

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

**ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR**



Année 2014

N° : 12

**RECHERCHE DES GENES DE VIRULENCE *STX1*, *STX2* ET
EAE DANS LES SOUCHES DE *ESCHERICHIA. COLI*
ISOLEES DE LA VIANDE DE BUFFLE CONGELEE
IMPORTEE AU SENEGAL**

**MEMOIRE DE MASTER QUALITE DES ALIMENTS DE L'HOMME
(QAH)**

SPECIALITE : ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Présenté et soutenu publiquement le 25 Mars 2014 à 15 h à l'EISMV

Par

GAGARA HAMA Haladou

Né le 02 Juillet 1969 à Zinder (Niger)

JURY

PRESIDENT

M. Louis Joseph PANGUI

Professeur à l'EISMV de Dakar

MEMBRES :

M. Bhen Sikina TOGUEBAYE

Professeur à la FST (UCAD)

M. Germain Jérôme SAWADOGO

Professeur à l'EISMV de Dakar

Mme. Coumba Touré KANE

Professeur à l'ESP/UCAD

DIRECTEURS DE RECHERCHE

Mme. Rianatou BADA ALAMBEDJI

Professeur à l'EISMV de Dakar

Dr. Alpha Amadou DIALLO

Chargé de Recherches au LNERV/ISRA

CO-DIRECTEUR DE RECHERCHE

Dr. Khalifa Babacar SYLLA

Maitre Assistant à l'EISMV de Dakar

REMERCIEMENTS :

Je remercie Dieu, le Tout Puissant, le Maître de l'univers, le Détenteur du savoir.

- J'exprime ainsi ma reconnaissance et mes sincères remerciements au Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest (PPAAO/WAAPP-NIGER) qui a financé mes études en Master Qualité des Aliments de l'Homme puis à la Direction des Laboratoires Vétérinaires (DLV) de Niamey et au Ministère de l'Élevage au Niger pour m'avoir désigné à cette formation.
- J'exprime également ma gratitude et mon profond respect à l'ensemble de personnes ayant contribué à notre formation et ayant permis la tenue de ce stage au Laboratoire de HIDAOA/EISMV et de LNERV/ ISRA de Dakar au Sénégal. J'adresse ainsi mes remerciements, pour leur sollicitude et leurs appuis bienveillants :
- Professeur Rianatou BADA ALAMBEDJI, mon Directeur de recherche, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis dans des moments particuliers d'entreprendre les premières étapes de ma formation.
- Dr Alpha A. DIALLO, Chargé de Recherches au LNERV ISRA, mon Co-directeur de recherche, que je veux vivement remercier pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ce travail. Je voudrais aussi le remercier d'avoir toujours trouvé du temps et de nous avoir fait l'honneur de répondre à toutes nos préoccupations en matière de collaborations .
- Dr Khalifa Babacar SYLLA, pour avoir initié, proposé et organisé les travaux en collaboration entre les laboratoires de HIDAOA/EISMV et LNERV/ISRA.
- Professeur Germain Jérôme SAWADOGO, Coordinateur des programmes Masters, à l'EISMV de Dakar, nos remerciements et nos sentiments de gratitude pour l'organisation et le déroulement de cette formation.
- Professeur N. Coumba Touré KANE, à l'École Supérieure Polytechnique (ESP/UCAD). Toute notre reconnaissance à la qualité d'intervention dans la rédaction finale de ce mémoire.
- Professeur Malang SEYDI à l'EISMV de Dakar, les connaissances, le savoir faire et les conseils qu'il nous a toujours transmis sont et resteront précieux pour moi.
- J'exprime ma gratitude à Dr MUSABYEMARIYA Bellancille, M. Amadou Lamine KONE, M. Abdoul Nalla BA, M. Mamadou BALDE, du laboratoire de HIDAOA puis à M. Moussa SENE, du laboratoire de MIPI / l'EISMV, et à Mme Mariam DIOP, Dr Mbaye MBENGUE, Dr. Moustapha LÔ, Dr Mame Nahé DIOUF, Dr Assane Gueye FALL, Dr Fatou TALL LÔ et M. Moussa DIOUF du LNERV/ ISRA, autrement qu'en leur promettant d'agir comme eux avec des étudiants dans ma situation.
- Je remercie chaleureusement tous nos enseignants de l'EISMV de Dakar. A tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ce travail.
- Professeur M. Assane, Dr. ALAMBEDJI et Professeur Namaiwa pour tous les conseils et l'hospitalité dont ils font montre à l'égard des étudiants nigériens.
- Mes parents pour leurs prières, leurs conseils et leurs multiples appuis, vous êtes une richesse inestimable pour moi.

- Ma très chère femme, merci pour le soutien et à toute sa famille.
- Mes camarades et amis pour la convivialité et la chaleur de la vie en communauté dont vous avez fait montre à mon égard.

HOMMAGES A NOS MAITRES ET JUGES

A notre président du jury

Monsieur Louis Joseph PANGUI,

Professeur à l'EISMV de Dakar.

Vous nous faites l'insigne honneur, malgré vos multiples occupations de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde et sincère gratitude.

A notre Maître et Juge,

Monsieur Germain Jérôme SAWADOGO,

Professeur à l'EISMV de Dakar.

Vos qualités humaines et d'homme de science suscitent respect et admiration. Soyez rassuré de notre sincère reconnaissance.

A notre Maître et Juge,

Monsieur Bhen Sikina TOGUEBAYE,

Professeur à la FST (UCAD).

Votre efficacité et votre humilité sans faille, sont sans nul doute, à l'origine de l'admiration que vous suscitez auprès des étudiants. Veuillez accepter nos sincères remerciements.

A notre Maître et Juge,

Mme Comba Touré KANE,

Professeur à l'ESP/UCA.

vous avez corrigé ce travail avec rigueur scientifique. Merci pour toutes ces connaissances que nous avons acquises à vos côtés.

A nos Maîtres Directeurs de recherche,

Madame, Rianatou BADA ALAMBEDI,

Professeur à l'EISMV de Dakar.

Vous nous avez encadré avec beaucoup de rigueur et d'attention. Votre disponibilité et votre application dans le travail ont suscité à notre niveau beaucoup d'admiration. Veuillez trouver ici le faible témoignage de notre reconnaissance et profond respect,

Monsieur Alpha Amadou. Diallo,

PhD, Chargé de Recherches et Responsable de la Cellule de diagnostics et d'analyses au LNERV/ ISRA. Vous nous avez suivi sans faille tout au long de ce travail.

La disponibilité et le sens particulier que vous avez voulu donner à ce travail ont beaucoup contribué à sa valeur scientifique. Merci pour votre simplicité, vos conseils et l'abord facile qui vous caractérisent.

A notre Co-directeur de recherche,

Monsieur Khalifa Babacar SYLLA,

PhD, Maître assistant à l'EISMV de Dakar, qui a eu l'amabilité d'encadrer notre travail, avec une grande disponibilité. En témoigne de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

Résumé

Les *Escherichia coli* sont considérées à l'heure actuelle comme des pathogènes émergents en santé publique. Les *E. coli* pathogènes dériveraient des souches commensales par acquisition successive de facteurs de virulence. Les souches de *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxine (STEC) isolées lors d'infections chez l'homme sont appelées *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC). Les principaux facteurs de virulence des EHEC sont les Shiga-toxines (*stx1* et *stx2*) et le facteur d'adhésion (*eae*). La contamination par ces bactéries résulte principalement de l'ingestion de produits alimentaires d'origine animale et végétale souillés, tels que la viande ou les fromages au lait cru et les légumes.

L'objectif de la présente étude est de rechercher dans la viande de buffle importée, au Sénégal, les gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* associés aux EHEC par PCR. L'étude de la qualité bactériologique a été effectuée sur 100 échantillons de viande en provenance de cinq marchés de Dakar et des Services Vétérinaires du Port et de l'Aéroport (SVPA). La PCR a été réalisée sur 135 isolats des *Escherichia coli* dont 13 isolats des SVPA et 122 isolats des marchés. Les résultats montrent une contamination de la viande de buffle congelée, importée par des entérobactéries, des coliformes et des *E. coli* et une absence de *Salmonella sp.* Les niveaux de contamination des viandes en provenance des marchés et des SVPA par les *E. coli* étaient respectivement $7,67 \times 10^{-2}$ ufc/ml et 5 ufc/ml.

Des 135 isolats de *E. coli* testés par PCR multiplex, 9 isolats portaient au moins un des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* recherchés soit une prévalence globale de 6,66%. La répartition des souches porteuses des gènes de virulence en fonction des marchés était : Sandaga (4/9), Gueule tapée (2/9), Fass (2/9) et Tilène (1/9). Les souches en provenance des SVPA ne portaient pas les gènes de virulence recherchés. Le niveau de contamination microbienne et la présence des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* pourraient être dus aux mauvaises conditions de transport et de manipulation des viandes au niveau des marchés.

Mots clés : *E. coli* Entérohémorragique, gènes *stx1*, *stx2* et *eae*, viande de buffle congelée importée au Sénégal.

Abstract

Actually, *Escherichia coli* were considered as emerging pathogens in public health. Pathogens *E.coli* derived from commensal strains by sequential acquisitions of virulence factors. Shiga- toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated in human infections were then recognized as Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Shiga-toxins (*Stx1* and *Stx2*) encoded by *stx₁* and *stx₂* genes and intimin factor, encoded by *eae gene* are essential EHEC virulence factors. Contamination by these bacteria occurs mainly during consumption of foodstuffs of animal origin and soiled vegetables such as meat or raw dairy cheese and vegetable.

The objective of this present study is to research in frozen buffalo meat, imported in Senegal, virulence factor genes *stx1*, *stx2* and *eae* associated to EHEC using PCR method. Bacteriological quality analysis was made on 100 meat samples collected from five local markets and the Services Vétérinaires du Port et de l'Aéroport (SVPA) in Dakar, Senegal republic. The PCR Assay was carried in 135 *E. coli* isolates of which 13 and 122 isolates respectively from SVPA and markets. Results show contamination by enterobacteria, coliforms and *Escherichia coli* in frozen, imported buffalo meat. While *Salmonella sp.* is, absent. Contamination meat levels of *E. coli* count of markets and SVPA samples were respectively 7.67×10^{-2} and 5 colonies forming units (cfu).

From the 135 tested *E. coli* isolates, 9 isolates harbored at least one gene positive for research virulence genes *stx1*, *stx2* and *eae*: a total prevalence was 6.66%. The distribution of strains harboring virulence genes among markets was Sandaga (4/9), Gueule tapée (2/9), Fass (2/9) and Tilène (1/9). Strains from SVPA did not possess any researched virulence genes. The level of microbial contamination and the presence of genes *stx1*, *stx2* and *eae* may be attributed to poor transport conditions, and poor meat handling at market levels.

Key words: Enterohemorrhagic *E. coli*, *stx1*, *stx2* and *eae* genes, frozen imported buffalo meat in Senegal.

LISTE D'ABREVIATIONS :

ADN	Acide Désoxyribonucléique
A/E	Attachement/Effacement
AEEC	«Attaching and Effacing <i>E. coli</i> »
AFNOR	Association Française de Normalisation
ARN	Acide ribonucléique
BP	Baird Parker
BET	Bromure d'Ethidium
Ca	Calcium
Cu	Cuivre
CEP	Cellule des Études et de la Planification
DAEC	«Diffusely Adherent <i>E. coli</i> »
DIREL	Direction de l'élevage
SVPA	Services sanitaires vétérinaires du Port et de l'Aéroport
EAE	EPEC attachement/effacement
EAEC	« Enteroaggregative <i>E. coli</i> »
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EHEC	«Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> »
EIEC	« Enteroinvasive <i>E. coli</i> »
EISMV	École Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires
EPEC	« Enteropathogenic <i>E. coli</i> »
EPT	Eau Peptonnée Tamponnée
ETEC	« Enterotoxigenic <i>E. coli</i> »
ExPEC	« Extraintestinal Pathogenic » <i>E. coli</i>
FAO	« Food and Agricultural Organization »
Fe	Fer
GIE	Groupements d'Intérêt Économique
GVB	Gélose au Vert Brillant
GB3	Globotriosylcéramique
H	gélose Hektoen
Hela	cellules tumorales du col utérin d'Henrietta lacks
Hep-2	« Human epithelioma pharynx n°2 »
HIDAOA	Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale
IMS	Immuno Magnétique Séparation
ITU	infections du tractus urinaire
K	Potassium
Kda	Kilodalton
Kg	Kilogramme
Kcal	Kilocalorie
LB	Luria Bertani
LEE	« Locus of Enterocyte Effacement »
LNERV	Laboratoire National d'Elevage et de Recherches Vétérinaires
LPS	Lipopolysaccharides

Mda	Mégadalton
MEPA	Ministère de l'Élevage et de la Production Animale
mg	Milligramme
Mg	Magnésium
ml	Millilitre
Mm	Millimètre
Mn	Minute
Mn	Manganèse
N	Azote
NMEC	« Neonatal Meningitis <i>E. coli</i> »
ORFs	« Open Reading Frames »
P	Phosphore
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PDE	Plan National de Développement de L'Élevage
PTT	Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique
PPAAO	programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest
RV	Rapport-Vassiliadis
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
STEC	« Shiga-like Toxin producing <i>E. coli</i> »
<i>Stx</i>	« shiga-like toxine »
TAE	Tris Acétate EDTA
Taq	« <i>Thermophilus aquaticus</i> »
TIAC	Toxi-infections Alimentaires Collectives
Tir	« Translocated intimin receptor »
UFC	Unité Formant Colonie
UPEC	« Uropathogenic <i>E.coli</i> »
UV	Ultra violet
V	Volt
VETEC	« Verotoxin-Producing <i>Escherichia coli</i> »
VRBG	Gélose Biliée Glucosée au cristal Vert et au Rouge Neutre
VRBL	Gélose Biliée Lactosée au cristal Vert et au Rouge Neutre
WAAPP	« West Africa Agricultural Productivity Programme »
XLD	Xylose Lysine Desoxycholate
Z	Zinc

