

A.A.F: aggregative adherence factor
A.I.D.A: adhesin involved in diffuse adherence
H2S: hydrogène sulfuré
LPS: lipopolysaccharide
GB3: globotriosylceramide
TNF : tumor necrosis factor
I L: interleukine
pInv: plasmid invasion

INTRODUCTION

La diarrhée aiguë est, en pédiatrie, la cause principale de mortalité et de morbidité à travers le monde. Environ 750 millions d'épisodes diarrhéiques aboutissent au décès de 5 à 7 millions d'enfants tous les ans, parmi les 3 milliards d'individus qui habitent l'Afrique, l'Asie et l'Amérique centrale. En d'autres termes, la diarrhée tue plus de 10.000 enfants par jour. (29)

Escherichia coli est une espèce prédominante de la flore intestinale ; il joue un rôle important dans le maintien de la physiologie intestinale. Cependant, au sein de cette espèce, il existe des souches hautement entéro pathogènes. (53)

C'est au cours de cette dernière décennie que le rôle de certains pathovars de *E. coli* dans les syndromes diarrhéiques a été élucidé et que les mécanismes de son pouvoir pathogène ont été étudiés (39).

Les souches pathogènes diffèrent des non pathogènes par la présence ou l'expression de « facteurs de virulence ». Ces facteurs dépendent de la présence de certains gènes de pathogénicité situés sur le chromosome ou les plasmides.(39)

Les souches de *E. coli* pathogènes étaient classées, autrefois, selon leur appartenance à des sérotypes traditionnels (antigène somatique O, capsulaire K, flagellaire H). Cependant, le nombre de sérotypes est limité du fait de la stabilité de certains clones pourvus de facteurs de

pathogénicité. Pour un diagnostic, le sérotype seul, isolé de toutes autres informations, ne peut signer le caractère pathogène d'une souche, sauf dans des conditions bien précises (contextes cliniques, microbiologiques ou épidémiologiques) où les clones ont une virulence bien établie: c'est, par exemple, le cas, actuellement, pour les souches du sérotype O157 : H7 dont la recherche du sérotype a toujours un intérêt épidémiologique et diagnostique.

Ainsi, notre étude a pour but :

- d'identifier neuf facteurs de pathogénicité par PCR,
- de déterminer les phénotypes d'adhésion par culture sur cellules Hep-2
- et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques par la technique de diffusion en milieu gélosé.

I. GENERALITES-HISTORIQUE

Compte tenu de son rôle en pathologie humaine et des perspectives d'avenir, *Escherichia coli* mérite qu'une étude lui soit consacrée. En effet, *E. coli* est:

.l'espèce la mieux connue parmi les entérobactéries: hôte normal et saprophyte de l'intestin de l'Homme et des animaux, elle représente près de 80% de la flore intestinale aérobie de l'homme adulte (10^7 à 10^8 bactéries par gramme de selle),

.la bactérie à Gram négatif la plus fréquemment en cause dans les infections intestinales et extra intestinales à tous les âges de la vie,

.une des bactéries qui ont permis d'importantes découvertes fondamentales par sa facilité et rapidité de culture, notamment dans les processus d'échanges de caractéristiques génétiques entre bactéries et dans la fabrication de divers métabolites d'intérêt industriel par génie génétique (**67**).

E. coli ou " colibacille"(appellation commune qui est une concentration de "bacille du colon") est un bacille dont le nom a été donné par CASTELLANI et CHALMERS en 1919 en hommage à THEODOR VON ESCHERICH (1857-1911), médecin allemand pédiatre, initié par FROBENIUS, un élève de ROBERT KOCH, aux nouvelles techniques de culture des bactéries. Il avait réussi à cultiver *Bacterium coli* commune (**67**).

II. CLASSIFICATION-TAXONOMIE

Escherichia coli est l'espèce type du genre *ESCHERICHIA* qui appartient lui-même à la vaste famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* est la bactérie ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études et est responsable avec *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* d'environ 80 à 95% des infections humaines (**31**).

Le genre *Escherichia* comprend d'autres espèces de description plus récente et d'incidence beaucoup plus rare comme *E. hermanii* (**12**), *E. vulneris* (**13**) ou *E. fergusonii* (**32**). *Escherichia blattae* qui avait été isolée en 1973 à partir du tube digestif d'un cafard (blatte) a une position taxonomique incertaine à l'intérieur du genre *Escherichia* alors qu'*E. adecarboxylata* qui avait été décrite en 1962 par Leclerc vient d'être reclassée dans un nouveau genre, le genre *Leclercia*, sous le nom de *Leclercia adecarboxylata* (**67**).

III. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

1. MORPHOLOGIE

E. coli est un bacille à Gram négatif, le plus souvent mobile (péritriche) et gazogène lorsqu'il fermente le sucre. Cependant, il existe des exceptions. Certains *E. coli*, immobiles et agazogènes (dénommés *Alkaescens dispar*), posent un problème de diagnostic différentiel avec les *shigelles*. (**11**)

2 CARACTERES CULTURAUX

Généralement, *E. coli* croît après 24 heures d'incubation à 37°C en donnant des colonies S, de 2 à 3 mm de diamètre, typiques de celles des entérobactéries.

