clavulanique (10 µg), céfalotine (30 µg), céfuroxime (30 µg), céfotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), céfépime (30 µg), chloramphénicol (30 µg), gentamicine (10 µg), kanamycine (30 µg), streptomycine (10 µg), acide nalidixique (30 µg), ciprofloxacine (5 µg), sulfonamides (300 µg), triméthoprim (5 µg). L'interprétation des résultats a été réalisée selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2007) et la souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme contrôle.

I-3-3-1- Préparation de l'inoculum

Un milieu gélosé non sélectif (Mueller Hinton) a été ensemencé avec la souche de référence et les souches à tester. Pour chaque souche, quelques colonies ont été mises en suspension dans du NaCl 0.9%. La suspension a été ajustée de manière à obtenir une suspension d'une densité équivalente au standard McFarland 0.5 (ce qui correspond à environ 10^8 UFC/ml).

I-3-3-2- Ensemencement de l'inoculum

Une gélose Mueller-Hinton a été ensemencée à partir de la suspension précédemment obtenue à l'aide d'un écouvillon stérile. L'étalement a été répété quatre fois de chaque côté de la boîte carrée afin d'obtenir une distribution homogène de l'inoculum. L'application des disques se fait 3 à 5 minutes après l'ensemencement.

I-3-3-3- Dépôt des disques chargés d'antibiotiques et incubation

Les 16 disques d'antibiotiques ont été déposés sur la gélose avec un applicateur. Les disques ne doivent pas être déplacés après leurs dépôts car certains antibiotiques diffusent immédiatement après contact. Sur la gélose ensemencée, nous avons placé les disques de céfotaxime et de ceftazidime autour du disque de l'amoxicilline + acide clavulanique. Ce test « double-disk synergy test » permet de détecter les souches productrices de β -lactamases à Spectre Elargi (BLSE) (Drieux *et al*, 2008). Les géloses ont été incubées 16 à 18 heures à $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Après incubation, les diamètres d'inhibition ont été mesurés. Les valeurs seuils pour chaque antibiotique et les diamètres de la souche de contrôle ATCC 25922 sont issus de la guideline Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth information supplement, CLSI, M100-S17, vol. 27 n°1, 2007.

I-3-3-4- Traitement des données

Les données de la résistance aux antibiotiques des souches isolées de l'abattoir et de la STEP ont été saisies sur le support informatique Excel, puis organisées et regroupées par catégories avant d'être analysées. L'analyse a été réalisée grâce au logiciel R (R.2.13.0) qui a permis de déterminer les différences significatives par le test χ^2 de Fisher ($\alpha=5\%$).

Chapitre II : Présentation des résultats

II-1- Résultats du Dénombrement des Enterobacteries et *E. coli*

Un dénombrement des Entérobactéries et des *E.coli* avait été réalisé sur les prélèvements de l'abattoir, de l'effluent brut de la STEP, de l'eau clarifiée et du rejet final après traitement pour déterminer la charge des Entérobactéries et des *E.coli* pour chacun de ces prélèvements. Les résultats sont présentés dans le (Tableau 6). La charge en *E. coli* est 2 fois plus élevée dans l'effluent de l'abattoir que dans l'effluent brut de la STEP. Une absence de souches *E.coli* a été notée dans l'effluent traité correspondant au rejet final (P4) de la STEP. La suite des résultats ne va concerner que les effluents à partir desquels les souches d'*E. coli* ont été isolées.

Tableau 6: Dénombrement des Enterobacteries et *Escherichia coli* en fonction du site de prélèvement

Sites de prélèvements	Groupes de Bactéries	
	Enterobacteries (UFC/ml)	<i>E. coli</i> (UFC/ml)
Abattoir (P1)	$2. 10^7$	$3. 10^6$
Effluent brut (P2)	$5,5. 10^7$	$1,5. 10^6$
Eau clarifiée (P3)	$2. 10^3$	$1,1. 10^2$
Rejet final (P4)	$3. 10^5$	0

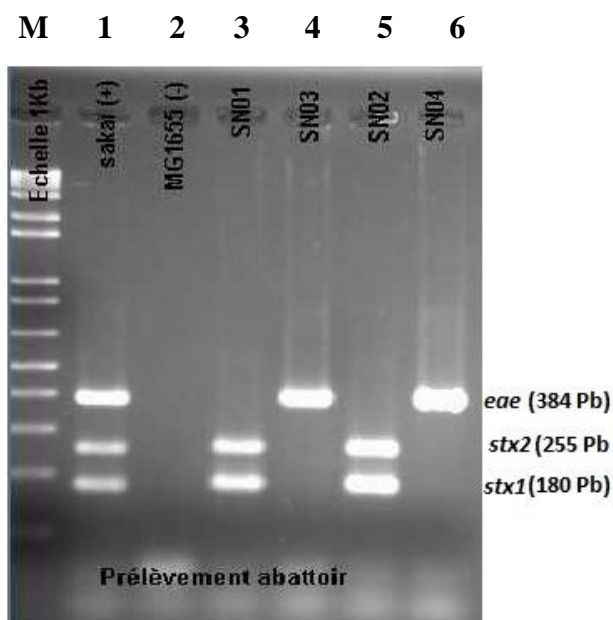
Une collection de 540 souches d'*E.coli* a été constituée à partir de 268 souches d'*E. coli* isolées à l'abattoir, 183 souches d'*E. coli* de l'effluent brut de la STEP et 89 souches d'*E. coli* de l'eau clarifiée de la STEP (Tableau 7).