LISTE DE TABLEAUX

Tableau I : Epidémies à EHEC survenues depuis 2004 et publiées dans la littérature internationale.....	12
Tableau II : Évolution des effectifs du cheptel.....	13
Tableau III : Évolution de la production locale de viande et d'abats (en tonnes).....	14
Tableau IV : Évolution des importations contrôlées de viande (en tonnes).....	14
Tableau V : Comparaison de certaines caractéristiques entre la viande Bovine et celle de Buffle (Rocha Loures, 2001).....	15
Tableau VI : Prélèvements de viande de buffle congelée réalisés par site	18
Tableau VII : Collection des souches <i>E. coli</i>	19
Tableau VIII : Préparation d'un Mix.....	20
Tableau IX : les couples d'amorces utilisés.....	20
Tableau XI : Résultats du dénombrement des germes de contamination fécale.....	22
Tableau XII : Représentation des <i>E. coli</i> par classe	22
Tableau XIII : Prévalence des gènes associés aux EHEC en fonction des sites de prélèvement.....	23

LISTE DE FIGURES

Figure 1: Sites de colonisation des <i>Escherichia coli</i> pathogènes.....	4
Figure 2 : Représentation schématique des souches AEEC, EHEC et STEC	6
Figure 3 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (adapté de PRADEL, 2001).....	8
Figure 4 : Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal.....	11
Figure 5 : Analyse comparative des dénombrements au niveau des sites de prélèvement.....	22
Figure 6 : Un gel d'agarose montrant l'amplification des gènes <i>eae</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i>	23

SOMMAIRE

Introduction	1
PREMIERE PARTIE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
Chapitre I. Généralités sur les <i>Escherichia coli</i>	3
I.1. Taxonomie et définition.....	3
I.2. Antigènes et sérotypage :.....	3
I.3. Plasticité génotypique et clonalité de l'espèce <i>E. coli</i>	4
I.4. Commensalité et pathogénicité :.....	4
Chapitre II : Pathovars de <i>E. coli</i> responsables d'infections digestives :	5
II.1. <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC).....	5
II.2. <i>Escherichia coli</i> entéroinvasives (EIEC)	5
II.3. <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (DAEC).....	5
II.4. <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatives (EaggEC, ou EAEC).....	5
II.5. <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes (EPEC)	5
II.6. <i>Escherichia coli</i> enterohémorragiques (EHEC)	5
II.6.1. Les facteurs de virulence associés aux EHEC :.....	5
II.6.1.1. Shiga-toxines (<i>Stx</i>) ou vérotoxines (<i>Vtx</i>) des EHEC.....	6
II.6.1.1.1. Structure des shiga-toxines (<i>Stx</i>)	6
II.6.1.1.2. Les récepteurs Gb3s	7
II.6.1.1.3. Mécanisme d'action des shiga-toxines.....	7
1) Procédé d'internalisation des shiga-toxines.....	7
2) Activation enzymatique et réponses cellulaires,.....	7
II.6.1.2. Les facteurs d'adhésion des EHEC.....	8
II.6.1.2.1. Les fimbriae ou adhésines des EHEC.....	8
II.6.1.2.2. L'intimine.....	8
II.6.1.2.3. Le mécanisme d'attachement et d'effacement.....	8
II.6.2. Manifestations cliniques des infections à EHEC.....	9
II.6.2.1. La colite hémorragique	9
II.6.2.2. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU).....	9
II.6.2.3. Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)	10
II.6.3. Sources et mode de transmission des EHEC.	10
II.6.3.1. Produits d'origine animale	11
II.6.3.2. Produits d'origine non animale	11
Chapitre III : La production des viandes au Sénégal	13
III.1. Le Cheptel national	13
III.2. Production locale contrôlée des viandes au Sénégal	13
III.3. Importations contrôlées de viande	14
III.4. La viande de buffle	15
III.4.1. Les effectifs de buffles :.....	15
III.4.2. Importance nutritionnelle de la viande de buffle	15

III.4.3. Les importations de la viande de buffle au Sénégal	15
III.4.3.1. Commercialisation de la viande de buffle	16
III.4.3.2. Mode de transport	16
III.4.3.3. Distribution	16
III.4.3.4. Conservation	16
1) Économique	16
2) Hygiénique.....	16
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	17
1. Matériel et méthodes	17
1.1. Objectifs de l'étude	17
1.2. Caractéristique des prélèvements :.....	17
1.2.1. Réalisation des prélèvements :	17
1.2.2. Préparation des échantillons	18
1.2.2.1. Dénombrement des germes de contamination fécale :.....	18
1.2.2.2. L'isolement et collection des souches de <i>E. coli</i>	19
1.2.3 Recherche des gènes de virulence associés aux EHEC :	19
1.2.3.1. L'extraction d'ADN	20
1.2.3.2. Amplification des gènes <i>eae</i> , <i>stx1</i> et <i>stx2</i> par PCR multiplex	20
1.2.3.3. Électrophorèse sur gel d'agarose	21
1.2.3.3.1. Préparation du gel d'agarose	21
1.2.3.3.2. Électrophorèse :	21
2. Résultats.....	22
2.1. Résultats du dénombrement :.....	22
2.2. Résultat de la prévalence des gènes de virulence associés aux EHEC	23
3. Discussion – Recommandations	24
3.1. Présence des gènes de virulence <i>stx1</i> , <i>stx2</i> et <i>eae</i> dans la viande de	
Buffle congelée	24
3.2 Recommandations et perspectives.....	26
Conclusion.....	27
Références bibliographiques et webographie.....	29
Annexe1 Fiches d'analyse.....	32

INTRODUCTION

Malgré de nombreux programmes nationaux de développement du secteur de l'élevage, le Sénégal est loin d'être autosuffisant en viande et lait. Chaque année, les importations pour couvrir les besoins de consommation de la population augmentent. Au Sénégal, depuis l'arrêt d'importation des produits avicoles à la suite de la pandémie de grippe aviaire en 2005, l'importation de la viande rouge et particulièrement de la viande de buffle en provenance de l'Inde et du Pakistan a connu une importante augmentation. La viande de buffle est une excellente source de protéines et est très faible en matières grasses, beaucoup de goût et, parfois, à bon prix. De nombreuses femmes se sont converties dans ce commerce de brochettes de viande importée ou de foie dans les gares routières ou les devantures des établissements en raison du prix de vente de la viande importée. Le principal risque de ces viandes est éventuellement la présence de pathogènes responsables des toxi-infections tels que les *Escherichia coli* entérohémorragiques.

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

Les facteurs de virulence des EHEC sont les protéines (*eae*) codées par un îlot de pathogénicité, "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE), impliquées dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement et de la diarrhée et les toxines de Shiga (*stx*) codées par des bactériophages et impliquées dans les syndromes extra-intestinaux. L'incidence croissante du nombre de cas et d'épidémies enregistrées et déclarées depuis 1982 ainsi que la sévérité des formes compliquées de la maladie justifient pleinement l'intérêt accordé à ce pathogène. La maladie est devenue à déclaration obligatoire dans de nombreux pays, aux États-Unis depuis 1994, en Suède, en Allemagne et au Danemark depuis 1998.

Au Sénégal, aucun plan de surveillance des EHEC n'a été mis en place. Le but de cette présente étude est d'évaluer les risques sanitaires liés à la présence des gènes de virulence associés aux EHEC dans la viande de buffle congelée et importée au Sénégal. Pour atteindre cet objectif, les actions suivantes ont été entreprises :

- isoler les souches de *E. coli* présentes dans les échantillons de viande de buffle ;
- rechercher les gènes de virulence des EHEC dans les souches de *E. coli* isolées.

La recherche de ces pathogènes a été couplée au dénombrement des entérobactéries, des coliformes et des *E. coli*. Ces paramètres permettent de juger du niveau de maîtrise de la contamination fécale lors de la préparation de ces viandes dans les établissements d'origine. Le travail comprend deux parties :

- une première partie qui correspond à une synthèse bibliographique sur les *E. coli* pathogènes en particulier les EHEC et la production et l'importation des viandes au Sénégal.
- une deuxième partie expérimentale, traite du matériel et méthodes, présente les résultats qui sont ensuite discutés et suivis de recommandations et conclusion.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Généralités sur les *Escherichia coli*

I.1 Taxonomie et définition

Escherichia coli appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des bacilles à coloration de Gram négatif, non sporulés, anaérobies facultatifs et qui ne possèdent pas d'oxydase. Le genre *Escherichia* compte 5 espèces : *E. coli* (1885), *E. fergusonii* (1973), *E. hermannii* (1982), *E. vulneris* (1982), *E. blattae* (1985). L'espèce *E. coli* est considérée comme un hôte normal, c'est-à-dire commensal, de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. La niche écologique de cette bactérie se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon. Étant donné qu'elle est hautement compétitive dans cet environnement, *E. coli* reste la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans le côlon humain, dans celui d'autres mammifères et des oiseaux. Les souches commensales de *E. coli* sont donc très bien adaptées à une « coexistence pacifique » avec l'hôte.

Cependant, *E. coli* a été mise en cause pour la première fois dans l'étiologie de l'entérite infantile lorsque Théodore Escherich isola ces micro-organismes lors de cas de diarrhée de nourrissons en 1885. Durant les années 1920 et 1930, plusieurs chercheurs essayèrent d'identifier les types spécifiques de *E. coli* responsables des entéropathies, mais aucun progrès significatif ne fut réalisé jusqu'à la mise au point par Kauffmann, dans les années 1940, d'un schéma de sérotypes précis. Ainsi, à partir des années 1950, de nombreuses souches de *E. coli* appartenant à des sérotypes particuliers ont été répertoriées, chez l'homme comme chez l'animal, comme étant des souches pathogènes responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles (Kaper *et al.*, 2004).

Le premier système permettant la reconnaissance et la classification des souches de l'espèce *E. coli* fut la détermination des sérotypes, c'est-à-dire une combinaison de certains antigènes de surface (Kauffmann, 1947).

I.2. Antigènes et sérotypage

L'antigène somatique O définissant le sérotype, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne. L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. L'antigène de surface K est présent de façon inconstante mais bloque l'agglutinabilité de l'antigène O et donc le sérogroupage lorsqu'il est présent. L'identification des antigènes et sérotypes a permis de différencier des souches pathogènes des souches commensales. En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment. L'espèce *E. coli* peut être subdivisée en sérotypes par la combinaison des deux antigènes somatique O et flagellaire H (ex : O157:H7 ou O111:H8), ou sérotypes si l'antigène somatique O seul a été déterminé (ex : O157, O111).

I.3. Plasticité génotypique et clonalité de l'espèce *E. coli*

Escherichia coli est l'une des espèces bactériennes présentant une très forte plasticité génomique. Elle s'adapte entre son habitat primaire, l'intestin des vertébrés, où elle vit comme commensale et son habitat secondaire, l'eau et les sédiments (Savageau *et al.*, 1983). Cette espèce bactérienne peut également se comporter comme un microbe pathogène à localisation intestinale et extra-intestinale chez l'homme et beaucoup d'autres espèces animales. Cette diversité de style de vie est possible grâce à l'instabilité génomique, avec des échanges de gènes par transfert horizontal.

I.4. Commensalité et pathogénicité

Les souches *Escherichia coli* jouent communément le rôle de bactérie commensale. Cependant, l'acquisition et la combinaison de facteurs de virulence chez les souches *E. coli* peuvent entraîner des modifications de leur comportement pouvant occasionner diverses infections telles que des infections intestinales (Levine *et al.*, 1987) ou extra-intestinales. Les *E. coli* à l'origine de maladies intestinales ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes.

Ce premier groupe de pathogènes est subdivisé en 6 pathovars majeurs (Croxen *et al.*, 2010) selon le type de maladie engendrée et les facteurs de virulence associés : les ETEC (*E. coli* Entérotoxigènes), les EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques), les EPEC (*E. coli* entéropathogènes), les DAEC (*E. coli* à adhérence diffuse), les EAEC (*E. coli* entéroagrévatives) et les EIEC (*E. coli* entéroinvasives).

Le deuxième groupe de *E. coli* à l'origine de maladies extra-intestinales (ExPEC) a acquis la capacité de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte, et à se propager dans l'organisme. Il peut induire chez leurs hôtes des infections du tractus urinaire (ITU) : on parle souvent d'UPEC, « Urinary Pathogenic *E. coli* » ; des méningites néonatales : on parle de NMEC, « Neonatal Meningitis *E. coli* » ; ou des septicémies. Ce groupe pose problème autant en médecine humaine qu'en médecine animale (figure 1).