E. coli se cultive facilement sur la gélose nutritive ou la gélose lactosée au bromocrésol (BCP)

Sur la gélose Mac Conkey, *E. coli* se présente sous l'aspect de colonies rouges entourées d'un halo opaque dû à la précipitation des sels biliaires. Avec la gélose Drigalski, l'aspect des colonies est jaune. Sur la gélose EMB, elles sont plates bleues foncées avec un éclat métallique en lumière réfléchi. (**11**)

3 CARACTERES BIOCHIMIQUES

E. coli possède les caractères classiques des entérobactéries. L'espèce est constituée de bacilles à Gram négatif oxydase négative généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche; elle réduit les nitrates en nitrites et fermente le glucose.

Les principaux caractères permettant de distinguer *Escherichia* des genres voisins et de différencier *E. coli* des espèces proches sont reportés dans les tableaux I et II.

Certaines souches de *E. coli* peuvent présenter des caractères atypiques acquis à la suite de mutations ou dus à la présence de certains plasmides hébergés par la bactérie (**23**).

On a pu ainsi décrire des souches de *E. coli* produisant de l'H₂S, utilisant le citrate ou hydrolysant l'urée. Les variants immobiles et agazogènes de *E. coli* peuvent être confondus avec *Shigella* dans la mesure où ces bactéries sont souvent décarboxylase négatives et possèdent des propriétés invasives (**85**)

Ces variants qui avaient été dénommés *Alkalescens-dispar* doivent en fait être classés comme *E. coli* (**62**).

Tableau I: Caractères biochimiques différentiels de *Escherichia coli* et des genres proches (**31, 62**

)

	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Salmonella</i> SG3 (Arizona)	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Buttiauxella</i>	<i>Cedecea</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Moellerella</i>
B-galactosidase	+	d	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
Uréase	–	–	d	–	–	–	–	d	–	–	–	–
Mobilité à 36°C	d	–	+	+	+	+	d	–	+	+	+	–
Gaz en glucose	+	–	+	+	+	d	d	d	+	+	+	–
Indole	+	d	d	–	–	–	–	d	–	–	+	–
LDC	d	–	–	+	d	+	+	+	–	–	d	–
Citrate de Simmons	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Croissance en KCN	–	–	+	–	+	+	d	+	+	+	+	+
R M	+	+	+	+	–	D	D	d	+	+	+	+
V P	–	–	–	–	+	d	d	d	–	d	–	–

A D H	-	-	d	+	d	-	-	-	-	+	-	-
ODC	d	d	+	+	d	d	+	-	+	d	d	-

LDC = Lysine décarboxylase ; RM = Rouge de Méthyle;

VP = Voges-Proskauer ; ADH = Arginine d'hydrolase ; ODC = Ornithine décarboxylase

+ = positif pour 90 à 100% des souches ; - = négatif pour 90 à 100% des souches ;

d = variables selon les souches

Tableau II : Caractères biochimiques différentiels des principales espèces du genre *Escherichia* (11)

Caractères	<i>E. coli</i> mobile	<i>E. coli</i> immobile	<i>E. hermanii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>
Pigment jaune	-	-	+	d	-
Mobilité à 36° C	+	-	+	+	+
Gaz en glucose	+	-	+	+	+
Production d'indole	+	d	+	-	+
Lysine décarboxylase	+	d	-	d	+
Ornithine décarboxylase	d	-	+	-	+
β xylosidase	d	d	d	+	-
β glucuronidase	+	d	-	-	-
Croissance en KCN	-	-	+	-	-
Adonitol	-	-	-	-	+
Arabitol	d	D	D	-	+
D-sorbitol	+	d	-	-	-
Mélibiose	d	d	-	+	-
cellobiose	-	-	+	+	+

+ = positif pour 90 à 100% des souches ; - = négatif pour 90 à 100% des souches

d = variable selon les souches

4 PROPRIETES ANTIGENIQUES

E. coli ne correspond pas à une espèce homogène comme le montre la grande diversité de ses composants antigéniques. La structure du lipopolysaccharide de *E. coli* a permis la mise en évidence de plus de 170 spécificités somatiques O(**73**).

L'existence d'antigènes K n'a jamais été formellement démontrée et ceux-ci n'apparaissent donc plus dans les formules antigéniques (**81**).

Les antigènes flagellaires H dont plus de 50 ont été caractérisés sont souvent difficiles à mettre en évidence car la plupart des souches de *E. coli* sont peu mobiles à l'isolement. De ce fait elles sont le plus souvent désignées uniquement par leurs spécificités somatiques O (**81**).