Tableau 7: Isolement des souches d'*E. coli*

Sites de prélèvements		Nombre de souches <i>E. coli</i> isolées
Abattoir (P1)		268
Station d'épuration (STEP)	Effluent brut (P2)	183
	Eau clarifiée (P3)	89
Total		540

II-2- Résultats de criblage des gènes *eae*, *stx1* et *stx2*

Dans toute la collection de 540 souches d'*E. coli*, on n'a trouvé que 4 souches d'*E. coli* provenant de l'abattoir qui exprimaient au moins un des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* associés aux EHEC. Les souches SN03 et SN04 exprimaient le gène *eae* et les souches SN01 et SN02 exprimaient en association les gènes *stx1* et *stx2* (voir **Figure 8**). Par contre au niveau de la STEP, aucune des souches isolées portait un gène associé aux EHEC. La prévalence des gènes était de 0.7% au niveau de l'abattoir (**Tableau 8**).



M: marqueur de poids moléculaire; puits 1: contrôle positif (souche sakai); puits 2 : contrôle négatif (souche MG1655); puits 4 et 6 échantillons positifs au gène *eae*; puits 3 et 5 échantillons positifs aux gènes *stx2* et *stx1*.

Figure 8 : Image de l'électrophorèse des souches d'*E.coli* isolées de l'abattoir porteuses de gènes associés aux EHEC.

Tableau 8: Prévalence des gènes associés aux EHEC en fonction des sites de prélèvements

Gènes associés aux EHEC	Sites de prélèvements		Total (N=540)
	Abattoir (n=268)	Station d'épuration (n= 272)	
<i>eae</i>	2 (0.7)	0 (0)	2 (0.4)
<i>stx1</i>	2 (0.7)	0 (0)	2 (0.4)
<i>stx2</i>	2 (0.7)	0 (0)	2 (0.4)

n= nombre de souches d'*E.coli* isolées pour chaque type de prélèvement et (% de souches identifiées porteuses de gènes associés aux EHEC). N= total des souches d'*E. coli* isolées dans les 2 sites de prélèvements.

Tableau 9: Caractéristiques des souches d'*E.coli* porteuses de gènes associés aux EHEC

code souches	codes Biochimiques	Gènes	Antibiotypes
SN01	5144572	<i>stx1/stx2</i>	S
SN02	5144572	<i>stx1/stx2</i>	S
SN03	5044573	<i>eae</i>	S
SN04	5144572	<i>eae</i>	S

S=sensible

II-3- Résultat de l'antibiogramme

Sur le total des 80 souches d'*E.coli* isolées dont 40 souches de l'abattoir et 40 souches à la station d'épuration urbaine, nous avons effectué des antibiogrammes dans le but de déterminer leur résistance phénotypique vis-à-vis de 16 antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire. L'**Annexe 2** présente la proportion de souches résistantes. Nous avons observé un plus grand pourcentage de souches résistantes à l'ampicilline (23 %), ensuite viennent la tétracycline (18 %), les sulfonamides (14%), le triméthopime (14%), la streptomycine (10%), l'amoxicilline +acide clavulanicque (7%) et la céphalotine (7%). En revanche, aucune souche n'était résistante à la céfépime qui est une céphalosporine de quatrième génération, ni aux céphalosporines de troisième génération que sont la céfotaxime et la ceftazidime, de plus, aucune n'était résistante à la céfuroxime (céphalosporine de deuxième génération) et à la gentamicine. Autrement dit, la résistance a été observée seulement avec des céphalosporines de 1^{ère} génération.

En comparant les sites de prélèvement, le plus grand nombre de souches résistantes a été retrouvé au niveau de la station d'épuration urbaine (23 souches résistantes à la STEP contre 7 souches à l'abattoir). Des différences significatives ont été observées entre la STEP et l'abattoir pour certains antibiotiques : Ampicilline (42% contre 15%), tétracycline (42.5% contre 2.5%), les sulfonamides (35% contre 0%), triméthopime (32.5% contre 2.5%) et streptomycine (22.5% contre 2.5%).

Les quatre souches d'*E. coli* détectées à l'abattoir et porteuses de gènes associés aux EHEC, étaient toutes sensibles aux 16 antibiotiques testés (**Tableau 9**).

Les souches multi-résistantes ont été observées en majorité au niveau de la station d'épuration urbaine avec 35% de souches résistantes à au moins 4 antibiotiques. Par contre, le nombre de souches d'*E.coli* provenant de l'abattoir et résistantes à 3 antibiotiques était supérieur à celui de souches d'*E.coli* provenant de la station d'épuration (17.5% contre 2.5%) (**Tableau 10**).

Tableau 10: Profil de résistance des souches d'*E. coli* selon les sites de prélèvements

Sites de prélèvements	Profil de résistance				
	S	R1	R2	R3	R4
Abattoir(n=40)	33 (82.5)	3 (7.5)	1 (2.5)	3 (17.5)	0 (0)
STEP (n=40)	17 (42.5)	7 (17.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	14 (35)
P-value	< 0.005	NS	NS	NS	< 0.005

S : nombre de souches d'*E. coli* sensibles

R1: nombre de souches d'*E. coli* résistantes à un antibiotique

R2: nombre de souches d'*E. coli* résistantes à deux antibiotiques

R3: nombre de souches d'*E. coli* résistantes à trois antibiotiques

R4: nombre de souches d'*E. coli* résistantes à plus de trois antibiotiques

Chapitre III : Discussion et Recommandations

Les *E. coli* ont longtemps été considérés comme de simples bactéries commensales du tractus digestif des mammifères. Cependant, grâce à leur multiplication rapide et la plasticité de leurs génomes, certaines souches sont capables de devenir pathogènes par acquisition de facteurs de virulence. Ceci est facilité par la présence dans leur génome des éléments génétiques mobiles (îlots de pathogénicité, séquences d'insertion, prophages, plasmides conjugatifs...). Les *E. coli* peuvent également jouer un grand rôle dans la dissémination communautaire et environnementale de la résistance aux antibiotiques.