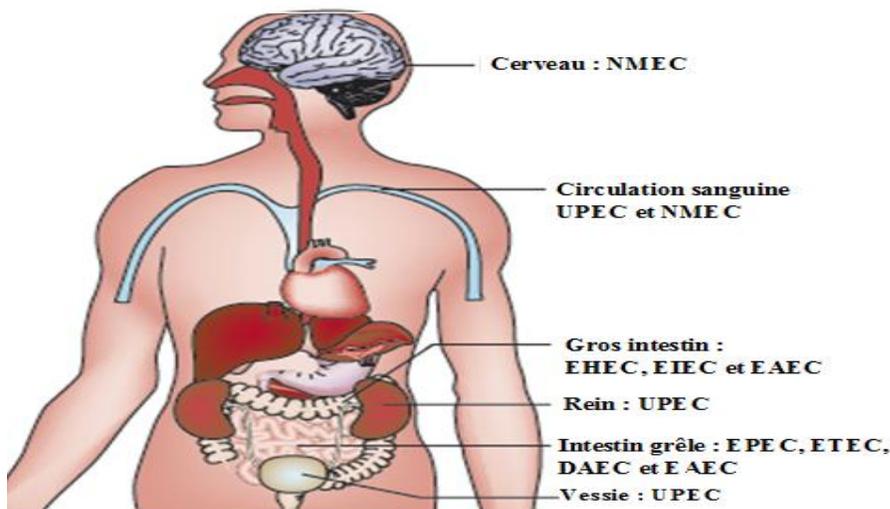


Figure 1. Sites de colonisation des *Escherichia coli* pathogènes (adapté de Croxen *et al.*, 2010)

Chapitre II : Pathovars de *E. coli* responsables d'infections digestives

Les pathogènes intestinaux de *E. coli* sont reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique. Six principaux pathovars classifiés en fonction des signes cliniques et des facteurs de pathogénicité exprimés sont inclus dans ce groupe.

II.1. *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC sont à l'origine d'épisodes de diarrhée aqueuse, modérée à sévère, peu fébriles, associés à des nausées et à des crampes abdominales. Dans les pays dits en voie de développement, les ETEC sont la cause majeure de cas de diarrhée aqueuse aiguë chez les enfants de moins de 5 ans et de « diarrhée du voyageur » ou «*tourista*».

II.2. *Escherichia coli* entéroinvasives (EIEC)

Les EIEC et les Shigelles sont souvent classés dans le même groupe de pathovar et possèdent une stratégie d'infection similaire. Les EIEC sont responsables de syndrome dysentérique caractérisé par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnées d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement vers une dysenterie (diarrhée contenant du sang et du mucus).

II.3. *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les DAEC sont un groupe hétérogène qui produit une adhésion diffuse sur cellules Héla et Hep-2. Les isolats de DAEC en colonisant l'intestin grêle, engendrent des cas de diarrhée chez les enfants entre 5 et 18 mois d'âge. Par ailleurs, ils peuvent coloniser le tractus urinaire et être à l'origine d'infection urinaire récurrente chez l'adulte.

II.4. *Escherichia coli* entéro-agrégatives (EaggEC, ou EAEC)

Considérées comme des pathogènes émergents, les EAEC sont la deuxième cause de diarrhée des voyageurs après ETEC dans les pays développés et en voie de développement. Les EAEC sont également reconnues comme une cause de diarrhée endémique et épidémique dans le monde entier.

II.5. *Escherichia coli* entéro-pathogènes (EPEC)

Les EPEC sont responsables de cas de diarrhée sévère chez les enfants dans les pays en voie de développement. Par contre, dans les pays industrialisés, l'incidence des infections dues aux EPEC a fortement diminué. Mais des cas sporadiques sont encore recensés dans les communautés d'enfants.

II.6. *Escherichia coli* enterohémorragiques (EHEC)

Ce sont des bactéries pathogènes et zoonotiques qui se retrouvent dans l'eau et parfois dans les aliments. Elles sont responsables de diarrhée, de colite hémorragique et de syndrome urémique hémolytique chez l'homme mais peu ou pas de maladie perceptible chez les animaux considérés comme des réservoirs.

II.6.1. Les facteurs de virulence associés aux EHEC

La presque totalité des EHEC O157:H7 portent un plasmide de virulence pO157 de 92 kb, qui a approximativement 100 ORFs (« Open Reading Frames ») et code pour plusieurs facteurs de virulence. Cependant, le facteur principal de virulence d'EHEC est la Shigatoxine (*Stx*) (*Stx* ; également connue comme vérocytotoxine (*Vtx*), qui est une

caractéristique des *E. coli* du groupe des « Shiga-toxin producing *E. coli* » (STEC) auquel EHEC O157:H7 appartient (figure 2).

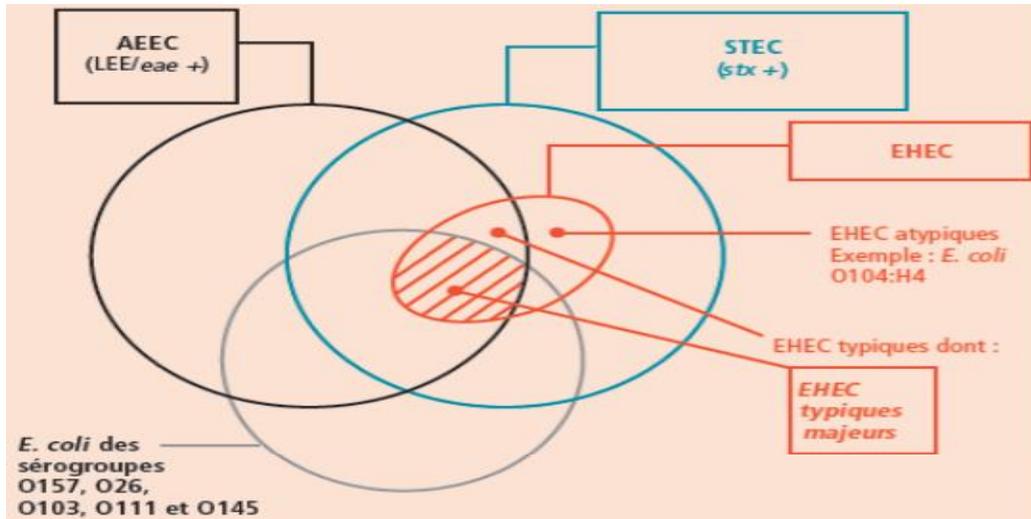


Figure.2 Représentation schématique des souches AEEC, EHEC et STEC (adapté d’AFSSA 2010)

Toutes les souches possédant le LEE, incluant le gène *eae*, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des AEEC. Les souches possédant le gène codant les toxines *Stx*, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC. Les EHEC sont associées chez l’Homme à une colite hémorragique et/ou un syndrome hémolytique et urémique et produisent des toxines *Stx*. Ainsi, toutes les EHEC sont des STEC mais toutes les souches STEC, mêmes celles qui possèdent le LEE, ne sont pas systématiquement associées à la maladie chez l’Homme. La grande majorité des souches EHEC Possèdent le LEE et les souches EHEC LEE+ sont dénommées EHEC typique. Les souches EHEC typiques appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, et O145:H28 (et leurs dérivés non mobiles) sont les souches les plus souvent associées à des signes cliniques graves (SHU) et aux épidémies et sont dites souches « EHEC typiques majeures » .

II.6.1.1. Shiga-toxines (*Stx*) ou vérotoxines (*Vtx*) des EHEC

Les Shigatoxines (*stx1* et *stx2*) sont des toxines particulières codées par les gènes *stx* et sécrétées par certaines souches de *E. coli* : les STEC (« Shiga-toxin-Producing *Escherichia coli* » ou *E. coli* produisant des Shiga-toxines), anciennement connues sous le nom de VTEC (Verotoxin-Producing *Escherichia coli* ou *E. coli* produisant des vérotoxines). La Shiga-toxine tient son nom du fait de sa grande similitude avec une toxine produite par *Shigella dysenteriae*. Elle est également connue sous le nom de vérotoxine, en raison de sa toxicité pour les cellules Véro, des cellules de reins du singe vert d’Afrique (*Cercopithecus aethiops sabaues*) utilisées en culture cellulaire.

I.6.1.1.1. Structure des Shiga-toxines (*stx*)

Les shigatoxines sont des hétéropolymères de 70 Kda formés d’une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7 Kda. La sous-unité A est responsable de l’activité enzymatique tandis que la sous-unité B intervient dans la liaison aux récepteurs. Les deux sous unités A et B sont codées par un opéron d’environ 1230 Pb généralement porté par un bactériophage de type I-like qui est retrouvé dans toutes les souches STEC pathogènes. Cet opéron est constitué d’un cistron proximal codant la sous-unité A et d’un cistron distal, séparé du précédent par 12 à 15 nucléotides, codant la sous unité B.

La toxine *stx* comporte deux sous-groupes *stx1* et *stx2*, le sous groupe *stx2* est le plus répandu dans les cas de colite hémorragique et de SHU. Les toxines *stx1*, sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae1*, et les toxines *stx2* ne le sont pas. Cependant les données épidémiologiques montrent que les souches produisant la toxine *stx2* sont responsables des troubles les plus sévères chez l'homme. (O' Brien *et al.*, 1992). A côté, quelques isolats produisant en même temps *stx1* et *stx2*, ou plus rarement seulement *stx1* ont été identifiés (Imamovic *et al.*, 2009).

I.6.1.1.2. Les récepteurs Gb3s des Shiga-toxines

Les récepteurs de *stx* sont les globotriosyl céramides Gb3 (galactose- α (1-4)-galactose- β (1-4)-glucosyl-céramide) trouvés sur les cellules endothéliales vasculaires humaines, les cellules de Paneth dans la muqueuse intestinale humaine, à la surface des cellules épithéliales rénales, et au niveau du système nerveux central, expliquant les manifestations cliniques observées (diarrhée, insuffisance rénale, troubles neurologiques). Le récepteur Gb3 est synthétisé dans l'appareil de Golgi des cellules eucaryotes cibles et transporté jusqu'à la membrane plasmique où il se localise dans le feuillet externe avec sa partie tri-saccharidique faisant face à l'extérieur et la partie céramide de l'hydrocarbure (C-16 à C-24) dans la membrane plasmique. La sous-unité *Stx B* de la shiga-toxine identifie spécifiquement la liaison α 1-4 du di-galactose terminal du tri-saccharide. Une molécule de *Stx* contient 5 sous-unités B, chacune capable de lier une ou plusieurs molécules de Gb3. L'importance de Gb3 dans l'action des *Stx* est évidente, dans des études sur des animaux et en cultures cellulaires, l'absence de Gb3 élimine la réponse à *Stx* (Boerlin, 1999).

Par ailleurs, les cytokines induiraient la production de récepteurs Gb3 à la surface des cellules, les rendant plus sensibles à l'action de *Stx*. L'absence de ces récepteurs Gb3s dans l'appareil gastro-intestinal chez les animaux peut expliquer pourquoi la colonisation d'EHEC chez les animaux est asymptomatique (Malyukova *et al.* 2009).

I.6.1.1.3 Mécanisme d'action des shigatoxines

1. Procédé d'internalisation de la shigatoxine

La sous-unité *Stx B* interagit avec le récepteur Gb3 et induit des invaginations de la membrane de la cellule eucaryote cible. Le complexe *Stx*-récepteur est internalisé et placé dans les endosomes. Au lieu d'être dirigé vers les lysosomes pour la dégradation, le complexe est transporté d'une façon rétrograde à travers l'appareil de Golgi jusqu'au réticulum endoplasmique (Figure 3).

2. Activation enzymatique et réponses cellulaires

Après clivage de *StxA* par une protéase, l'activateur enzymatique A1 est libéré dans le cytoplasme où il exerce son effet sur les ribosomes en entraînant la nécrose et la mort cellulaire. Les dommages des cellules endothéliales entraînent une activation de la coagulation, l'inhibition de la fibrinolyse, l'accumulation de la fibrine et à la formation de thrombose. Par ailleurs, La combinaison de *Stx* et des lipopolysaccharides (LPS) induit l'agrégation plaquettaire et leucocytaire et une altération du tissu contribuant ainsi à un état pro-thrombotique. Les shiga-toxines seraient également impliquées dans l'apoptose des cellules endothéliales par inhibition de l'expression cellulaire du facteur anti-

apoptotique Mcl-1. À l'intérieur des cellules intestinales humaines Gb3-negative, *Stx* n'empêche pas la synthèse de protéines ou n'induit pas d'apoptose mais plutôt, réduit l'expression de chemokines pour supprimer les réponses inflammatoires (Gobert *et al*, 2007).

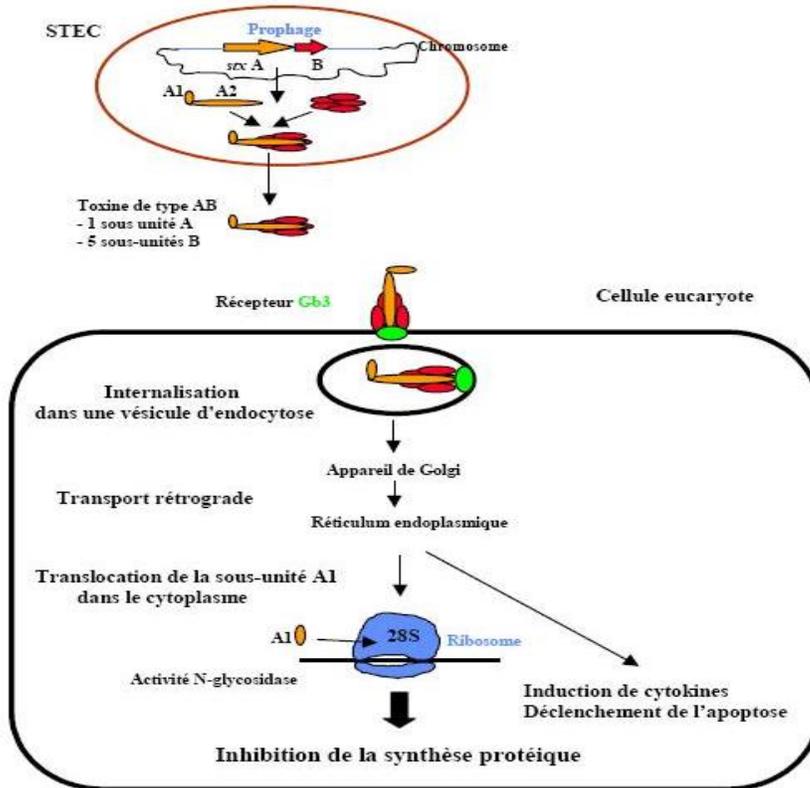


Figure 3 : Mécanisme d'action des Shiga-toxines (adapté de PRADEL, 2001). Les STEC possèdent sur leur chromosome des bactériophages portant les gènes *stxA* et *B*. La toxine comporte 1 sous-unité A et 5 sous-unités B. Après fixation de la toxine sur le récepteur GB3 à la surface des cellules eucaryotes, internalisation, transport rétrograde et translocation, l'activité N-glycosidase de la sous-unité A1 sur l'ARN 28S entraîne une inhibition totale des synthèses protéiques et donc la mort de la cellule.