Il y a une relation évidente entre les différents pathovars et certains sérogroupes de *E. coli* (Tableau IV). Les antigènes F de nature protéique correspondent aux différents systèmes d'adhésion de *E. coli* aux cellules uroépithéliales ou aux entérocytes. Ils comprennent des adhésines de types 1 (F1) ou P (F7 à F13) pour les *E. coli* uropathogènes (**18, 74**) ou des facteurs d'attachement et de colonisation tels que le CFA/1 (F2) ou le CFA/2 (F3) dans le cas de souches responsables de diarrhées (**30**).

Tableau III : Pathovars de *E. coli* responsables d'infections intestinales (**61, 63, 81**)

Pathovars d' <i>E. coli</i>	Entéro-pathogènes (EPEC)	Entéro-toxinogènes (ETEC)	Entéro-invasifs (EIEC)	Entéro-hémorragiques (EHEC)	E ntéro-adhérents (EaggEC)
Sérotypes les plus fréquents	*Classe I (généralement EAF+: O55-O86-O119-O125-O126-O127-O128-0142 *Classe II (rarement EAF+) O18-044-0112-0114	O6-O8-O15-O20-O25-O27-O63-O78-O80-O85-O115-O128-O139-O148-O153-O159-O167	O28-O29-O124-O136-O143-O144-O152-O164-O167	O157-O26-O111	Non définis
Facteurs de pathogénicité	EAF SLTb	-CFA/I, CFA/II -Toxines LT, STd	SLT	SLT (vérotoxine)	-
Comportement vis-à-vis des entérocytes	Adhésion étroite	Adhésion	Invasion	Pas d'invasion	Pas d'invasion
Diarrhées chez des volontaires	Oui	Oui	Oui	Non testé	Oui
Mode d'identification	-Sérotypage O -Plasmide EAF -Recherche de SLT	-Recherche des Toxines LT et/ou ST -Recherche de CFA -Sérotypage O	Pouvoir invasif (test de SERENY) -LDC-immobiles -Sérotypage O- Recherche de SLT Plasmide de	-Sérotypage O -Recherche de SLT	Adhérences aux cellules Hep 2

			pénétration de 140Mdal		
--	--	--	---------------------------	--	--

a) **EAF** : EPEC adherence Factor. b) **SLT**: Shiga-like-toxine. C) **CFA**: Colonization Factor Antigens d) **toxine LT**: Thermolabile et **toxine ST**: thermostable

IV. EPIDEMIOLOGIE

4-1- RESERVOIR

E. coli est un hôte normal du tube digestif, de la partie distale de l'iléon et du colon de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud qu'il colonise dès les premières heures après la naissance. Il constitue l'espèce dominante de la flore aérobie (1000 fois moins importante que la flore anaérobie). *E. coli* n'existe pas normalement dans l'eau et le sol. Sa présence est un indicateur de contamination fécale.(**11**)

4-2- TRANSMISSION

Les souches bactériennes responsables d'entérites sont transmises par ingestion à partir de l'environnement (eau, aliments) contaminé par les selles de malades ou de porteurs.(**35**)

4-3- REPARTITION

Les souches EPEC, responsables d'épidémies meurtrières de gastro-entérites infantiles entre 1950 et 1970, ont pratiquement disparu actuellement des pays occidentaux où l'on ne signale que quelques cas sporadiques. Cependant, il existe actuellement des épidémies meurtrières à souches EPEC dans le tiers-monde (Brésil), où ces bactéries posent un problème important de santé publique. Les souches ETEC sont répandues dans le tiers-monde. C'est l'un des agents le plus souvent responsable de diarrhées du petit enfant, de diarrhée des voyageurs, ou d'épidémies de toxi-infections alimentaires dans les pays occidentaux. Ces souches sont responsables de syndromes cholériques très graves, aux Indes notamment, où on les a décrites pour la première

fois en 1960. Elles sont rarement rencontrées en France et sont surtout isolées chez des migrants ou des voyageurs. Les souches EHEC sont à l'origine d'épidémies de diarrhées hémorragiques en Angleterre et aux Etats-Unis et n'ont pas encore été isolées en France. Enfin, les souches EIEC sont rares en Occident, et surtout rencontrées en Amérique du Sud et au Sud- Est asiatique.(35)

V. POUVOIR PATHOGENE ET REPOSE IMMUNITAIRE

On distingue six pathotypes, en fonction de l'expression clinique de la diarrhée qu'ils provoquent et des facteurs de virulence équipant les souches à l'origine de la diarrhée.(tableau IV) (65, 70, 33):

.EPEC responsables de diarrhées infantiles persistantes, épidémiques dans les pays en voie de développement ;

.ETEC sont la cause de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement et de la diarrhée du voyageur;

.EHEC retrouvés au cours des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique typique (SHU);

.EIEC responsables de dysenteries proches de la shigellose;

.DAEC et EaggEC à l'origine de diarrhées aqueuses persistantes chez l'enfant.