a) Dénombrement bactérien et importance du traitement des eaux usées

Le traitement biologique au niveau de la STEP de cambéréne a permis d'éliminer totalement les *E. coli* au niveau du rejet final. Cette absence de souches d'*E. coli* au niveau du rejet final de la station d'épuration urbaine peut s'expliquer par l'efficacité du traitement effectué. On peut aboutir à de tels résultats (absence de souches d'*E. coli* au niveau du rejet final) quand il s'agit d'une potabilisation de l'eau destinée à la consommation humaine. Cependant au niveau des STEP, le traitement mis en place vise généralement à diminuer la charge microbienne des effluents avant leur rejet dans l'environnement. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus en France par **Vernozy-Rozand et al., (2002)** dont (6/10) soit 60% des souches STEC isolées des effluents des élevages et des stations d'épurations urbaines étaient retrouvées dans les effluents traités et rejetés dans le milieu extérieur. Cette différence observée pourrait se justifier par la diversité des méthodes de traitement des eaux usées utilisées d'une station d'épuration à une autre et la destination de cette eau traitée.

Des études réalisées en France par **LOUKIADIS (2007)** sur des effluents issus des stations d'épuration de plusieurs abattoirs de moyenne capacité montrent que le traitement a permis un abattement de 2 log de la population totale d'*E. coli* entre l'entrée et la sortie de la STEP (Communication personnelle). Cela montre l'importance du traitement des effluents avant leur rejet dans le milieu extérieur, ce qui permet de diminuer la charge microbienne. Alors que les effluents d'abattoir de Dakar sont rejetés directement sans traitement par un système de canalisation sur la baie de Hann au niveau de la mer de Yarah. Ainsi les résultats du dénombrement des effluents d'abattoir montrent un rejet de $3 \cdot 10^6$ *E. coli* (UFC/ml) au niveau de l'environnement. Ce qui peut s'expliquer par l'absence d'un système de traitement au sein de l'abattoir.

b) Criblage des gènes *eae*, *stx1* et *stx2*

Pour rechercher les gènes de virulence *eae*, *stx1* et *stx2*, étant donné leur faible prévalence lors d'une étude précédente réalisée en France par LOUKIADIS *et al.*, (2006) ayant établi la prévalence apparente de la contamination des effluents issus des abattoirs de moyenne capacité à 1,3%, Il semblait plus judicieux de commencer par un screening par 1/2 plaque suivi d'un screening colonne puis d'un screening puits,

Par ailleurs, nous avons choisi la PCR multiplex plutôt que la PCR quantitative car avec cette dernière on n'aurait pas pu remonter à la souche et le coût aurait été trop élevé.

Enfin, le choix des amorces s'est fait en fonction des régions conservées des gènes recherchés. En effet, l'amorce pour le gène *eae*, s'hybride au niveau de la région 5' du gène qui est une région très conservée. Les amorces pour *stx1* et *stx2* s'hybrident au niveau de la sous unité A de la toxine, région conservée, et permet de mettre en évidence tous les variants de *stx2*.

Des souches d'*E.coli* porteuses de gènes *stx* ou *eae* ont été retrouvées dans 0.7% (4/540) des prélèvements effectués. Cependant ces souches d'*E.coli* proviennent toutes de l'abattoir soit 1.5% (4/268) des prélèvements réalisés à l'abattoir. En 2007, LOUKIADIS a trouvé des prévalences faibles (25% (55/224) de souches d'*E.coli* porteuses de gènes *stx* ou *eae* dans une étude portant sur 12 abattoirs en France. Dans notre étude, le réservoir animal (abattoir) avait une prévalence plus élevée que le réservoir humain (STEP) dont aucune souche porteuse de gènes associés aux EHEC n'a été trouvée. Ce résultat vient confirmer le portage des EHEC par les animaux notamment les bovins rapporté par plusieurs études.

Sur l'ensemble de la collection, la seule association de gène trouvée est celle entre *stx1* et *stx2*. Les souches exprimant le gène *eae* seul sont appelées AEEC et les souches exprimant les gènes *stx* sont dénommées STEC. Il n'y a pas eu d'association *eae/stx* caractéristique des EHEC typiques majeurs.

Force est de constater que la présence de ces souches d'*E.coli* porteuses de ces gènes de virulence associés aux EHEC au sein de la population d'*E.coli* des effluents de l'abattoir pourrait favoriser par transfert horizontal de gènes l'émergence de souches potentiellement pathogènes pour l'homme.

c) l'Antibiorésistance

Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés chez les souches d'*E.coli* d'origine humaine provenant de la station d'épuration urbaine avec l'ampicilline (42.5%), la tétracycline (42.5%), les sulfonamides (35%) et triméthoprime (32.5%). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (HASSAN *et al.*,2011) dont les travaux effectués sur 101 isolats d'*E.coli* testés par la méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton ont permis de déterminer des niveaux de résistance assez élevés à la tétracycline (45,5%), au triméthoprime-sulfaméthoxazole (26,7%) et à l'ampicilline (25,7%).

L'importante résistance des souches d'*E.coli* d'origine humaine au triméthoprime-sulfaméthoxazole peut s'expliquer par le fait que l'association triméthoprime et sulfamides est fréquemment recommandée en médecine humaine pour traiter une large gamme d'infections par exemple les infections urinaires. De même, la résistance élevée à la tetracycline peut s'expliquer par l'utilisation accrue de cet antibiotique à large spectre en thérapie infectieuse humaine.

Par ailleurs, les plus faibles niveaux de résistance ont été observés chez les souches d'*E.coli* de l'abattoir avec la kanamycine (2.5%), la streptomycine (2.5%) puis la tétracycline (2.5%) et le triméthoprime (2.5%). Ces résultats s'opposent à ceux obtenus par MARTEL *et al.*, (1981) en France qui ont obtenu des niveaux de résistance très élevés qui dépassent 50% pour l'ensemble des souches d'*E. coli* d'origine bovine étudiées vis-à-vis de l'ampicilline, la streptomycine, la kanamycine, le chloramphénicol, la tétracycline et les sulfamides.