II.6.1.2. Les facteurs d'adhésion des EHEC

II.6.1.2.1. Les fimbriae ou adhésines des EHEC

L'adhésion aux cellules épithéliales est un préalable au développement de nombreuses maladies. Cette adhésion se fait par l'intermédiaire d'un ligand bactérien appelé adhésine qui interagit avec un récepteur sur la cellule eucaryote. L'attachement initial des souches EHEC aux colonocytes reste encore mal défini. Les EHEC possèdent 16 fimbriae potentiels.

II.6.1.2.2. L'intimine

L'intimine est une protéine d'adhésion de la membrane externe associée aux lésions d'attachement-effacement, qui est codée par le gène chromosomique *eae*. Comme avec

les EPEC, l'attachement des souches EHEC aux cellules hôtes se produit par interaction entre l'intimine et le TIR. L'attachement peut également être augmenté par l'interaction de l'intimine avec la nucleoline, un récepteur à l'intimine localisé à la surface des cellules hôtes dont l'expression est augmentée par *Stx2* (Robinson *et al.*, 2006).

II.6.1.2.3. Le mécanisme d'attachement et d'effacement

Ce mécanisme, qui a lieu en 2 temps, l'attachement aux entérocytes puis l'effacement des microvillosités, repose sur des modifications du cytosquelette des entérocytes qui consistent essentiellement en une accumulation de micro-filaments d'actine, constitutifs des microvillosités, micro-filaments, plus ou moins dépolymérisés dans la zone apicale du cytoplasme cellulaire en contact étroit avec la bactérie. Cette accumulation de micro filaments d'actine est induite par la phosphorylation d'une protéine cellulaire HP 90 et sa localisation est déterminée par la fixation d'une protéine bactérienne de 97 kDa (intimine) sur un récepteur cellulaire. L'attachement entre la cellule et la bactérie est alors très fort. Peu de temps après, il est observé une disparition des microvillosités : c'est l'effacement.

II.6.2. Manifestations cliniques des infections à EHEC

L'infection par une souche EHEC chez l'homme peut revêtir plusieurs aspects allant du portage asymptomatique à l'infection mortelle.

II.6.2.1. La colite hémorragique

Au-delà d'une diarrhée banale, Elle constitue la forme la plus fréquente des affections humaines dues aux EHEC. Elle survient généralement après une période d'incubation variant de 3 à 7 jours. Les cas de diarrhée hémorragique sont associés à des douleurs abdominales particulièrement sévères qui précèdent le plus souvent de quelques jours la survenue de la diarrhée elle-même dont le caractère hémorragique n'est pas strictement obligatoire. Ces entérocolites hémorragiques nécessitent le plus souvent une hospitalisation en raison de la sévérité des douleurs abdominales et de la grande quantité de sang émise dans les selles. Les formes non hémorragiques de gravité moindre ne sont classiquement pas dépistées. Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la suppression des apports alimentaires et de la mise en route d'une nutrition parentérale jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé du patient. A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour controversée. Il peut survenir à la suite de cette infection, dans 5 à 10 % des cas, un syndrome hémolytique et urémique ou SHU qui constitue la deuxième grande manifestation due aux EHEC.

II.6.2.2. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU)

Bien que longtemps considéré comme idiopathique, le SHU est actuellement reconnu comme « une complication d'entérocolite liée aux EHEC chez l'enfant de moins de cinq ans et chez les individus âgés ». Deux types de SHU ont été décrits. Le SHU dit typique apparaît classiquement après un épisode de diarrhée aiguë prodromique, souvent sanglante. Les symptômes associés au SHU débutent brutalement. Le SHU typique survient surtout en été, quelque fois par épidémies. Le tableau clinique est caractéristique et ne pose généralement pas de problème de diagnostic. Le SHU atypique, quant à lui, survient sans prodrome diarrhéique et sans prédominance saisonnière. Il apparaît après

des symptômes respiratoires, de la fièvre ou des vomissements et son diagnostic n'est pas aussi aisé que pour la forme typique. Il n'est pas associé à une infection par une souche EHEC. La manifestation clinique consiste en une atteinte rénale avec oligurie ou même anurie accompagnée d'une anémie hémolytique micro angiopathique et d'une thrombopénie. La gravité de l'affection entraîne presque toujours une hospitalisation et une dialyse dans un cas sur deux. Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible. L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre une enquête Française dans laquelle 4 parmi 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996 sont décédés suite à une atteinte du système nerveux central (Decludt *et al.*, 2000).

II.6.2.3. Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

Le PTT est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925 (Brain *et al.*, 1978). Cette affection touche essentiellement l'adulte et se caractérise par des symptômes comparables au SHU avec des lésions rénales de moindre importance, une anémie hémolytique micro-angiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, une atteinte neurologique prédominante mais des signes neurologiques beaucoup plus prononcés avec des tremblements généralisés, des myoclonies ou des troubles du comportement. La découverte du lien entre l'infection par une souche EHEC et l'apparition de ce syndrome est relativement récente (Kovacs *et al.*, 1990) et il semble que les EHEC ne soient pas la cause la plus fréquente des PTT. La durée du PTT est habituellement de quelques jours à quelques semaines, mais elle peut parfois se prolonger pendant des mois. Quand la maladie progresse, elle peut toucher le système nerveux central et les reins, et leur atteinte est, dans la plupart des cas, la cause principale de la mort. Des signes neurologiques sont observés dans 90 % des cas d'évolution fatale.

II.6.3. Sources et mode de transmission des EHEC

Les infections à EHEC peuvent être sporadiques, se manifester en nombre réduit ou en une grande épidémie. Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources d'infections à EHEC. Ainsi, il paraît évident que *E. coli* O157:H7, et plus généralement les STEC, peuvent se transmettre par voie féco-orale et que la contamination se produit fréquemment par l'ingestion d'aliment ou d'eau souillée, par le contact direct avec les animaux, les humains porteurs, ou des objets contaminés, ou plus rarement par inhalation (Varma *et al.*, 2003) (Figure 4). Les ruminants domestiques, et plus particulièrement les bovins, sont les principaux réservoirs de STEC dans leur tube digestif. Ce sont des porteurs sains, ils participent à la contamination de l'environnement par les bactéries présentes dans leurs fèces. Dans une moindre mesure, d'autres animaux d'élevage ou des animaux sauvages dont certains gibiers peuvent également être porteurs sains de STEC. Les études réalisées chez les bovins montrent qu'en fonction des élevages, de 20 à 80 % des animaux peuvent être porteurs de STEC (recherche des gènes *stx* dans les matières fécales) mais *E. coli* O157:H7 n'est isolée que chez peu d'animaux (0 à 3 %).

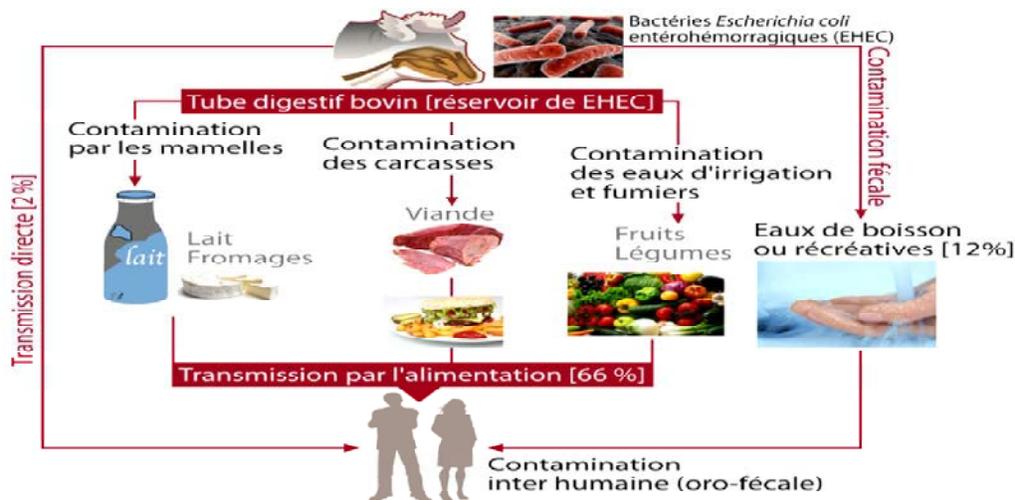


Figure 4. Mode de transmission des EHEC à partir du réservoir animal

La principale voie de transmission est indirecte par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eau de boisson contaminés par un environnement souillé le plus souvent par les matières fécales d'animaux infectés. Aux États-Unis, les études épidémiologiques montrent que, quand la source de contamination peut être identifiée, la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec les animaux (notamment les bovins) représentent respectivement 66 %, 20 %, 12 % et 2 % des modes de contamination.

(<http://www.dangersalimentaires.com/2011/06/steaks-haches-lidl-ecoli-enfants-contamines/>)

II.6.3.1. Produits d'origine animale

De nombreux véhicules alimentaires de STEC ont été mis en cause au cours des différentes épidémies rapportées. Les plus fréquents sont d'origine bovine : viande de bœuf hachée ou préparation à base de viande de bœuf, rôti de bœuf. Les carcasses sont contaminées à l'abattoir lors de l'habillage, la manipulation par le personnel. Des règles d'hygiène doivent être appliquées de manière stricte à l'abattoir pour éviter la contamination des carcasses. La prévalence fécale de la bactérie chez les bisons d'élevage était plus grande que chez les bovins et variait de 17% à 83% au fil des jours (Mohammad *et al.* 2008) et O157 : H7 ont été isolées à partir de 300 sains buffles d'eau en Turquie (Seker *et al.*, 2009).

E. coli O157 :H7 a aussi été isolée à partir de viande de porc, de mouton, de chèvre, de cerf, de dinde, de caribou. Certains produits laitiers ont aussi été incriminés dans la transmission de STEC : lait cru, beurre, yaourts, fromages frais ou à base de lait non pasteurisé... Une mauvaise hygiène de traite peut expliquer la contamination du lait.

II.6.3.2. Produits d'origine non animale

D'autres sources non animales ont été identifiées comme étant à l'origine de cas d'infection à STEC chez l'homme tel que le cidre et les jus de fruits (jus de pomme non pasteurisé), ainsi que les légumes consommés crus ou peu cuits : laitue, jeunes pousses (radis) et graines germées (luzerne, fenugrec, ...).

Différents végétaux consommés par l'Homme peuvent être contaminés par des STEC, soit par les fumures obtenues à partir d'animaux contaminés, soit quand de l'eau

contaminée est utilisée pour l'irrigation. D'autres sources non alimentaires peuvent également être incriminées (tableau I).

Tableau I : Épidémies à EHEC survenues depuis 2006 et publiées dans la littérature internationale (adapté de AFSSA, 2010)

Sérogroupe/sérotype	Pays (année)	Mode de transmission	Nombre de cas	Référence
O104:H4 <i>stx2</i>	France (2011)	Alimentaire (graines germées de fenugrec)	15	(153)
O104:H4 <i>stx2</i>	Allemagne (2011)	Alimentaire (graines germées de fenugrec)	3816	(138)
O145:H28 <i>stx1 eae</i>	Norvège (2009)	Personne à personne (crèche)	16	(462)
O157	Angleterre (2009)	Contact avec des animaux de ferme (ferme pédagogique)	36	(6)
O157: H- <i>stx1 stx2 eae</i>	Pays-Bas (2008-2009)	Alimentaire (viande de boeuf crue)	20	(6)
O157	États-Unis (2008)	Alimentaire (viande de boeuf)	99	(80)
O111	États-Unis (2008)	Alimentaire (aliment non précisé)	341	(68)
O157:H-	États-Unis (2008)	Alimentaire (lait cru)	14	(166)
O157:H-	États-Unis (2007)	Contact avec des animaux de ferme (ferme pédagogique)	7	(6)
O157:H- <i>stx1 stx2 eae</i>	Pays-Bas ; Islande (2007)	Alimentaire (salade verte)	50	(6)
O26:H11 <i>stx1 stx2 eae</i>	Danemark (2007)	Alimentaire (saucisse de viande bovine biologique)	20	(6)
O26 <i>stx2 eae</i> / O145 <i>stx1 eae</i>	Belgique (2007)	Alimentaire (glace au lait pasteurisé)	12	(6)
O157 <i>stx1 stx2</i>	Angleterre (2007)	Alimentaire (sandwich au poulet et herbes)	12	(6)
O157:H7 <i>stx2</i>	États-Unis (2006)	Alimentaire (salade verte)	77	(416)
O157:H7 <i>stx1 stx2</i>	Japon (2006)	Contact avec des animaux de ferme (ferme laitière)	4	(6)
O157:H7 <i>stx2</i>	États-Unis (2006)	Alimentaire (épinards)	205	(6)
O103 <i>stx1</i>	Japon (2006)	Personne à personne (crèche)	8	(6)
O103:H25 <i>stx2</i>	Norvège (2006)	Alimentaire (saucisse de viande ovine)	17	(6)
O26:H11 <i>stx1</i>	Japon (2006)	Personne à personne (crèche)	6	(6)

Chapitre III : La production des viandes au Sénégal

Malgré de nombreux programmes nationaux de développement du secteur de l'élevage, le Sénégal est loin d'être autosuffisant en viande et lait. Chaque année, les importations pour couvrir les besoins de consommation de la population s'élèvent à 60 milliards de FCFA (MEPA, 2013).