Tableau IV : Pathotypes de *E. coli* en fonction des signes cliniques et des facteurs de virulence (67)

Pathotypes	Pathologie	Interaction avec les entérocytes	Toxines
EPEC	Diarrhée aqueuse	Grêle proximal Adhésion (CFA...) Pas de lésion de la muqueuse Plasmide	LT ST
EPEC	Diarrhée aiguë et chronique	Grêle proximal Adhésion localisée (eae, bfp...) Lésions de la muqueuse sans invasion Plasmide EAF	-
EHEC	Diarrhée sanglante Colite hémorragique SHU	Côlon Adhésion (eae) Lésion de la muqueuse sans invasion	STX
EIEC	Dysenterie	Grêle distal, cæcum, côlon Invasion et multiplication dans les entérocytes Plasmide de virulence (plnv)	Sh ET2
EaggEC	Diarrhée aiguë et chronique Diarrhée des voyageurs	Adhésion (AAF) Plasmide 60Md	EAST
	Diarrhée aiguë et chronique	Adhésion (AIDA)	—

DAEC	Diarrhée des voyageurs		
------	------------------------	--	--

5-1-MECANISMES PATHOGENIQUES DE *E. coli*

Les mécanismes du pouvoir pathogène des différents pathotypes de *E. coli* sont très divers et leur virulence est multifactorielle. L'adhésion bactérienne aux entérocytes représente l'étape préliminaire à l'expression du pouvoir pathogène, permettant aux bactéries de résister au péristaltisme intestinal. Après cette étape d'adhésion, l'expression de la virulence est variable selon le pathotype. Plusieurs types d'interactions avec les entérocytes ont été décrits: invasion avec multiplication modifiant le métabolisme cellulaire (EIEC), production de toxines protéiques (ETEC), transduction de signal (EPEC, EHEC) (**25, 28**).

5-1-a-ETEC

Le pouvoir pathogène des ETEC est associé à la production de toxines. La première étape est l'adhésion à la bordure en brosse, au sommet des micro villosités, par l'intermédiaire de facteurs d'attachement favorisant la colonisation de l'intestin grêle et plus spécialement sa portion jéjunale et duodénale. Cependant, les micro villosités restent intactes.

Une quinzaine de facteurs d'adhésion, appelés CFA, sont actuellement décrits et associés à des sérotypes particuliers. Certains facteurs d'adhésion présentent une structure de type rigide à la surface bactérienne (CFA/I ; CFA/II ; CFA/III ; CFA/IV ; CS1 ; CS2 ; CS4 ; CS5 ;), d'autres sont constitués de fibrilles flexibles (CS3) (**22**).

Un nouveau facteur présumé de colonisation (PCF02) a été identifié chez certaines souches d'ETEC. (**77**).

Les opérons codant pour ces adhésines sont localisés sur un plasmide, et leur expression est soumise à l'action d'activateurs de transcription d'origine chromosomique. Une fois fixée, les bactéries vont produire une toxine cytotonine (LT ou ST) provoquant une sécrétion intestinale accrue d'eau et d'électrolytes sans altération de la muqueuse intestinale (Figure 1).

Deux types de cytotonines ont été décrits; l'un thermostable (ST), l'autre thermolabile (LT).

Une souche peut produire l'une et/ ou l'autre toxines. Les gènes de structure des entérotoxines ST et LT sont localisés sur des plasmides de haut poids moléculaire pouvant également porter les CFA.

La toxine thermostable ST est essentiellement produite par les ETEC mais aussi par d'autres bactéries(*Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* et *Vibrio cholerae*).

Il en existe deux types: STa produite par des souches d'origine humaine, et STb produite par les souches d'origine porcine. Sta, de structure monomérique, est constituée de 19 résidus aminés. Elle entraîne la stimulation d'une guanylate-cyclase cellulaire localisée essentiellement au niveau apical de la bordure en brosse des villosités entraînant une augmentation intra cellulaire de GMPc bloquant l'absorption des ions chlorure avec inhibition de l'absorption des ions sodium à l'origine de l'importante fuite hydrique (**70, 25**).

La toxine thermolabile LT présente une structure plus complexe, proche de celle de la toxine cholérique. Il existe deux types de toxines LT: LT/I retrouvée chez les souches humaines et LT/II retrouvée chez l'animal.

La toxine LT/I est constituée de l'assemblage d'une sous-unité toxique A et de 5 sous-unités B responsables de la fixation aux cellules épithéliales via les gangliosides GM1, GD1 et quelques glycoprotéines intestinales. Une partie de la sous-unité A est capable, après internalisation, de stimuler l'adénylate-cyclase cellulaire, située au niveau des membranes baso-latérales des cellules cryptiques, entraînant secondairement une fuite hydrique des cellules épithéliales vers la lumière intestinale (**70, 25**).

5-1-b-EPEC

Le pouvoir pathogène des EPEC se caractérise par une adhésion spécifique entre la cellule bactérienne et la surface de l'entérocyte. Cette adhésion s'effectue en deux temps. Initialement, les bactéries se lient aux entérocytes à distance par l'intermédiaire de fimbriae de type IV, les pili BFP dont les gènes sont situés sur un plasmide EAF de 60 à 70Mda. Puis, dans un deuxième temps, on

note une adhésion étroite à la bordure en brosse des entérocytes qui s'accompagne d'une destruction de celle-ci sans invasion cellulaire. Ce phénomène est décrit sous le nom d'attachement-effacement A/ E. Ces lésions sont associées aux produits de différents gènes situés sur un locus chromosomique LEE (**69**).