Nous avons remarqué une sensibilité des souches aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et céftazidime). Par conséquent les chances de trouver des souches productrices de bêta-lactamase à spectre étendu étaient minimes. Nos résultats corroborent ceux obtenus par OUBRIM *et al.*, (2012) qui révélaient l'absence de résistance à la céfotaxime (0%), la céftazidime (0%) chez 33 souches d'*E.coli* O26 et O128 isolées des eaux brutes épurées et des Cultures au Maroc. La faible résistance des souches d'*E.coli* aux céphalosporines pourrait s'expliquer par le coût assez élevé de ces derniers ce qui limiterait leur prescription dans les milieux hospitalier et vétérinaire. Par contre, la résistance observée avec la céfalotine (céphalosporine de première génération) est décrite dans plusieurs études.

Par ailleurs, l'analyse du profil de résistance des souches d'*E.coli* (Tableau 10) a révélé une multirésistance élevée des souches isolées de la station d'épuration urbaine par rapport à celles de l'abattoir : 14 souches d'*E.coli* (35%) de la station d'épuration urbaine étaient résistantes à plus de 4 antibiotiques et le profil de résistance le plus répandu est l'association

entre l'Ampicilline, la Streptomycine et à la Tétracycline. Nos résultats confirment ceux obtenus par (Schroeder et al., 2002) dont près de 75% des souches d'*E. coli* résistantes à l'Ampicilline étaient également résistantes à la Streptomycine et à la Tétracycline. Cette multirésistance observée chez les souches d'*E.coli* de la station d'épuration urbaine pourrait s'expliquer par un échange de gènes de résistance spécifiques à ces antibiotiques par le biais de plasmides qui diffusent au sein de la population de bactéries. Toutefois, soulignons l'importance des intégrons qui sont des promoteurs d'échanges de gènes et constituent des facteurs déterminants pouvant transmettre la résistance aux antibiotiques.

La faible résistance des souches d'*E.coli* isolées de l'abattoir vis-à-vis de ces antibiotiques pourrait s'expliquer par l'utilisation très limitée des antibiotiques dans les élevages bovins extensifs au Sénégal. Autrement dit, dans le système extensif les éleveurs ne font pas recours systématiquement à la thérapie médicamenteuse et utilisent le plus souvent des connaissances traditionnelles, même si cette tendance se renverse progressivement. A l'inverse, nous observons un haut niveau de résistance aux antibiotiques des souches d'*E.coli* isolées des animaux d'élevage en Europe notamment en France, où non seulement les antibiotiques sont utilisés à des fins thérapeutiques mais aussi à titre prophylactique ou comme facteur de croissance.

La présence de souches d'*E. coli* porteuses de gènes associés aux EHEC au niveau de l'abattoir et le pourcentage élevé de résistance aux antibiotiques de celles isolées à la station d'épuration urbaine, nous amènent à formuler les recommandations suivantes pour limiter leur dissémination dans l'environnement.

❖ Au niveau des abattoirs

- Nettoyer des locaux par une désinfection des aires de stabulation au niveau de l'abattoir ;
- Respecter les bonnes pratiques d'hygiène pour éviter la contamination de la viande par les matières fécales durant le processus d'abattage ;
- Chauler le fumier et le lisier avant leur utilisation pour réduire la concentration des *E. coli* potentiellement pathogènes dans les matières fécales ;
- Effectuer un suivi de la contamination des effluents de l'abattoir dans le temps par ces souches d'*E.coli* potentiellement pathogènes pour l'homme afin d'identifier les périodes à risque ;
- Mettre en place un système de traitement des effluents de l'abattoir avant leur rejet dans l'environnement ;

- ❖ Dans les hôpitaux et structures de santé
 - Equiper les hôpitaux des systèmes de traitement primaire des eaux usées avant leur rejet dans les circuits communaux ;
 - Réduire et utiliser rationnellement les antibiotiques en médecine humaine ;

- ❖ Au niveau de la STEP ou de l'environnement
 - Mettre en place une surveillance périodique de l'antibiorésistance des *E.coli* dans l'environnement ;

Conclusion Générale

Les souches d'*E. coli* ont longtemps été considérées comme de simples commensaux du tractus digestif des mammifères. Cependant, grâce à leur multiplication rapide et la plasticité de leurs génomes, certaines souches sont capables de co-évoluer avec leurs hôtes et d'échapper à leurs mécanismes de défense. Ces propriétés expliquent en grande partie l'émergence régulière de nouvelles souches pathogènes (pathovars) ayant acquis par échange génétique des facteurs de virulence portés par des éléments génétiques mobiles (îlots de pathogénicité, séquences d'insertion, prophages, plasmides conjugatifs...). Ces éléments génétiques sont aussi le support de gènes de résistance aux antibiotiques.

Les différents pathovars d'*E. coli* décrits chez l'homme sont également présents dans différentes espèces animales où ils font souvent l'objet d'un portage asymptomatique.

Parmi ces pathovars, les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont considérés à l'heure actuelle comme des pathogènes émergents en Santé Publique. Depuis 1982, ils ont souvent été incriminés lors d'épidémies de colites hémorragiques et de Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU). Les EHEC possèdent un arsenal de facteurs de virulence dont la liste et le rôle exacts restent à déterminer. Les deux protéines majeures impliquées dans leur pouvoir pathogène sont d'une part l'intimine, codée par le gène *eae* et responsable de lésions intestinales, et d'autre part les Shiga-toxines codées par les gènes *stx1* ou *stx2* et capables de provoquer la mort des cellules intestinales, vasculaires et rénales.