III.1. Le Cheptel national

Le cheptel à l'échelle nationale a connu une évolution tout à fait considérable grâce à la mise en œuvre des programmes de vaccination contre les épizooties et d'amélioration génétique par l'insémination artificielle. L'évolution annuelle des effectifs du cheptel au niveau national (en milliers de têtes) est représentée dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : Évolution des effectifs du cheptel

Évolution annuelle des effectifs du cheptel au niveau national (en milliers de têtes)									
Année	Bovins	Ovins	Caprins	Porcins	Équins	Asins	Camelins	Volaille familial	Volaille industrielle
2005	3 091	4 863	4 144	309	514	413	4,1	21 527	6 135
2006	3 137	4 996	4 263	318	518	415	4,1	22 078	7 533
2007	3 163	5 109	4 353	319	518	438	4,6	22 141	12 787
2008	3 210	5 251	4 477	327	524	442	5	21 889	13 633
2009	3 261	5 383	4 598	344	518	446	4,7	22 302	12 538
2010	3 313	5 571	4 755	354	523	450	5	22 971	17 478
2011	3 346	5 716	4 887	364	529	453	5	23 255	20 916
2012	3 379	5 887	5 038	375	534	456	5	23 929	20 226

Sources : (MEPA/ CEP/ DIREL/, 2012)

III.2. Production locale contrôlée des viandes au Sénégal

La production locale en viande dans sa globalité est faible par rapport à la demande. Par contre le secteur de l'aviculture commerciale a connu des progrès à la suite de l'arrêt des importations des produits avicoles avec l'avènement de la Grippe aviaire, en 2005. Le tableau III nous montre une nette évolution de la production des viandes au Sénégal.

Tableau III : Évolution de la production locale de viande et d'abats (en tonnes)

Années	Bovins	Ovins	Caprins	Porcins	Camelins	Volaille industrielle	Volaille familiale	Total Volaille	TOTAL
2005	58 995	19 632	12 842	10 751	13	9 203	19 839	29 042	131 275
2006	62 505	21 476	12 993	11 348	10	11 300	20 347	31 647	139 980
2007	49 340	22 265	13 410	11 120	16	16 367	20 665	37 032	133 183
2008	65 457	21 285	14 059	10 569	19	20 450	20 618	41 068	152 457
2009	74 330	24 383	15 5068	12 372	17	18 806	20 593	39 399	166 070
2010	76 348	25 590	16 134	13 300	18	24 469	20 982	45 451	176 840
2011	81 315	26 641	17 341	12 218	18	28 688	27 090	55 778	193 311
2012	76 927	26 680	17 308	12 113	18	29 196	27 487	56 684	189 729

Sources : CEP, DIREL/ MEPA, 2012

III.3. Importations contrôlées de viande

L'importation de la viande de volaille représentait la majeure partie des importations de viandes congelées. La pandémie de grippe aviaire en 2005 dans le monde a conduit à l'interdiction de l'importation de la viande de volailles au Sénégal d'où la baisse des importations à partir de 2006. Par ailleurs, la baisse de la production de la viande bovine en Europe, à cause de la maladie de la vache folle, a provoqué une diminution de l'importation de cette dernière. Ces deux situations ont occasionné depuis 2007, une augmentation massive de l'importation de viande de buffle au Sénégal, soit 87% de viandes et abats importés en 2007 (Tableau IV).

Tableau IV : Évolution des importations contrôlées de viande (en tonnes)

Année	Viande bovine	Viande de buffle	Viande ovine/ Caprine	Abats	Volailles	Charcuterie	Conserves	Viande porcine	Totaux
2005	5 903,5		158,6	2 013,2	11 288,9	318,6	9,3		19692,0
2006	8 750,0		335,1	2 861,6	-	205,4	11,3		12163,4
2007	987,6	8 390,9	357,0	2 954,3	-	133,7	133,7	133,9	13091,0
2008	857,6	5 887,7	241,2	2 158,7	8,5	135,1	71,5	124,1	9 484,4
2009	615,2	5 065,8	186,6	2 302,7	3,5	96,1	174,0	24,7	8 468,6
2010	682,3	5 057,5	138,3	1 519,0	15,6	117,3	54,6	96,7	7 681,3
2011	600,6	3 937,5	70,6	623,5	308,3	145,4	77,5	762,1	6 525,7

Source : Service vétérinaire Port et Aéroport (MEPA, 2012)

III. 4. La viande de buffle

III.4.1. Les effectifs de buffles

La population mondiale de buffles d'eau est d'environ 168 millions de têtes : plus de 95% vivent en Asie, 2% en Afrique, surtout en Égypte, 2% sont en Amérique du Sud, et moins de 1% en Australie et en Europe. (FAO, 2005).

Les pays possédant le plus grand nombre de bufflonnes laitières sont l'Inde, le Pakistan, la Chine, l'Égypte et le Népal. Le Pakistan, l'Égypte et le Népal possèdent plus de bufflonnes laitières que de vaches laitières. Les buffles d'eau sont la principale source de lait en Asie du Sud. Dans de nombreux pays en développement l'exploitation des buffles représente une partie intégrante de l'économie agricole (FAO, 2005).

III.4.2. Importance nutritionnelle de la viande de buffle

Parmi les trois macronutriments, les protéines sont les plus importantes pour la santé et la réalisation des corps ; chaque jour, notre corps avec ses milliers de milliards de cellules est constamment en panne et en cours de reconstruction ; les besoins individuels varient toutefois entre 1,5 à 3 grammes par kilogramme de poids corporel en exercice ou en fonction des objectifs et besoins spécifiques.

Les viandes de buffle, de bison, du cerf, du kangourou et de l'autruche sont une excellente source de protéines et sont très faibles en matières grasses, ont beaucoup de goût et, parfois, à bon prix. Elles contribuent également à éliminer dans l'organisme des produits toxiques comme les composés chimiques libres. Le tableau V nous montre les caractéristiques de la viande de buffle comparée à la viande bovine.

Tableau V : Comparaison de certaines caractéristiques entre la viande Bovine et celle de Buffle (Rocha,2001)

Caractéristiques	Buffle	Bovin
- Calories(Kcal)	131,00	289,00
- Protéine (N x 6,25)	26,83	24,07
- Graisse totale(g)	1,80	20,69
- Acides gras		
- Saturés(g)	0,60	8,13
- Mono saturés(g)	0,53	9,06
- Poly saturés(g)	0,36	0,77
- Cholestérol (mg)	61,00	90,00
- Minérales :		
Ca, Fe, Mg, P , K, Na Zn, Cu, et Mn(total mg)	641,80	583,70

III.4.3. Les importations de la viande de buffle au Sénégal

A la suite de l'arrêt de l'importation des produits aviaires en 2006, les acteurs de cette filière pour s'adapter à cette nouvelle situation se sont tournés dans l'importation massive de la viande congelée particulièrement la viande de buffle (Tableau IV). Les viandes de buffle, proviennent, en général, de l'Argentine et des pays du Sud-est asiatique, comme l'Inde, le Pakistan. L'importation est assurée en grande partie par des sociétés privées et des groupements d'intérêt économique(GIE).

III.4.3.1. Commercialisation de la viande de buffle

La viande fraîche est un produit très périssable, et doit donc être traitée avec la plus grande attention pour protéger les consommateurs. La viande doit être produite, transportée, stockée et commercialisée dans des conditions d'hygiène.

III.4.3.2. Mode de transport

Les viandes congelées et importées sont accompagnées de la facture du fournisseur et également du certificat de qualité sanitaire du produit fourni par un laboratoire agréé.

Les viandes congelées sont importées par bateaux, en containers isothermes munis d'un système réfrigérant. Les containers arrivent plombés, engageant ainsi la responsabilité de l'expéditeur.

A l'arrivée au Port Autonome de Dakar, les services vétérinaires font les prélèvements qui s'imposent, en vue de l'obtention d'un certificat de salubrité à la suite des analyses bactériologiques. Après les résultats des laboratoires, le produit peut être autorisé à la vente.

III.4.3.3. Distribution

La viande de buffle, une fois jugée salubre, est transportée dans les conteneurs jusqu'aux entrepôts des importateurs. Ces entrepôts, généralement bien tenus, sont placés sous contrôle vétérinaire. Cette viande se rencontre essentiellement à Dakar.

III.4.3.4. Conservation

La viande de buffle congelée importée au Sénégal est bien conservée. L'efficacité de cette bonne conservation passe par l'utilisation de films imperméables et par la réalisation de soudures étanches pour limiter la pénétration de l'air (Dumont, 1982). Elle est complétée par une bonne congélation. Cette conservation présente un intérêt double : économique et hygiénique.

1) Économique : C'est l'allongement de la durée de vie commerciale des aliments en permettant ainsi, le transport sur de longues distances, dans des conditions très favorables au maintien de qualités organoleptiques et le stockage pendant de longues périodes, rendant possible le contrôle et la régulation du marché des viandes.

2) Hygiénique : Le froid, et particulièrement la congélation, est essentiel aux denrées alimentaires animales comme la viande. En effet, la congélation permet la stabilisation des viandes vis-à-vis des agents nuisibles, microbiens et enzymatiques en :

- inhibant la croissance microbienne et les réactions enzymatiques.
- assurant la destruction des parasites transmis par les viandes (cysticerques, trichines, sarcocystes ...).

La congélation, par des procédés inappropriés ou mal appliqués, entraîne la détérioration des propriétés organoleptiques, de l'appétit technologique et de la valeur nutritionnelle. Donc le froid conserve, à condition qu'il soit correctement utilisé.

Si l'importation de ces produits comporte un aspect positif, notamment leur prix (1600FCFA/Kg), il n'en demeure pas moins qu'elle suscite de nombreuses inquiétudes auprès des populations locales. La présence de bactéries pathogènes dans la viande serait de nature à accroître un risque réel en santé publique vétérinaire.

DEUXIÈME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

1. Matériel et méthodes

1.1. Objectifs de l'étude

Les souches de *Escherichia coli* pathogènes sont considérées à l'heure actuelle comme des souches émergentes en santé publique. Les *E. coli* pathogènes, particulièrement les EHEC, provoquent des pathologies intestinales qui peuvent aller de la simple diarrhée à des complications graves comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) dont le pronostic peut être fatal. Des analyses réalisées au niveau du laboratoire HIDAOA dans le cadre du dénombrement des germes témoins de la contamination fécale montrent la présence de *E. coli* dans des échantillons de viande destinée à la commercialisation. Afin d'évaluer les risques sanitaires liés à la présence des souches *E. coli*, nous avons recherché la présence des gènes de virulence associés aux EHEC qui codent pour les Shigatoxines (*stx1* et *stx2*) et les facteurs d'attache (*eae*) à partir d'une collection de souches *E. coli* isolées à partir des échantillons de viande de buffle en provenance des SVPA et des marchés. L'étude a duré 3 mois, allant de juin à Août 2013. Une première partie correspondant au dénombrement et isolement des souches *E. coli* a été réalisée au niveau du laboratoire de HIDAOA de L'EISMV et une deuxième partie qui correspond à la recherche des gènes de virulence des EHEC, a été effectuée au niveau du LNERV de l'ISRA. C'est en effet, une étude de faisabilité qui ne peut en aucun cas permettre de faire des extrapolations

1.2. Caractéristiques des prélèvements

L'étude a été réalisée sur des échantillons de viande de buffle congelée, importée ; envoyés par les Services Vétérinaires du Port et de l'Aéroport (SVPA), lors des inspections de routine et sur des échantillons collectés à partir des marchés. En fonction de l'importance et de la disponibilité des viandes congelées, nous avons ciblé cinq marchés de Dakar : Tylène, Gueule tapée, Sandaga, Fass et Castor.

1.2.1. Réalisation des prélèvements

a) Prélèvements des SVPA

A l'aide d'un manuel de procédure, les prélèvements sont réalisés par des agents des SVPA et les échantillons sont transportés au laboratoire HIDAOA pour analyse. Les prélèvements arrivent congelés (-10°C) puis sont analysés aussitôt après vérification et enregistrement de la fiche commémorative d'accompagnement (Tableau VI).

b) Prélèvements des marchés

Au niveau des étals, l'hygiène même élémentaire n'est pas respectée. Il n'est question ni de la propreté, ni de la chaîne de froid. La viande a l'aspect rouge et ne présente aucun signe d'altération.

Les étals de bouchers sur les marchés sont ciblés de manière aléatoire et le prélèvement est effectué le matin, entre 7 et 9 heures, au nombre d'un par boucher. Ce prélèvement est unique, en raison d'un prélèvement de 500g par pièce de viande de buffle congelée (-4°C). Les échantillons sont transportés après 30 minutes à 1 heure de temps au laboratoire HIDAOA dans des glacières avec des carboglaces. Les prélèvements arrivent au laboratoire conservés entre +1°C à +8°C (Tableau VI).

Tableau VI : Prélèvements de viande de buffle congelée réalisés par site

Sites	Nombre	Unité (g)	Quantité(g)	température au Labo
SVPA	13	20000	260000	0 à -8°C
Tilène	30	500	15000	1 à 6 °C
Gueule				
Tapée	17	500	8500	2 à 5°C
Sandaga	22	500	11000	0 à 2°C
Fass	15	500	7500	0 à 1°C
Castor	3	500	1500	1 à 3°C
Total	100		303500	

1.2.2. Préparation des échantillons

Après réception des échantillons, 10g de viande sont pesés puis découpés en de très petits morceaux, et sont introduits stérilement dans un sachet Stomacher contenant 90 ml d'eau Peptonée Tamponnée (EPT) stérile, offrant la dilution au dixième.