Le gène *eae* code pour une protéine de membrane externe, l'intimine, responsable de l'adhésion étroite avec les cellules épithéliales. Au voisinage de ce gène *eae*, le gène *tir* code pour un récepteur cellulaire de l'intimine, la protéine Tir, transloquée dans la cellule hôte via le système de sécrétion de type III. Les gènes *espA*, *espB* et *espD* codent pour les protéines EspA, EspB et EspD impliquées dans la transduction de signal. Les gènes *esc* et *sep* codent pour des composants du système de sécrétion de type III. Ces signaux stimulent la phosphorylation des protéines du cytosquelette ainsi qu'un influx d'inositol-triphosphate et de calcium. Ces phénomènes aboutissent à la polymérisation des filaments d'actine entraînant la formation d'un piédestal sur lequel viennent adhérer les bactéries de façon étroite par l'intermédiaire de l'intimine (Figure 2).

L'interaction bactérie-cellule, désignée sous le terme "effet d'attachement et d'effacement" (EAE), a un double effet: la destruction des micro villosités (ou effacement) et l'attachement à la membrane apicale de l'entérocyte, phénomène induisant la transmigration des polynucléaires neutrophiles (**70, 34**).

Les signes cliniques associés aux EPEC seraient le résultat de plusieurs mécanismes: sécrétion accrue d'ions chlorure probablement liée à l'activation de la protéine kinase C et destruction des micro villosités, responsable d'une diminution de l'absorption cellulaire. Une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal due à une diminution de la résistance trans-épithéliale ainsi que la migration de neutrophiles à travers l'épithélium contribueraient également à l'apparition des symptômes.

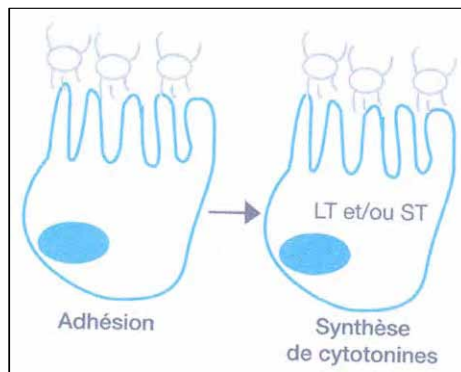


Figure 1: Mécanisme d'action des ETEC d'après Natarro et Demers(70, 25)

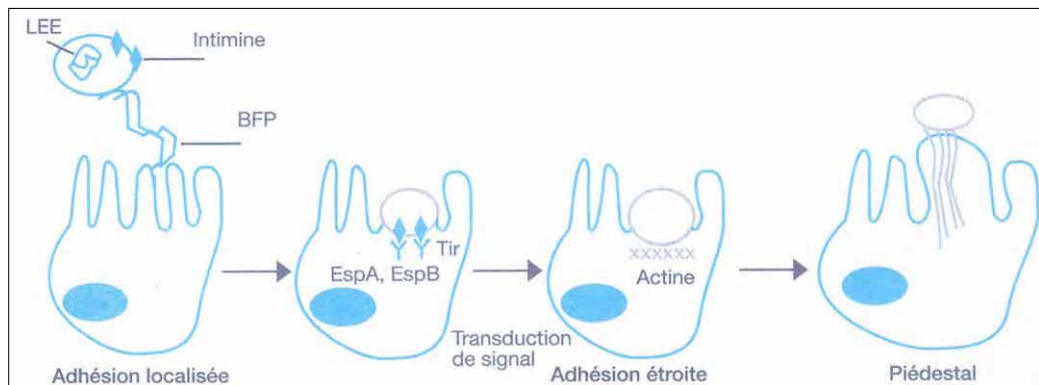


Figure 2: Mécanisme d'action des EPEC d'après Natarro et Demers(70, 25)

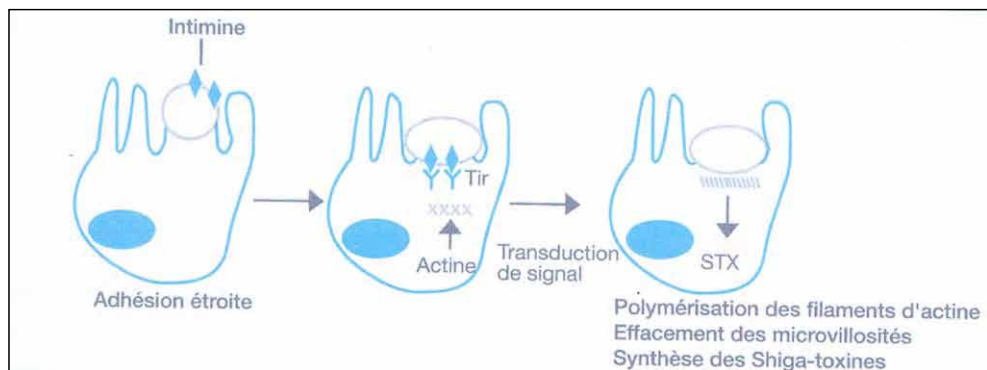


Figure 3 : Mécanisme d'action des EHEC d'après Natarro et Demers(70, 25)