En outre, l'utilisation des antibiotiques chez les animaux, parallèlement à leur usage en médecine humaine, participe à la pression de sélection favorisant l'émergence de bactéries porteuses de gènes de résistance au niveau de la flore du tube digestif des animaux. Les souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques d'origine animale sont potentiellement présentes dans les effluents. Plusieurs études ont montré la présence d'*E. coli* résistants à divers antibiotiques dans les effluents de STEP et des abattoirs. Ces souches participent à l'entretien du cycle épidémiologique des souches résistantes aux antibiotiques et peuvent potentiellement être transmises à l'homme.

La station d'épuration de Cambérène reçoit les eaux des ménages, des effluents des hôpitaux et les eaux des pluies. Cette eau traitée est utilisée dans l'irrigation des productions horticoles, le terrain de golf du technopole et de fournir en eau dans la moindre mesure certaines entreprises. Les boues issues du traitement sont valorisées, séchées, recyclées et revendues en compost à des associations agricoles locales.

Contrairement à la STEP, les abattoirs ne sont pas équipés d'un système de traitement ni de prétraitement des eaux usées. Tous les déchets d'abattage (liquide physiologique et eau pour les tâches de nettoyage) sont déversés directement sur la baie de Hann au niveau de la mer de Yarah.

Dans notre étude, le dénombrement des *E. coli* dans les effluents a été réalisé par pétrifilm select *E. coli*. La PCR multiplex a été la technique adoptée pour la recherche des principaux gènes de virulence (*eae*, *stx1* et *stx2*) associés aux EHEC. Elle a été effectuée sur la collection de 540 souches d'*E.coli* dont 268 souches à l'abattoir, 183 souches de l'effluent brut de la STEP et 89 souches de l'eau clarifiée de la STEP. L'étude de l'antibiorésistance par la méthode de diffusion sur gélose a été réalisée sur les souches porteuses de gènes associés aux EHEC et sur 80 souches d'*E.coli* isolées dont 40 souches à l'abattoir et 40 souches à la station d'épuration urbaine.

Les résultats du dénombrement d'*E. coli* (UFC/mL) par Pétrifilm select *E. coli*, ont révélé que la charge en *E. coli* est deux fois plus élevée dans l'effluent de l'abattoir (3.10^6 UFC/mL) que dans l'effluent brut de la STEP ($1.5 \cdot 10^6$ UFC/mL). En plus, au niveau du rejet final de la STEP aucune souche de *E. coli* n'a été détectée.

Le criblage par PCR conventionnelle des gènes de virulence (*eae*, *stx1* et *stx2*) associés aux EHEC, montre la présence d'*E. coli* exprimant les gènes de virulences étudiés uniquement au niveau de l'abattoir. Et parmi les 268 souches d'*E. coli* isolées de l'abattoir, 4 (1.5%) souches portaient au moins un des gènes *eae*, *stx1* et *stx2* dont 2 souches d'*E. coli* exprimaient le gène *eae* et 2 souches d'*E. coli* exprimaient en association les gènes *stx1* et *stx2*. La prévalence globale était très faible 0.7%.

Par ailleurs, l'étude de l'antibiorésistance montre que la STEP hébergeait un grand nombre de souches résistantes. Les 57.5% des souches isolées de la STEP étaient résistantes dont 60.8% à 4 antibiotiques. Le nombre de souches résistantes au niveau des abattoirs était faible 17.5% comparé à la STEP. Les souches porteuses des gènes de virulences associés aux EHEC sont toutes sensibles aux antibiotiques testés.

Les résultats ont montré une efficacité du traitement des eaux usées de la STEP qui a éliminé les souches d'*E. coli* du rejet final. Les eaux issues de l'abattoir contiennent des souches d'*E. coli* potentiellement pathogènes pour l'homme qui sont rejetées dans la baie de Hann au niveau de la mer de Yarah. Toutefois, aucune souche porteuse à la fois des gènes *eae* et *stx* représentant les EHEC typiques n'a été détectée dans les effluents d'abattoir. Par ailleurs

nous avons constaté que les souches isolées à la STEP étaient plus résistantes aux antibiotiques que celles de l'abattoir.

En perspective, il sera intéressant de réaliser le typage du gène *eae*, ce qui nous permettra de caractériser l'origine humaine (*eae-α*) ou animale (*eae-β*) des souches d'*E.coli*. Il sera aussi intéressant de rechercher la présence du gène *bfp* (bundling forming pili) des souches *eae*-positives qui est le marqueur des *E. coli* Entéropathogènes (EPEC). Les EPEC sont responsables le plus souvent de diarrhées sévères chez les enfants dans les pays en voie de développement. Par ailleurs, la recherche des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques sera utile dans le but d'une caractérisation plus fine de ces souches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET WEBOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

1. **Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme, 2002.** *Maisons-Alfort* : AFSSA.- 122; 1p.
2. **Allerberger F., Wagner M., Schweiger P., et al., 2001** *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill*, **6**: 147-151.
3. **Anonyme, 2007.** "Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types." *The EFSA Journal*, **579**: 1-61.
4. **Breuer T., Benkel D. H., Shapiro R. L. et al., 2001.** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis* **7**:977-982.
5. **Caprioli A., Morabito S., Brugère H. et Oswald E., 2005.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, **36**: 289-311.
6. **Characklis w. et Marshall K., 1990.** Biofilms. – **New York**: *John Wiley and Sons* Ed. 796 p.
7. **Centre Regional pour l'Eau Potable et l'Assainissement., 2002.** Atelier International sur la Réutilisation des eaux usées en agriculture urbaine : un défi pour les municipalités en Afrique de l'Ouest et du Centre. Ouagadougou, : CREPA. p. 112-124.
8. **Croxen M. A., et Finlay B. B., 2010.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:26-38.
9. **Donnenberg M. S., Tzipori S., McKee M. L., et al., 1993.** The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**:1418-1424.