Le broyage s'effectue dans la machine Stomacher à 230 tr pendant 1mn30. Les chocs dilacèrent le produit et mettent les germes en suspension. Le mélange homogène est alors laissé au repos pendant 30 mn, le temps de revivifier les bactéries. La solution obtenue est appelée 'solution mère'. Son titre est donné par le rapport : Poids aliment/Volume total (aliment + diluant). La solution mère titre 1/10.

NB : Pour la recherche des salmonelles, il faut peser 25g de viande à diluer dans 225g d'ETP.

1.2.2.1. Dénombrement des germes de contamination fécale

Le dénombrement est réalisé à partir de la solution mère par dilution successive. A l'aide d'une pipette, 1ml de la suspension mère est introduit dans un tube contenant 9ml d'EPT pour obtenir la dilution 10^{-2} . Le mélange est réalisé grâce à un agitateur de type Vortex durant 5 à 10 secondes. Cette opération est répétée sur chaque dilution ainsi préparée, jusqu'à l'obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriées pour l'inoculation des milieux de culture (10^{-3} , 10^{-4} , etc.).

Par précaution, les pipettes sont changées d'une dilution à l'autre dans le sens décroissant, pour éviter un transfert de la charge bactérienne d'un tube à l'autre.

✓ Entérobactéries

Des dilutions décimales 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} des suspensions bactériennes ont été ensemencées sur la Gélose Biliée Glucosée au cristal Vert et au Rouge Neutre (VRBG) et ont été incubées à 37°C - 30°C, pour le dénombrement des colonies rouges-violacées, \leq à 0,5 mm, parfois entourées d'une zone rougeâtre, caractéristique des entérobactéries selon la norme NF V08-054.

✓ Coliformes

Des dilutions décimales des mêmes suspensions bactériennes ont été ensemencées sur la Gélose Biliée Lactosée au cristal Vert et au Rouge Neutre (VRBL) et ont été incubées à 30°C pour le dénombrement des coliformes par comptage des colonies rouges-violacées, ≤ à 0,5 mm, parfois entourées d'une zone rougeâtre, caractéristiques des coliformes, selon la norme ISO 4832.

✓ *E. coli*

Des dilutions décimales 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ des suspensions bactériennes ont ensuite été ensemencées sur la gélose spécifique de Tryptone Bile X (TBX) pour dénombrement par comptage des colonies bleues-vertes, caractéristiques d'*E. Coli* glucuronidase positive obtenues à 44°C, selon la norme NF V08-053 ou bien sur Pétrifilm Select *E. coli* (Pétrifilm™ Select *E. coli* Count Plate, Grosseron, Saint Herblain, France).

✓ Salmonelles

La dilution décimale des suspensions bactériennes 10⁻¹, a été enrichie avec le milieu Rappaport-Vassiliadis (RV), puis sur les milieux : Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) et Hektoen (H) ou : Gélose au Vert Brillant GVB, pour la Recherche des Salmonelles selon la norme ISO 6579/A1.

1.2.2.2. L'isolement et collection des souches de *E. coli*

Après le dénombrement, à partir de la dilution qui a permis d'obtenir de colonies bien isolées pour chaque échantillon, nous avons pris de façon aléatoire 3 colonies au maximum pour réaliser notre collection de souches pour la recherche des gènes de virulence associés aux EHEC (Tableau VII).

Tableau VII : Collection de souches *E. coli*

Sites prélèvement	Isolats de <i>E. coli</i>
SVPA	13
Sandaga	39
Tilène	33
Gueule tapée	26
Fass	20
Castor	04
Total	135

1.2.3. Recherche des gènes de virulence associés aux EHEC

Les souches de la collection ont été repiquées dans des tubes eppendorf contenant 500µL de bouillon Luria Bertani (LB) (Invitrogen, Paisley, Écosse). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. A partir des suspensions bactériennes obtenues, nous avons réalisé l'extraction des ADN.

1.2.3.1. L'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été faite par lyse alcaline avec de la soude. 320µL de suspension bactérienne ont été centrifugés à 12 000 tr/min pendant 5 minutes. Après aspiration du surnageant, le culot a été resuspendu dans 25µL de NaOH à 0,5 M (Prolabo) et incubé à température ambiante pendant 20mn. Ensuite, nous avons rajouté 25µL de Tris HCl pH = 7.4 à 1M (Sigma, Steinheim, Allemagne) pour arrêter la réaction et 450µL d'eau distillée.

1.2.3.2. Amplification des gènes *eae*, *stx1* et *stx2* par PCR multiplex

La réalisation de la PCR a nécessité la préparation du Mix à partir des solutions mères du réactif dont les différents composants sont représentés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Préparation d'un Mix

Réactifs	Concentration Initiale	Concentration Finale	1 Réaction
1. Tampon 10X PCR	10X 100mM/l	1X	5µL
2. dNTP	(chacun)	0.2mM (chacun)	0.4µL (pool)
3. Primers (6)	100Mm	1Mm	0.5µL/primer
4. Taq DNA polymérase	5U/µl	1U/50µl	0.2µL
Eau H2O dé ionisée Milli-Q			36.4µL
DNA	20 à 50µg/ml	0.2 à 0.5µg/ml	5µL

1. Tampon PCR 10X : 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, pH= 8,8 à 25°C (Biolabs, Herts, Royaume-Uni)
2. dNTP (Promega, Madison, États-Unis)
3. Primers (Biomers, Sequantia, Evry, France)
4. Taq ADN polymérase (Biolabs).

Les séquences d'amorces utilisées pour la recherche des gènes (*eae*, *stx1* et *stx2*) et les souches de référence sont représentées respectivement dans le **Tableau IX** et **Tableau X**.

Tableau IX : les couples d'amorces utilisés

Gènes cibles	Amorces sens et anti-sens	Produit PCR (pCR)	Référence
<i>Eae</i>	eaeAF : GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	Paton & Paton, 1998
	eaeAR : CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
	stx1F : ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC		
<i>stx1</i>	stx1R : AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	
	stx2F : GGCACTGTCTGAAACTGCTCC		
<i>stx2</i>	stx2R : TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	

Tableau X : Les souches utilisées comme témoins positif et négatif

<u>Souches</u>	<u>Pathotypes</u>	<u>Sérotypes</u>	<u>Gènes cibles</u>	<u>Références</u>
MG1655 (témoin négatif)	<i>E. coli</i> K-12	Orough : H48		U00096 (<u>Hayashi,T., et al.,2001</u>)
SAKAI (témoin positif)	EHEC	O157 : H7	<i>eae, stx1, stx2</i>	

1.2.3.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

1.2.3.3.1. 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 ;
- chauffer la solution pour bien dissoudre les pastilles ;
- laisser refroidir la solution
- 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.

1.2.3.3.2. 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 (Baobabs) 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 45minutes. 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 photographie, un échantillon est positif à un gène lorsqu'une bande claire apparaît sur sa zone de migration et se situe sur la même ligne que celle de la bande du contrôle positif (celle-ci est repérée grâce au marqueur de poids moléculaire).

2. Résultats

2.1. Résultats du dénombrement

Un dénombrement des entérobactéries, des coliformes, des *E. coli* ainsi que la recherche des salmonelles avaient été réalisés sur les échantillons provenant des SVPA et des marchés pour déterminer les taux de contamination. Les résultats montrent une contamination de la viande de buffle congelée, importée par les entérobactéries, les coliformes et les souches *E. coli*. Cependant, les Salmonelles étaient absentes dans tous les échantillons (Tableau XI).

Tableau XI : Résultats du dénombrement des germes de contamination fécale.

Sites de Prélèvement	Entérobactéries (ufc/ml)	Coliformes (ufc/ml)	Salmonelles (absence dans 25g)	<i>E. coli</i> (ufc/ml)
SVPA	6.10^2	3.10^2	0	5
Marchés regroupés	$2,4.10^3$	10^3	0	$7,7.10^2$

Le taux de contamination en *E. coli* était plus élevé dans les échantillons en provenance des marchés que dans les échantillons des SVPA et aucune différence significative n'était observée entre les marchés étudiés (figure : 5).

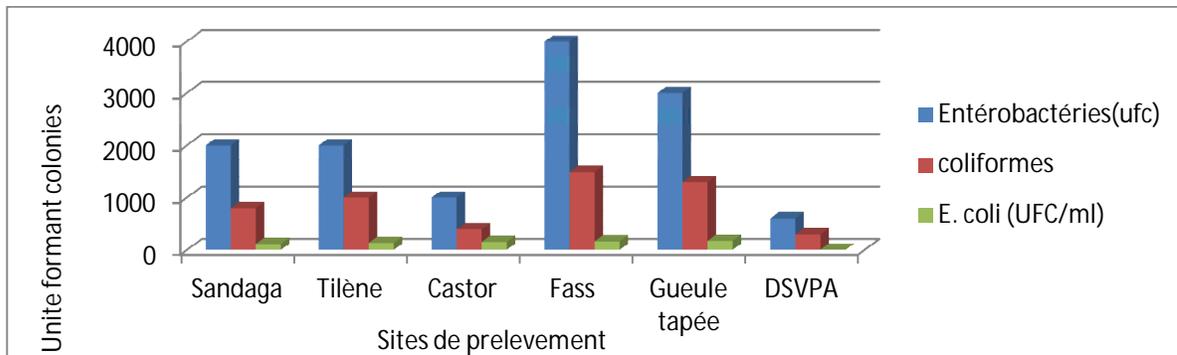


Figure 5 : Analyse comparative des dénombrements au niveau des sites de prélèvement

Tableau XII : Représentation des *E. coli* par classe :

Classes (ufc)	Échantillons	Pourcentage	Critères microbiologiques <i>E. coli</i>
<10	16	16%	5.10^2 (ufc)
] 10-10 ² [78	78%	
]10 ² -10 ³ [6	6%	
10 ³ -10 ⁴	0	0	
>5.10 ⁴	0	0	
Total	100	100%	

Sur 100 échantillons analysés, pour le dénombrement des *E. coli*, 94, soit 94 p.100 sont conformes aux critères de référence selon la Norme française comme l'illustre le tableau XII ci-dessus.

2.2. Résultat de la recherche des gènes de virulence associés aux EHEC

Les résultats obtenus montrent que sur les 135 isolats de *E. coli* testés par PCR multiplex, 9 isolats portaient au moins un des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* recherchés soit une prévalence globale de 6,66%. La répartition des souches porteuses des gènes de virulence en fonction des marchés était : Sandaga (4/9), Gueule tapée (2/9), Fass (2/9) et Tilène (1/9). Les souches en provenance des SVPA ne portaient pas les gènes de virulence recherchés. Parmi les souches porteuses de gènes de virulence recherchés, les souches STEC (*stx2*, *stx1-stx2*) étaient majoritaires 5/9 (77%). Deux souches isolées aux marchés de Fass et Gueule Tapée portaient à la fois les gènes *stx1* et *stx2* (Tableau XIII).

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

Gènes associés aux EHEC	sites de prélèvement						Total N=135
	SVPA n=13	Sandaga n=33	Tilène n=39	Gueule tapée n=26	Fass n=20	Castor n=4	
<i>Eae</i>	0(0)	1(3, 03%)	0(0)	0(0)	1(5%)	0(0)	2(1, 5%)
<i>stx2</i>	0(0)	3(9, 09%)	1(2,56%)	1(3, 84%)	0(0)	0(0)	5(3, 70%)
<i>stx1</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>stx1-stx2</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(3, 84%)	1(5%)	0(0)	2(1, 5%)
Totaux	0(0)	4(12,12%)	1(2,56%)	2(7, 68%)	2(10%)	0(0)	9(6, 66%)

N= total des souches d'*E. coli* isolées dans les 5 sites de prélèvements.

n= nombre de souches d'*E. coli* isolées pour chaque type de prélèvement et % de souches identifiées porteuses de gènes associés aux EHEC).

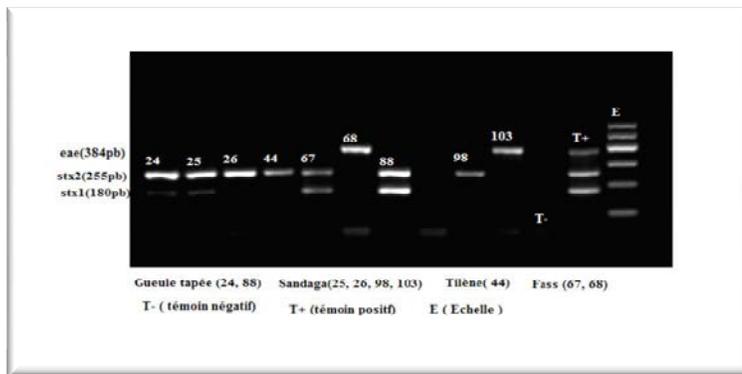


Figure 6 : gel d'agarose montrant l'amplification du gène *eae* (384pb), du gène *stx2*(255pb) et du gène *stx1*(180pb).

3. Discussion - Recommandations

Malgré une couleur souvent normale, il est communément admis que la valeur alimentaire d'un produit diminue au cours du stockage par rapport au même produit à l'état frais. Les déperditions sont dues à l'exsudation (très importante à la décongélation).