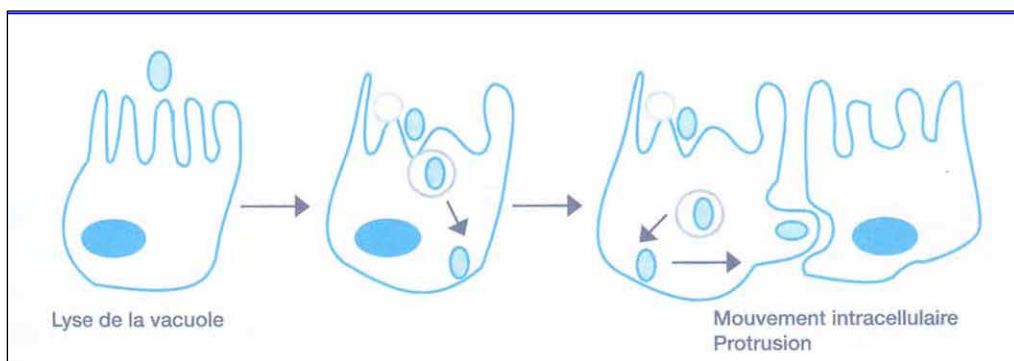


Figure 4: Mécanisme d'action des EIEC d'après Natarro et Demers(70, 25)

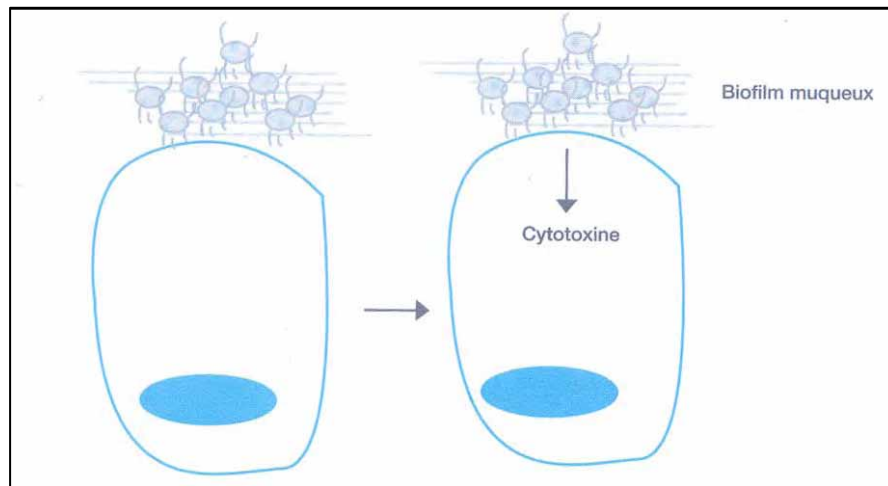


Figure 5: Mécanisme d'action des EaggEC d'après Natarro et Demers(**70, 25**)

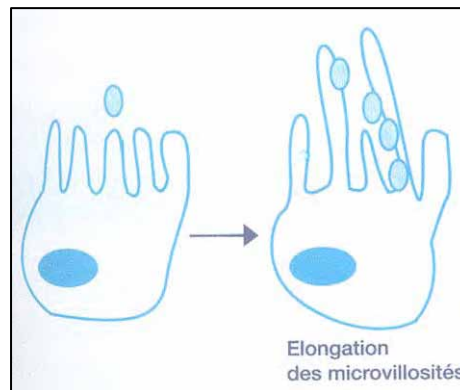


Figure 6: Mécanisme d'action des EAEC d'après Natarro et Demers(**70, 25**)

5-1-c-EHEC

Contrairement aux EPEC, le mode d'adhésion initial des EHEC à la muqueuse intestinale sous la dépendance d'un plasmide de 60Mda est encore mal connu. Les pili ne sont pas retrouvés chez les EHEC. Ces lésions sont associées aux produits de différents gènes situés sur le LEE. Cependant, chez les EHEC, la formation du piédestal n'est pas corrélée à la phosphorylation des protéines cellulaires mais à un signal de transduction encore mal connu. Après l'étape d'adhésion, la multiplication des EHEC au niveau du colon s'accompagne de la synthèse de cytotoxines capables de diffuser dans tout l'organisme (Figure 3). Ces vérotoxines (VT) ou Shiga like toxines (SLT), du fait de leur parenté avec la toxine de Shiga produite par *Shigella dysenteriae* type1, sont caractérisées par leur effet cyto pathogène sur certaines lignées cellulaires (cellules Vero, Hela,

KB). Deux toxines ont été décrites SLT1 et SLT2. Des variants de SLT2 ont également été décrits. Les EHEC produisent SLT1 et SLT2. SLT1 présente 99% d'homologies avec la toxine de Shiga. SLT2 n'a que 55% d'homologies avec SLT1 et en est immunologiquement distincte (72).