10. **Escherich T., 1885.** Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr Med* **3** :515-554.

11. **Espié, E., et Leclerc V., 2003.** Epidémiologie humaine des STEC. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), *Maisons-Alfort: AFSSA.*- p. 61-80.

12. **Euzeby J.P.,** 12 Juin **2007** 1998-2007,posting date .Dictionnaire de bacteriologie vétérinaire.

13. **FLUIT A.C. et VISSER M. R., 2001.-** Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.*, **14** (4) : 836 - 871

14. **Fonds national pour le développement des adductions d'eau, 2007.** Le traitement du carbone et de l'azote pour des stations d'épuration de type boue activée confrontées à des fortes variations de charge et à des basses températures. Document technique:Lyon., **34** (2):10 p.

15. **FOUNIER V., 2003.** – La résistance bactérienne aux antibiotiques. *Pistes / Université de Laval.*- 31p.

16. **Frankel G., Philips A. D., M. Novakova M. B., et al., 1998.** Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol Microbiol* **29**:559-570.

17. **Greatorex J.S., et Thorne G.M., 1994.** Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* **32**:1172-1178.

18. **Griffin P., Mead P., Van Gilder T., et al., 2000.** Shiga Toxin-producing *E. coli* infections in the United States : current status and challenges. In 4th International Symposium and Workshop on "Shiga-toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections (october 29-November 2, 2000) Kyoto, Japan.

19. **Grimont P.A.D., 1987.** Taxonomie des *Escherichia*. *Med Mal Infect* :6-10.

20. **Guivarch A., 2001.** Valeur fertilisante à court terme du phosphore des boues de stations d'épuration urbaines. Thèse : Agro : Institut National Polytechnique de Lorraine: 33p.
21. **Haeghebaert S., Vaillant V., Bouvet P., et Grimont, F., 2002** Surveillance du syndrome hémolytique et urémique, chez les enfants de moins de 15 ans, en France en 2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **29/2002**: 145-148.
22. **HASSAN B., FARUQUE R., DROBNI M., WALDENSTRÖM J., SADIQUE A., KABIR UDDIN AHMED K., ISLAM Z., HOSSAIN PARVEZ M.B., OLSEN B, et ALAM M., 2011.-** High Prevalence of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Escherichia coli* from Large- and Small-Scale Poultry Farms in Bangladesh. *Avian Diseases*, **55**(4):689-692.
23. **Herau V., 2003** Risque sanitaire microbiologique lié aux effluents d'abattoirs : comparaison d'une synthèse bibliographique avec une étude de terrain Thèse. : Med. Vet. : Toulouse; **32**.
24. **Hilborn E. D., Mshar P. A., Fiorentino T. R. et al., 2000.** An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiol Infect* **124**:31-36.
25. **Holler C., Koschinsky S. et Witthuhn D., 1999.** Isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from municipal sewage. *Lancet*, 353:2039.
26. **Jakobsen L., Sandvang D., Hansen L. H. et al., 2008.** Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. *Environment international* **34**:108-15.
27. **Jerse A. E., et Kaper J. B., 1991.** The eae gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* **59**:4302-4309.
28. **Junkal Garmendia, et al.,** Infection and Immunity, Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, **73**, : 2573-2585, **2005**.

29. **Kauffmann, F. 1947.** The serology of the *E. coli* group. *Journal of Immunology* **57**:71-100.
30. **Kern-Bernaibout E.M., 2006.-** *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'homme : Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'homme par la contamination de l'environnement. Thèse : Méd. Vét : Toulouse : ENVT
31. **Khallaayoune K. et Cabaret J., 2009.**Traitement et réutilisation des eaux usées : impact sur la santé et l'environnement.- Rabat : Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, 96p.
32. **Lazarova V.** (CIRSEE - Lyonnaise des Eaux) et *al.*, La réutilisation des eaux usées : un enjeu de l'an 2000 ; L'eau, l'industrie, les nuisances, : 39-46.
33. **Landreau A.** 4^e conférence internationale sur la planification et la gestion des eaux , Marseille, p.16, mai **1982**.
34. **Levine, M. 1987.** *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive,enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases* **155**:377-389.
35. **Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis, and M. Karmali. 1987.** Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**:8834-8839.
36. **Loukiadis E., 2007** Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) Thèse:Med.Vet: Toulouse, **7** :185-186.
37. **Martel J.L., Moulin G., Guillot J.F. et Libmann M., 1983** Mise en évidence d'*Escherichia coli* K99+ dans les fèces des vaches et de leurs veaux. *Ann. Rech. Vet.*, **14 (2): 121-127** .
38. **Metcalf et Eddy, 2003** wastewater engineering treatment and reuse. 4^{ème} ed. New York: Mc Graw HiLL Ed., 1819p.

39. **Nataro J. P., et Kaper J. B., 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
40. **Neaves P., Deacon J. et Bell C., 1994.** A survey of the incidence of *Escherichia coli* O157 in the UK Dairy Industry. *Int Dairy J* **4**:679-696.
41. **O'Brien S. J., Adak G.K., et Gilham C., 2001.** Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg Infect Dis* **7** :1049-1051.
42. **O'Brien A., LaVeck G., Thompson M. et Formal S., 1982.** Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**:763-769.
43. **Okrend A. J. G., Rose B. E., et Lattuada C. P., 1990.** A research note : use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-1-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot* **53**:941-943.
44. **Oswald E., et al., 2000** Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* : characterization of a new intimin variant, *Infect Immun* **68**, p.64-71.
45. **Oubrim N., Nozha Cohen., Kaoutar Hajjami. et al., 2012** Détection des Entérocoques Fécaux et *Escherichia Coli* Résistant Aux Antibiotiques Isolés à Partir des Eaux Brutes Épurées et Cultures. *European Journal of Scientific Research, Maroc*; **453-461**.
46. **Parry, S.M., et Salmon, R.L. 1998** Sporadic STEC O157 infection: secondary household transmission in Wales. *Emerg Infect Dis* **4**: 657-661.
47. **Perdrix S., 2002** L'eau dans les abattoirs Agence de l'Eau Artois-Picardie Réunion AFSSA-Paris, thématique « prion et environnement », 13 mars.
48. **Petit K.M.B., 2007.** Actualisation des connaissances Sur les éléments biologiques et minéraux persistants dans les boues des stations d'épuration. Impact sur la santé publique. Thèse : Méd : Faculté de Médecine de Creteil, p. 9-11.