La présence des entérobactéries peut signifier une conservation à des températures de refroidissement trop élevées ou pendant une durée trop longue. Elle peut donner une idée comparative de la contamination microbienne et des pratiques d'hygiène lors du traitement et de la conservation. Leur présence peut aussi indiquer une contamination microbienne d'origine fécale des aliments (Ghafir *et al.*, 2007).

La présence des coliformes fécaux dans la viande peut prendre origine dans les abattoirs. En effet, la contamination des carcasses semble inévitable lors des abattages, notamment lors de l'éviscération, par les mains des ouvriers ou le matériel, l'eau utilisée ou par rupture éventuelle des réservoirs gastriques. Dans les viandes crues ou manipulées après traitement, il est normal de retrouver une faible quantité de coliformes. Leur présence au-delà des limites définies peut signifier un défaut d'hygiène des procédés de fabrication. Le dénombrement des *E. coli* nous a permis d'avoir les résultats suivants : SVPA (5cfu/ml), Sandaga ($1,2 \cdot 10^2$ cfu/ml), Tilène ($1,4 \cdot 10^2$ cfu/ml), Castor ($1,60 \cdot 10^2$ cfu/ml), Fass ($1,7 \cdot 10^2$ cfu/ml) et Gueule tapée ($1,8 \cdot 10^2$ cfu/ml). Les limites du critère microbiologique pour la viande sont une limite inférieure de : <10 ufc/g et une limite supérieure de : $3,7 \cdot 10^8$ ufc/g.

Les résultats des analyses ont montré 94 p.100 de conformité dus à *Escherichia coli*. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus en 2007 par Nkolo, avec un taux de 88,9 p.100 de conformité en *E. coli* dans la viande de buffle congelée au Sénégal pour les normes d'AFNOR en vigueur.

Notre étude montre des taux de contamination plus élevés au niveau des marchés que sur les échantillons prélevés par les SVPA au cours du débarquement des containers. Ce résultat montre l'apport important de contamination au niveau des circuits de distribution, dans la boucherie et la rupture de chaîne de froid entre les grossistes et les détaillants dans les marchés. Les *Salmonella. sp.*, étaient absentes sur les 100 échantillons testés. Par contre, *Salmonella spp* s'est révélée dans 58 échantillons de viande de buffle congelée importée au Sénégal parmi les 200 analysés soit 29 % (Mamadou, 2008).

3.1. Présence des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* dans la viande de buffle congelée importée

La prévalence globale était de 6, 66%. Les prévalences des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* trouvées dans les marchés Sandaga (12,12%), Tilène (2,56%), Gueule tapée (7,68%) et Fass (10%) étaient significativement élevées, comparées aux études réalisées en Belgique et au Sénégal. Et aucune des souches issues de ces données ne portait en association les gènes *eae* et *stx1* et/ou *stx2*.

En effet, en Belgique, en 2003, 1479 carcasses de bovins ont été écouvillonnées. Dix souches STEC O157 (0,74 %) ont été isolées. Parmi lesquelles, huit souches possèdent le gène *stx2* et deux les gènes *stx1* et *stx2*. Cinq souches STEC O157 :H7 ou H- ont été isolées des 298 échantillons de viandes hachées testées (1,68 %). Quatre possèdent le

gène *stx2* et une souche *stx1* et *stx2*. Deux souches STEC (*stx1* et *stx2*) ont été isolées à partir des 285 viandes de découpe testées soit une prévalence de 0,70 %. Toujours en Belgique, en 2004, 1337 carcasses de bœuf ont été écouvillonnées. Dix-huit souches de STEC O157 ont été mises en évidence, soit une prévalence de 1,4 %. Dix-sept souches sont positives pour le gène *stx2* et une souche est positive pour les gènes *stx1* et *stx2*. Deux souches STEC O157 (*stx2*, *eae* et *ehxA*) ont été mises en évidence dans les découpes de bœuf (2/244) soit une prévalence de 0,8 %, mais aucune dans la viande hachée de bœuf (0/234) (Chahed, 2007).

Les souches en provenance des SVPA et du marché de Castor ne portaient pas les gènes de virulence recherchés. Étant donné la faible prévalence des gènes associés aux EHEC dans les aliments, en particulier, la viande ; le choix de la taille de l'échantillon est déterminant pour la mise en œuvre de l'étude. C'est ainsi que, pour les études réalisées sur des échantillons d'origine environnementale, il est conseillé de travailler au minimum sur 400 souches par site en raison de la faible prévalence de ces gènes dans l'environnement et en fonction de la précision souhaitée (Estelle, 2007). Les prévalences nulles observées dans les deux sites s'expliquent par le faible nombre de souches testées (SVPA (n= 13) et Castor (n=4). En effet, dans la présente étude, aucune relation n'a été trouvée entre la présence des gènes de virulence associés aux EHEC et les résultats du dénombrement des *Escherichia coli* (ou même des entérobactéries, des coliformes). Au Sénégal, en 2013, une étude réalisée par Ngaba sur la recherche des gènes *stxs* et *eae* chez des souches *E. coli* O157 isolées, à partir des produits carnés dans les marchés locaux montrait que 6,45% des souches testées portaient soit le gène *stx1* soit le gène *stx2* mais jamais les deux à la fois, contrairement à nos résultats.

Récemment, une étude a été réalisée dans le centre du Vietnam qui a trouvé une prévalence de STEC O157 de 27% chez les buffles, 23% chez les bovins, et de 38,5% chez les caprins. STEC O157 a également été isolé en Inde à partir d'aliments d'origine bovine, à savoir, des échantillons de bœuf hachés crus (9%; n = 22), des prélèvements de surface de la viande bovine (3,7%; n = 27). Ceci nous amène à dire que la viande de buffle peut être autant contaminée de gènes de virulence *stxs*, *eae* que la viande de bovins. Et Les résultats d'une étude sur la prévalence de la toxine de Shiga (*stx*) produisant *Escherichia coli* (STEC) chez les animaux de boucherie à Dhaka, au Bangladesh fournissent la preuve que les animaux abattus comme des buffles, vaches, chèvres sont des réservoirs de STEC, y compris potentiellement la souche virulente de STEC O157. (Mohammad *et al.*, 2008).

Dans notre étude, la prévalence du gène *stx2* (3,7%) était plus élevée parmi les souches testées. Le variant *Stx2* pose un véritable problème de santé publique. Les gènes codant *Stx2* sont plus souvent retrouvés dans les isolats cliniques de patients développant des pathologies graves (colite hémorragique, SHU, PTT) par rapport à ceux codant *Stx1* et ses variants (Friedrich *et al.*, 2002 ; Panos *et al.*, 2006 ; Garcia et Aljaro, 2005). Par ailleurs, les niveaux de cytotoxicité observés *in vitro* sur des cellules endothéliales rénales humaines montrent que *Stx2* était 1000 fois supérieure à celle de *Stx1* (Louise *et* Obrig, 1995). Il a été rapporté que les infections humaines peuvent résulter de l'ingestion de moins de 100 bactéries viables (Caprioli *et al.*, 2005). L'inventaire et les fonctions

précises des facteurs de virulence EHEC ne sont pas encore connus, mais des études épidémiologiques ont suggéré que les associations entre les facteurs de virulence pourraient augmenter la capacité de certains sérotypes de provoquer une maladie chez l'homme (Boerlin *et al.*, 1999).

Donc, dans la plupart des cas, le niveau de contamination par les STEC O157 est faible mais il faut rappeler que même de bas niveaux de contamination présentent un risque réel pour le consommateur à cause de la faible dose infectieuse de ce pathogène.

3.2. Recommandations et perspectives

Au vu des différents résultats que nous avons obtenus dans la présente étude, nous formulons les recommandations suivantes à l'endroit :

1. des vétérinaire-hygiénistes, agents de santé publique, de la répression des fraudes qui ont pour rôle de vérifier la sécurité et la qualité commerciale des denrées à l'import-export et ou dans le circuit de production et de distribution. Ces autorités locales responsables sont tenues d'effectuer le suivi pour vérifier l'application des règles d'hygiène et de sécurité sanitaire introduites, jusqu'à l'étape appropriée de la distribution, que sont les étals des chevillards et bouchers dans la chaîne d'importation de la viande de buffle congelée en vue de s'assurer du respect par les exploitants de ce secteur, des référentiels applicables. Ceci peut aussi mettre en confiance les consommateurs des velléités de fraudes (par certains bouchers) ou de substitution des viandes congelées importées ;

2 du laboratoire d'HIDAOA, le point critique le plus important à considérer est la création d'une banque de souches de *E. coli*, lesquelles seront conservées à -80°C dans du glycérol à 30% pour des études des facteurs de virulence.

3 du LNERV d'ISRA, des recherches complémentaires des souches isolées et gènes de virulence détectés doivent se poursuivre afin de déterminer :

- les sérotypes associés.

- les variants des gènes *stx1*, *stx2* et *eae*

- la résistance aux antibiotiques des souches porteuses de ces gènes ;

4 aux opérateurs de viandes, ils doivent observer le respect strict des bonnes pratiques d'hygiène avec limitation des contaminations fécales au cours de l'abattage (dépeçage et éviscération des animaux de boucherie). La manipulation de la viande de buffle congelée, leur conditionnement et leur transformation sont des pré-requis essentiels. Les bouchers doivent être sensibilisés et formés aux enjeux de santé publique pour le changement de pratiques ;

5 aux consommateurs de viande de buffle

En France, la note d'information interministérielle DGAL/SDSSA/O2007-8001 du 13 février 2007 relative aux recommandations concernant la cuisson des steaks hachés dans le cadre de la prévention des infections à *E. coli* O157 :H7 pour les professionnels de la restauration collective, recommande une cuisson avec une température à cœur de 65 °C. Par ailleurs, une température à cœur plus élevée (70 °C) est souvent recommandée afin de lutter non seulement contre les STEC potentiellement pathogènes, mais aussi contre d'autres contaminations microbiennes.

En outre, les points suivants constituent les meilleures façons de se protéger contre le risque d'infection à la bactérie *E. coli* :

- Quand vous faites cuire de la viande hachée, faites-la cuire à point jusqu'au centre (température de 71° C). La viande et les jus de viande devraient être bruns et non pas rouges ou roses.
- Lavez-vous les mains comme il faut AVANT de MANIPULER la viande et APRÈS être allé à la toilette.
- NE LAISSEZ PAS de viande crue à la température ambiante. Faites la cuire Immédiatement ou réfrigérez-la jusqu'au moment de la faire cuire.
- Assurez-vous que la viande crue ou les jus de la viande crue ne viennent pas en contact avec d'autres aliments. Placez les viandes crues sur la tablette du bas du réfrigérateur pour éviter que les jus ne coulent sur les autres aliments.
- Lavez et désinfectez la vaisselle, les planches à découper et les comptoirs après les avoir utilisés pour préparer de la viande crue. Pour une solution désinfectante, mélangez 1½ cuillère à thé d'eau de Javel à un litre d'eau.
- Dans un restaurant, NE COMMANDEZ OU N'ACCEPTÉZ JAMAIS de la viande hachée dont la cuisson est insuffisante.
- Enfin, l'entretien et la désinfection des systèmes de fourniture d'eau sont indispensables.

Conclusion

Escherichia coli commensale (*E. coli*) soutient l'équilibre intestinal physiologique de l'hôte, tandis que *E. coli* pathogène avec des profils de gènes de virulence typiques peuvent causer de graves épidémies de diarrhée. Les gènes de virulence sont souvent situés sur des éléments génétiques transmissibles et peuvent donc être transmis au réceptif de souches de *E. coli*. En plus, ces facteurs de virulence des souches de *E. coli* sont couramment utilisés pour classer les isolats et déterminer leurs types d'associations, la pathogénicité et l'épidémiologie.

Leur présence dans les viandes correspond à un défaut de la technique d'abattage, ou une contamination croisée, mais peut également être due à une contamination par les personnes manipulant ces denrées alimentaires.

Il semble que le résultat du dénombrement des *E. coli* ne soit pas un bon indicateur de la présence d'une souche de STEC O157 mais qu'il permet d'évaluer les pratiques de l'établissement.

La mise en place d'analyses microbiologiques pour la recherche de ces gènes potentiellement pathogènes dans la viande de buffle, congelée et importée au Sénégal est de nature à évaluer le risque de contamination par les EHEC à l'homme. Mais, la présence de ces gènes n'est pas toujours synonyme d'infection dans la population. Des 135 isolats testés par analyse PCR multiplex, 9 isolats ont été trouvés pour abriter les gènes de virulence *stx2*, *stx1-stx2* et *eae* des souches de *E. coli*. La prévalence est de 6, 66% et ils ont été détectés dans les échantillons des marchés de Sandaga (4/9), Gueule tapée (2/9), Fass (2/9) et pour une moindre part de Tilène (1/9).

Ainsi, les résultats de notre étude confirme l'hypothèse selon laquelle la viande de buffle congelée, importée au Sénégal est contaminée par des souches *E. coli* porteuses de gène de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* et constituerait un risque de santé publique.

Ceci nécessite que les mesures de contrôle, tout au long de la chaîne de transport, de stockage et de distribution puissent être mises en place et appliquées pour accroître la sécurité de ces produits.