La synthèse de ces toxines est codée par des bactériophages tempérés, contrairement à celle de la toxine de Shiga codée par le chromosome.

Ce sont des toxines de type A-B constituées d'une sous-unité A (32Kda) responsable de l'activité toxique et de 5 sous-unités B (7,7Kda) permettant la liaison de la sous-unité A à son récepteur spécifique glycolipidique, le globotriosylceramide (GB3). Ce récepteur est présent à la surface des entérocytes et au niveau des membranes des cellules endothéliales, en particulier des capillaires rénaux du colon, du pancréas et du système nerveux central expliquant ainsi le tropisme tissulaire de ces toxines.

Dans le modèle proposé par O' BRIEN (72), après liaison de la toxine au récepteur, la membrane s'invagine et forme une vésicule. Une acidification de son contenu se produit et la sous-unité A est réduite et libère un fragment A1 dont le site d'action est la sous-unité 60S ribosomale. Le fragment A1 est une N-glycosidase inhibant la transcription de l'ARNm, d'où un arrêt de la synthèse protéique. Les SLT jouent un rôle prépondérant dans la physiopathologie du SHU (70, 34, 22, 82, 57, 89).

Le lipopolysaccharide (LPS) de *E. coli* semble jouer également un rôle important dans la physiopathologie des infections à EHEC, notamment dans la mobilisation et la stimulation des polynucléaires avec mise en jeu du système du complément et des bradykinines. L'hémolysine pourrait avoir une action synergique à celle des toxines SLT, en stimulant la production de cytokines. L'activation monocyte macrophage entraîne la production de différentes cytokines en particuliers le TNF α et l'interleukine 1 β qui agissent en synergie avec les SLT sur les cellules endothéliales. Le taux élevé de TNF α , dû à la production de SLT et/ ou à l'endotoxine circulante entraîne une augmentation des récepteurs Gb3 à la surface des cellules endothéliales vasculaires.

L'action combinée des SLT, de l'endotoxine, des poly nucléaires et des différentes cytokines serait à l'origine des lésions de micro angiopathie thrombotique glomérulaire ou de nécrose corticale retrouvée au cours du SHU.

5-1-d-EIEC

Les EIEC regroupent des sérotypes particuliers (O28, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152, O164, O167) et présentent des caractéristiques métaboliques proches de celles de *Shigella* (immobilité, absence de fermentation du lactose, absence de production de gaz, absence de lysine décarboxylase) (**70**).

L'élément majeur du pouvoir pathogène des EIEC est leur capacité d'invasion de l'épithélium intestinal au niveau du colon induisant une réaction inflammatoire locale intense. Ce qui est à l'origine du syndrome dysentérique caractérisé par des crampes intestinales et souvent des selles afécales marquées par la présence de sang, de pus et de mucus, avec fièvre. Cette symptomatologie caractéristique est liée à la formation de multiples abcès intra muqueux dans la lumière recto colique entraînant une importante destruction tissulaire prédominant au niveau du colon sigmoïde et du rectum. La pénétration dans les cellules épithéliales s'effectue par macro pinocytose. Le plasmide d'invasion (pInv) contrôlé par des gènes chromosomiques est nécessaire à l'entrée des bactéries dans l'épithélium intestinal. Ce plasmide d'invasion(pInv) est un système multi génique complexe codant pour quatre protéines immunogènes chez l'hôte. Ipa B et Ipa C sont des invasines. Ipa B est l'hémolysine de contact qui permet la lyse de la vacuole de phagocytose. Ce qui favorise la croissance intra cellulaire rapide, la colonisation de l'ensemble du cytoplasme et le passage d'une cellule à l'autre grâce à l'utilisation du cytosquelette de la cellule envahie comme chez *Shigella* (**82**).

Un premier type de mouvement permet un glissement de la bactérie le long des filaments d'actines organisés et polarisés assurant ainsi la colonisation de la cellule infectée. Ainsi, une

protrusion de bactéries induite par une comète d'actine, pénètre la cellule adjacente après lyse de la double membrane. Ce qui entraîne la libération de la bactérie dans une nouvelle cellule (Figure 4). Ce processus de colonisation permet à la bactérie de progresser de cellule en cellule tout en restant protégée des défenses de l' hôte (**70, 25, 82**).

Il est probable que les EIEC, comme *Shigella*, pénètrent la muqueuse intestinale par l'intermédiaire des cellules M et entraînent la mort des macrophages résidents par apoptose induite par Ipa B. Cela s'accompagnerait d'une libération massive d'interleukine 1, à l'origine de la réaction intense observée lors des dysenteries.

Les EIEC produisent également une entérotoxine ShET2 (63Kda) codée par un gène (sen) porté par le plasmide (**70**).

5-1-e-EaggEC

Ce pathotype est à l'origine de diarrhées sporadiques ou épidémiques dans les pays en voie de développement. Il est également responsable d'une diarrhée aqueuse persistante (>14jours) sans fièvre, ni vomissements associés (**70**).