49. **Pradel N., Boukhors K., Bertin Y. et al., 2001.** Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* **67**:2460-2468.
50. **Prado T., W. Pereira C., Silva D. M. et al., 2008.** Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**:136-41.
51. **Public Health Agency Canada (PHAC) 2000.** Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000. *Can Commun Dis Rep* **26**:170-3
52. **Reinthal F. F., Feierl G., Galler H., 2010.** ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water research* **44**:1981-5.
53. **Russo T. A., et Johnson J. R., 2000.** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**:1753-4.
54. **Sayah R. S., Kaneene J. B., Y. Johnson. et al., 2005.** Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples , Human Septage , and Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1394-1404.
55. **Scott C., Naser I. Faruqi et Liqa Raschild-Sally., 2004.** Wastewater Use in Irrigated Agriculture: Confronting the Livelihood and Environmental Realities. Londres: CAB
56. **Schroeder C., Jianghang Meng., Shaohua Zhao. et al., 2002.** White antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O28 and O145 from animals and humans. *Emerging Infectious Diseases*, **8**.

57. **Soraya., 2005.** Etude d'un procédé compact de traitement biologique aérobie d'effluents laitiers. Thèse : *Microbiol* : Toulouse : Institut National des sciences appliquées de Toulouse ; **818.**
58. **Strockbine, N. A., Jackson M. P., Sung L. M., Holmes R. K., et O'Brien A. D., 1988.** Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* **170**:1116-1122
59. **Tesh V. L., Samuel J. E., Perera L. P., Sharefkin J. B., et O'Brien A. D., 1991.** Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J Infect Dis* **164**:344-352.
60. **Thomas G., 2011** Etude épidémiologique des résistances d'*Escherichia coli* BLSE au centre hospitalier de valenciennes en 2006. Thèse, Pharmacie. :Lille 2.
61. **Unc A., M.J. Goss et S. Springthorpe. 2003.** Factors important for the transport and survival of microbes from materials (manure/biosolids) applied to land. Dans « Proceedings of the 2nd Canadian Organic Residuals Recycling Conference ». Tenue à Penticton, C.-B., les 24 et 25 avril 2003, p. 181-199.
62. **Vaillant, V., et Espié E., 2002** Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines chez les enfants âgés de moins de 15 ans. Etude cas-témoins 2000-2001. Saint Maurice: Institut de Veille Sanitaire -.
63. **Vernozy-Rozand C., et al., 2003** AFSSA, Historique et définition des STEC, Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga toxines (STEC),- Paris : AFSSA.
64. **Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Lequerrec F., 2002.** Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *Journal of Applied Microbiology*, **93**:473-478.
65. **Vernozy-Rozand C., Flandrois J. P., Livrelli V. et al., 2001.** *Escherichia coli* Enterohemorragique.- Paris : AFSSA.

66. **Vimont A., 2007.** Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Thèse : Méd : -Lyon 1 ; **26**.
67. **Yang, C. M., M. F. Lin, P. C. Liao, H. W. Yeh, B. V. Chang, T. K. Tang, C. Cheng, C. H. Sung, and M. L. Liou. 2009.** Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**:560-5.

WEBOGRAPHIE

La station d'épuration de Cambérène est une "fierté", selon le ...

www.aps.sn › *Français* › *Environnement* - *En cache* 23 mars **2007** – Dakar, 23 mars (APS) -

La station d'épuration des eaux usées de Cambérène, unique en son genre dans la sous-région, est une fierté pour de ... (page consultée le 15 Février 2012) .

Accès internet : <http://www.aps.sn> (page consultée le 15/02/2012)

ANNEXES

ANNEXE 1 : Cycles de températures (d'après PATON et PATON, 1998)

ETAPES	TEMPERATURES	TEMPS	NOMBRE DE CYCLES
DENATURATION	95°	1'	1 à 10
HYBRIDATION	65°	2'	
ELONGATION	72°	1'30	
DENATURATION	95°	1'	11
HYBRIDATION	64°	2'	
ELONGATION	72°	1'30	
DENATURATION	95°	1'	12
HYBRIDATION	63°	2'	
ELONGATION	72°	1'30	
DENATURATION	95°	1'	13
HYBRIDATION	62°	2'	
ELONGATION	72°	1'30	
DENATURATION	95°	1'	14
HYBRIDATION	61°	2'	
ELONGATION	72°	1'30	
DENATURATION	95°	1'	15 à 25
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	1'30	
DENATURATION	95°	1'	26
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	1'36	
DENATURATION	95°	1'	27
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	1'42	
DENATURATION	95°	1'	28
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	1'48	
DENATURATION	95°	1'	29
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	1'54	
DENATURATION	95°	1'	30
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	2'	
DENATURATION	95°	1'	31
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	2'6	
DENATURATION	95°	1'	32
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	2'12	
DENATURATION	95°	1'	33
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	2'18	
DENATURATION	95°	1'	34
HYBRIDATION	60°	2'	