Ces pathogènes doivent être pris en compte dans l'analyse des dangers et peuvent être recherchés dans le cadre de la réalisation des contrôles de routine et du respect des principes généraux fixés par le « Paquet hygiène ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AFSSA**. 2010. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis Afssa du 15 juillet 2008. Maisons-Alfort : Afssa 19 p.
2. **Alpha A. Diallo**. 2013. *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse doctorat de l'université de Toulouse.
3. **Blanco, J., M. Blanco, J. E. Blanco, A. Mora, E. A. Gonzalez, M. I. Bernardez, M. P. Alonso, A. Coira, A. Rodriguez, J. Rey, J. M. Alonso, and M. A. Usera**. 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**:345-51.
4. **Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, and C. L. Gyles**. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* **37**:497-503.
5. Brain, M. C. 1978. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries (Moschcowitz 1925). *Thromb Haemost* **40**:9-10.
6. **Caprioli, A., S. Morabito, H. Brugere, and E. Oswald**. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* **36**:289-311.
7. **Croxen, M. A., and B. B. Finlay**. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:26-38.
8. **Chahed A**. Prévalence et Caractérisation de Souches des *Escherichia coli* O157productrices de shiga toxines isolées de denrées alimentaires d'origine animale en Belgique et en Algérie. Thèse Liège, 2007
9. **Decludt, B., P. Bouvet, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, P. A. Grimont, B Hubert, and C.Loirat**. 2000 Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.
10. **Dumont B.L.**, 1982.- Influence des conditions de conservation et préparation sur la contamination microbiologique des viandes (239-267) In : hygiène et technologie de la viande fraîche.- Paris : ed. du N.N.R.S.- 325p.
11. **France, Ministre de L'Agriculture et des Pêches**, 2001. Note de service DGAL SDHA N2001-8090 relative aux critères microbiologiques applicables aux aliments.
12. **Garcia-Aljaro, C., M. Muniesa, J. Jofre, and A. R. Blanch**. 2004. Prevalence of the stx2 gene in coliform populations from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3535-3540.
13. **Gobert, A. P., M. Vareille, A. L. Glasser, T. Hindre, T. de Sablet, and C. Martin**. 2007. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-kappaB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J Immunol* **178**:8168-74.
14. **Grant, J., A. M. Wendelboe, A. Wendel, B. Jepson, P. Torres, C. Smelser, and R. T. Rolfs**. 2008. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis* **14**:1633-6.
15. **Imamovic, L., J. Jofre, H. Schmidt, R. Serra-Moreno, and M. Muniesa**. 2009. Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* **75**:1764-8.

16. **Karib H., Radi R., Marhaben A., et Cohen N.** Qualité bactériologique de la viande hachée bovine commercialisée à Rabat. Symposium Euro-maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire. 7-9 septembre 2005 Fès, Maroc).
17. **Kaper, J. B. J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.
18. **Kaper, JB, S. Elliott, V. Sperandio, NT Perna, GF Mayhew, et FR Blattner.** 1998. *Fixation et effacé histopathologie intestinale et le locus effacement des entérocytes*, p. 163 –
19. **Kauffmann, F.** 1947. The serology of the coli group. *J Immunol* **57**:71-100.
20. **Kebede G.,** 1986. –contribution à l'étude de la contamination superficielle des carcasses des bovins aux abattoirs de Dakar (Sénégal). – Thèse : Med.Vét. (17), Dakar.
21. **Kovacs, M. J., J. Roddy, S. Gregoire, W. Cameron, L. Eidus, and J. Drouin.** 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Med* **88**:177-9.
22. **Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-89.
23. **Mainil, J.** 2003. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Méd. Vét.* **94**:159-165.
24. **Malyukova, I., K. F. Murray, C. Zhu, E. Boedeker, A. Kane, K. Patterson, J. R. Peterson, M. Donowitz, and O. Kovbasnjuk.** 2009. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G78-92.
25. **Mamadou, D,** 2008. Contribution a l'étude de la qualité bactériologique de la viande de buffle congelée importée au Sénégal : Thèse Méd. Vét. 61
26. **Mohammad A. Islam, Abdus S. Mondol, Enne de Boer , Rijkelt R. Beumer, Marcel H. Zwietering, Kaisar A. Talukder , et Annet E. Heuvelink** 2008. **Prévalence et caractérisation génétique de produisant la toxine Shiga *Escherichia coli* isolats de Abattus Animaux au Bangladesh.**
27. **Mora, A., S. L. Leon, M. Blanco, J. E. Blanco, C. Lopez, G. Dahbi, A. Echeita, E. A. Gonzalez, and J. Blanco.** 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol* **114**:204-10.
28. **Nawal A. Hassanain and W.M. Ahmed,** 2008. Occupational Exposure of Buffalo Gynecologists to Zoonotic Bacterial Diseases. *Research Journal of Microbiology*, **3**: 17-23.
29. **Nkolo S.C.,** 2007. Qualité bactériologique de la viande de buffle congelée importée au Sénégal. Dakar: Thèse : Méd. ; Vét , (21).
30. **O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **180**:65-94.
31. **Paton, A. W., and J. C. Paton.** 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol* **36**:598-602.

32. **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.
33. **Robinson, C. M., J. F. Sinclair, M. J. Smith, and A. D. O'Brien.** 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:9667-72.
34. **Sarr Moustapha. M.** 2012. 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 des abattoirs de Dakar , Senegal. Thèse :Méd. Vét (39).
35. **Savageau, M. A.** 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene-control. *Am Nat* **122**:732-744.
36. **Sénégal, Ministère de l'Élevage et des Productions Animales :** rapport Sen-statistiques /CEP/ DIREL / SVPA, 2012.
37. **Schuller, S., G. Frankel, and A. D. Phillips.** 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol* **6**:289-301.
38. **Varma, J. K., K. D. Greene, M. E. Reller, S. M. DeLong, J. Trottier, S. F. Nowicki, M. DiOrio, E. M. Koch, T. L. Bannerman, S. T. York, M. A. Lambert-Fair, J. G. Wells, and P. S. Mead.** 2003. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* **290**:2709-12.
39. **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.

Webographie :

40. **Enquête sur la viande et le foie importés au Sénégal :** les Sénégalais consomment de la chair de Buffle. Par Mamadou Seck | Seneweb.com | Jeudi 24 décembre, 2013 05:32 .
41. **Enterobacteriaceae ([Rahn 1937](#)) [Ewing et al. 1980](#),** consulté le 31 jan 2014 à 11h 35.
42. **FAO, Regional Office For Europe Inter-Regional Cooperative Research Network On Buffalo (SCORENA)** Edited by Antonio Borghese Rome, 2005 <mailto:antonio.borghese@entecra.it> , consulté le 9/12/ 2013 à 3h53. Page 212.
43. **Fiche de renseignements sur la sécurité alimentaire.** La bactérie *E. coli* O157 pages2, **Nouvelle Écosse, fichier** - PDF-X Change viewer ecoli viande hachée consulté le 10/7/2013 à 12h40.
44. **Ghafir Y. ¹ Daube G. ²** (2007). Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale - articles De Synthèse Ann. Méd. Vét. Liège, Belgique : <mailto:Georges.Daube@ulg.ac.be>, consulté ,le 31 jan 2014, à 11h38. Pages 80-81
45. **Nozha Cohen 1 Et Hakim Karib 2 :** Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : Un réel problème de santé publique? - Institut Pasteur Maroc. Département H.I.D.A.O.A. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. N°1 – 2006 <mailto:adresse.nozha.cohen@pasteur.ma>, consulté, le 31 /01/2014 à 11h33. Pages 8-9
46. **Viande de bovin importée au Sénégal :** Tromperie sur la marchandise. Par Le messenger | Politicosn.com | Lundi 26 juillet, 2013 11:13.

Annexe 1 Fiches d'analyse

1. Exemple de Fiche d'analyse de laboratoire

Reçu, le 12/06/2013

République du Sénégal
Un peuple -un but-une foi
Ministère de l'Élevage
Direction des Services Vétérinaires
Service Vétérinaire du Port et de l'Aéroport de Dakar
Tel : 33821075

N°092MEL/DSV/SVPA

Commémoratifs

Prélèvement effectué..... le 10/06/2013
Désignation.....viande de buffle congelée
Lot d'origine..... 1981 cartons
Conteneur..... CEMU504954/1
Moyen de transport.....Patricia Schulte
Propriétaire.....SOPRODAL SARL
Désignation.....Vente
Analyses demandées..... Bactériologiques
Laboratoire d'analyse..... HIDAOA/EISMV

Signé le Chef de Service

2. Fiche de prélèvement pour les échantillons des marchés locaux :

Date et heure de prélèvements.....10/06/2013
Site de prélèvement.....Sandaga
Numéro du boucher.....14
Numéro de l'échantillonE.S14
Température au laboratoire.....1°C
Analyses bactériologiques.....
Analyse PCR

<p>Recherche des gènes de virulence <i>stx1</i>, <i>stx2</i> et <i>eae</i> dans les souches de <i>E. coli</i> isolées de la viande de buffle, congelée importée au Sénégal.</p>	<p>Research of virulence genes <i>stx1</i>, <i>stx2</i> and <i>eae</i> in <i>E. coli</i> strains isolated from frozen buffalo meat, imported in Senegal.</p>
<p style="text-align: center;">Résumé</p>	<p style="text-align: center;">Abstract</p>
<p>Les <i>Escherichia coli</i> sont considérées à l'heure actuelle comme des pathogènes émergents en santé publique. Les <i>E. coli</i> pathogènes dériveraient des souches commensales par acquisition successive de facteurs de virulence. Les souches de <i>Escherichia coli</i> productrices de Shiga-toxine (STEC) isolées lors d'infections chez l'homme sont appelées <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC). Les principaux facteurs de virulence des EHEC sont les Shiga-toxines (<i>stx1</i> et <i>stx2</i>) et le facteur d'adhésion (<i>eae</i>). La contamination par ces bactéries résulte principalement de l'ingestion de produits alimentaires d'origine animale et végétale souillés, tels que la viande ou les fromages au lait cru et les légumes.</p> <p>L'objectif de la présente étude est de rechercher dans la viande de buffle importée, au Sénégal, les gènes de virulence <i>stx1</i>, <i>stx2</i> et <i>eae</i> associés aux EHEC par PCR. L'étude de la qualité bactériologique a été effectuée sur 100 échantillons de viande en provenance de cinq marchés de Dakar et des Services Vétérinaires du Port et de l'Aéroport (SVPA). La PCR a été réalisée sur 135 isolats des <i>Escherichia coli</i> dont 13 isolats des SVPA et 122 isolats des marchés. Les résultats montrent une contamination de la viande de buffle congelée, importée par des entérobactéries, des coliformes et des <i>E. coli</i> et une absence de <i>Salmonella sp.</i> Les niveaux de contamination des viandes en provenance des marchés et de SVPA par les <i>E. coli</i> étaient respectivement $7,67 \times 10^{-2}$ unités formant colonies (ufc/ml) et 5 ufc/ml.</p> <p>Des 135 isolats de <i>E. coli</i> testés par PCR multiplex, 9 isolats portaient au moins un des gènes de virulence <i>stx1</i>, <i>stx2</i> et <i>eae</i> recherchés soit une prévalence globale de 6,66%. La répartition des souches porteuses des gènes de virulence en fonction des marchés était : Sandaga (4/9), Gueule tapée (2/9), Fass (2/9) et Tilène (1/9). Les souches en provenance des SVPA ne portaient pas les gènes de virulence recherchés. Le niveau de contamination microbienne et la présence des gènes <i>stx1</i>, <i>stx2</i> et <i>eae</i> pourraient être dus aux mauvaises conditions de transport et de manipulation des viandes au niveau des marchés.</p> <p>Mots clés : <i>E. coli</i> Entérohémorragique, gènes <i>stx1</i>, <i>stx2</i> et <i>eae</i>, viande de buffle congelée importée au Sénégal.</p>	<p>Actually, <i>Escherichia coli</i> were considered as emerging pathogens in public health. Pathogens <i>E. coli</i> derived from commensal strains by sequential acquisitions of virulence factors. Shiga-toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) isolated in human infections were then recognized as Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC). Shiga-toxins (<i>Stx1</i> and <i>Stx2</i>) encoded by <i>stx₁</i> and <i>stx₂</i> genes and intimin factor, encoded by <i>eae</i> gene are essential EHEC virulence factors. Contamination by these bacteria occurs mainly during consumption of foodstuffs of animal origin and soiled vegetables such as meat or raw dairy cheese and vegetable.</p> <p>The objective of this present study is to research in frozen buffalo meat, imported in Senegal, virulence factor genes <i>stx1</i>, <i>stx2</i> and <i>eae</i> associated to EHEC using PCR method. Bacteriological quality analysis was made on 100 meat samples collected from five local markets and the Services Vétérinaires du Port et de l'Aéroport (SVPA) in Dakar, Senegal republic. The PCR Assay was carried in 135 <i>E. coli</i> isolates of which 13 and 122 isolates respectively from SVPA and markets. Results show contamination by enterobacteria, coliforms and <i>Escherichia coli</i> in frozen, imported buffalo meat. While <i>Salmonella sp.</i> is, absent. Contamination meat levels of <i>E. coli</i> count of markets and SVPA samples were respectively 7.67×10^{-2} and 5 colonies forming units (cfu/ml).</p> <p>From the 135 tested <i>E. coli</i> isolates, 9 isolates harbored at least one gene positive for research virulence genes <i>stx1</i>, <i>stx2</i> and <i>eae</i>: a total prevalence was 6.66%. The distribution of strains harboring virulence genes among markets was Sandaga (4/9), Gueule tapée (2/9), Fass (2/9) and Tilène (1/9). Strains from SVPA did not possess any researched virulence genes. The level of microbial contamination and the presence of genes <i>stx1</i>, <i>stx2</i> and <i>eae</i> may be attributed to poor transport conditions, and poor meat handling at market levels.</p> <p>Key words: Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>, <i>stx1</i>, <i>stx2</i> and <i>eae</i> genes, frozen imported buffalo meat in Senegal.</p>
<p>GAGARA HAMA Haladou Adresse : BP : 485- DLV(LABOCEL) Niamey-Niger Téléphone : +22790281931 - E-mail : haladoug@yahoo.fr</p>	