ELONGATION	72°	2'24	
DENATURATION	95°	1'	35
HYBRIDATION	60°	2'	
ELONGATION	72°	2'30	

ANNEXE 2 : La proportion des souches résistantes

Famille antibiotique	Antibiotiques testés	Codes	Sites de prélèvement		p-value
			Abattoir (n=40)	STEP (n=40)	
β- lactames	Céfotaxime	CTX	0 (0)	0 (0)	-
	Amoxicilline +acide clavulanicque	AMC	2 (5)	5 (12.5)	NS
	Céftazidime	CAZ	0 (0)	0 (0)	-
	Ampicilline	AM	6 (15)	17(42.5)	< 0.05
	Céfalotine	CF	2 (5)	5 (12.5)	NS
	Céfuroxime	CXM	0 (0)	0 (0)	-
	Céfépime	FEP	0 (0)	1 (2.5)	NS
Aminosides	Gentamicine	GEN	0 (0)	0 (0)	-
	Kanamycine	KAN	1 (2.5)	0 (0)	NS
	Streptomycine	STR	1 (2.5)	9 (22.5)	< 0.05
tétracyclines	Tétracycline	TE	1 (2.5)	17(42.5)	< 0.005
Phénicoles	Chloramphénicol	C	0 (0)	1 (2.5)	NS
Sulfonamides	Sulfonamides	SSS	0 (0)	14 (35)	< 0.005
	Trimethoprime	TMP	1 (2.5)	13(32.5)	< 0.005
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	0 (0)	1 (2.5)	NS
Quinolones	Acide nalidixique	NA	0 (0)	5 (12.5)	< 0.05

La différence observée entre les sites de prélèvement est calculée par χ^2 -test of Fisher ($\alpha=5\%$)

NS: pas de différence significative

SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR

« Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, fondateur de l'enseignement vétérinaire dans le monde, je promets et je jure devant mes maîtres et mes aînés :

- ❖ d'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire ;
- ❖ d'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le code de déontologie de mon pays ;
- ❖ de prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire ;
- ❖ de ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.

LE (LA) CANDIDAT (E)

VU
LE DIRECTEUR GENERAL
DE L'ECOLE INTER-ETATS
DES SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR

VU
LE PROFESSEUR RESPONSABLE
DE L'ECOLE INTER-ETATS DES
SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR

VU
LE DOYEN
DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR

LE PRESIDENT
DU JURY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER _____
DAKAR, LE _____

LE RECTEUR, PRESIDENT DE L'ASSEMBLEE
DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR

Résumé

Les *E. coli* enterohémorragiques (EHEC) sont considérés à l'heure actuelle comme des pathogènes émergents en Santé Publique. Depuis 1982, ils ont souvent été incriminés lors d'épidémies de colites hémorragiques et de Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU). Les EHEC possèdent un arsenal de facteurs de virulence dont la liste et le rôle exacts restent à déterminer. Les deux protéines majeures impliquées dans leur pouvoir pathogène sont d'une part l'intimine, codée par le gène *eae* et responsable de lésions intestinales, et d'autre part les Shiga-toxines codées par les gènes *stx1* ou *stx2* et capables de provoquer la mort des cellules intestinales, vasculaires et rénales. Le réservoir principal des EHEC est le tube digestif des bovins. En général, l'homme se contamine à la suite d'ingestion de l'eau ou des aliments contaminés.

Dans le but d'évaluer la prévalence et la dissémination des EHEC dans l'environnement, des prélèvements d'effluents ont été réalisés au niveau de la station d'épuration urbaine de Cambérène (STEP) et à l'abattoir de Dakar. Après le dénombrement des *E. coli* par pétrifilm sélect *E. coli*, une collection de 540 souches d'*E. coli* a été constituée dont 268 souches isolées de l'abattoir, 183 souches de l'effluent brut de la STEP et 89 souches de l'eau clarifiée de la STEP. Un criblage par PCR conventionnelle des gènes de virulence (*eae*, *stx1* et *stx2*) associés aux EHEC a été effectué sur la collection. Par ailleurs, l'étude de l'antibiorésistance par la méthode de diffusion sur gélose a été réalisée sur 40 souches d'*E. coli* isolées de l'abattoir et 40 souches isolées à la station d'épuration urbaine.

Les résultats du dénombrement d'*E. coli* (UFC/ml) ont révélé que la charge en *E. coli* est deux fois plus élevée dans l'effluent de l'abattoir (3.10^6 UFC/ml) que dans l'effluent brut de la STEP ($1.5 \cdot 10^6$ UFC/ml). En plus, au niveau du rejet final de la STEP aucune souche d'*E. coli* n'a été détectée.

Parmi les 268 souches d'*E. coli* isolées de l'abattoir, 4 (1.5%) souches portaient au moins un des gènes *eae*, *stx1* et *stx2* dont 2 souches d'*E. coli* exprimaient le gène *eae* et 2 souches d'*E. coli* exprimaient en association les gènes *stx1* et *stx2*.

L'étude de l'antibiorésistance montre que la STEP hébergeait un plus grand nombre de souches résistantes. Les 57.5% des souches isolées de la STEP étaient résistantes dont 60.8% à 4 antibiotiques. Le nombre de souches résistantes au niveau de l'abattoir était faible (17.5%) comparé à la STEP.

Pour une meilleure gestion du risque lié à la présence de souches d'*E. coli* potentiellement EHEC dans les effluents d'abattoir de Dakar, il serait souhaitable de mettre en place un système de traitement des effluents d'abattoir avant leur rejet dans le milieu extérieur.

Par ailleurs, nous recommandons une utilisation plus raisonnée des antibiotiques en médecine humaine et animale pour limiter la progression de la résistance de ces bactéries.

Mots clés : *E. coli* enterohémorragique-abattoir-station d'épuration urbaine-Sénégal

Auteur : Mohamed Moustapha SARR

E-mail : metvet@hotmail.fr **Tel :** (00221) 33. 954. 73. 99/(00221)77. 150. 67. 80 S/C du Docteur Aldiouma SIDIBE-Pharmacie Thioce-est BP : 203-Mbour (SENEGAL)