Une adhésine appelée "aggregative adherence factor " (AAF/I), d'origine plasmidique, est impliquée dans l'adhérence bactérienne et est codée par deux groupes de gènes portés par un plasmide de 60Mda. Une seconde adhésine AAF/II a également été identifiée. Apparentées aux adhésines de la famille Dr- utilisant comme récepteurs, différents épitopes des antigènes de surface du groupe sanguin Dr-, ces fimbriae s'assemblent en fagots à la surface de cellules en culture et de la muqueuse intestinale humaine selon un mécanisme non encore déterminé, avec formation d'un bio film muqueux (Figure 5) (**70, 33**).

Certaines souches d'EaggEC synthétisent également une toxine thermostable EAST1 (**70**).

Proche de la toxine thermostable des ETEC, cette protéine de 38 acides aminés induit également une activation de guanylate-cyclase et contribuerait ainsi au développement de diarrhées (**70, 33**)

5-1-f-DAEC

Ces bactéries semblent être responsables de diarrhées persistantes dans les pays industrialisés. Il semble qu'il existe un facteur âge dans le déclenchement de ces diarrhées (la tranche d'âge 4-5 ans y serait plus sensible) (**54**).

Aucune toxine n'a été mise en évidence dans ce pathotype. Deux facteurs d'adhésion ont été isolés: des protéines de membrane externe (dénommées AIDA) et des adhésines de nature fimbriale, dont la première décrite, F1845, appartient à une famille d'adhésines désignée Dr-. Cette famille inclut entre autre les adhésines afa des *E. coli*, causes d'infections urinaires. Le pathotype DAEC pourrait être le réservoir des souches uropathogènes. Ces souches induiraient également chez la cellule, l'élongation des micro villosités mettant ainsi la bactérie à l'abri des défenses de l'hôte (Figure 6) (**70**).

L'implication de ce pathotype en pathologie digestive reste encore à démontrer.

5-1-g-AUTRES PATHOTYPES

D'autres pathotypes ont été récemment décrits (**70**):

- . *E. coli* producteurs de facteurs cyto nécrotiques et nécrosants (CNF);
- . *E. coli* producteurs de cytotoxines létales par distension cellulaire (CLDT);
- . *E. coli* producteurs d'hémolysine ayant la capacité de détacher un tapis de cellules Hela en culture (CDEC);

Le rôle de ces trois pathotypes dans les manifestations cliniques chez l'homme reste à préciser.

2 LES ENTERITES A *E. coli*

Les manifestations cliniques des infections digestives liées à *Escherichia coli* sont fonction des types de *E. coli* infectants. Le signe commun est la diarrhée qui se définit classiquement par une augmentation du poids des selles > à 1% du poids du corps. En fait, c'est essentiellement le nombre des selles, leur consistance (molle ou liquide) et leur aspect sanglant ou non, contenant

du mucus ou du pus, qui permettent de la définir et surtout d'orienter vers le type de *E. coli* responsable, à prédominance entérotoxinique ou à caractère invasif (**65, 17**).

5-2-a-Les diarrhées à ETEC

Elles ne se voient que dans deux circonstances: dans les pays en voie de développement, dans des zones endémiques où la transmission se fait par les aliments et l'eau et touche les nourrissons au sevrage ainsi que, dans ces mêmes pays, lors d'un voyage d'une personne provenant d'un pays non contaminé (diarrhée des voyageurs) où l'ETEC peut être responsable de 40% des cas de ces diarrhées. Le début de la diarrhée est brusque avec une incubation courte de 14 à 36 heures se traduisant essentiellement par une diarrhée sécrétoire variable d'un individu à l'autre, minime à majeure (type cholériforme). Habituellement, elle ne s'accompagne pas de fièvre ni de signe extra digestif en dehors d'une éventuelle déshydratation à rechercher systématiquement, en particulier chez le nourrisson (**16**).

5-2-b-Les diarrhées à EPEC

Appelées antérieurement "coli pathogène ", elles touchent essentiellement les nourrissons de moins de 2 ans et surtout de moins de 6 mois. Elles sont présentes essentiellement dans les pays en voie de développement, encore que leur fréquence dans les pays développés peut être sous-estimée. La contamination est surtout féco-orale. Il s'agit d'une diarrhée sécrétoire et de malabsorption qui peut être banale ou sévère, réalisant une véritable diarrhée grave prolongée (**65, 78**).

Elle s'accompagne fréquemment de fièvre modérée et de vomissements. Dans les cas prolongés la biopsie intestinale proximale révèle l'aspect histo pathologique caractéristique (**16**).

5-2-c-Les diarrhées à EAEC

Elles surviennent surtout chez le nourrisson dans les pays en voie de développement. Leur tableau clinique est similaire à celui des diarrhées à EPEC (**65**).

5-2-d-Les diarrhées à EHEC

Elles sont de découverte plus récente (1983) (**77, 56**) et touchent essentiellement les pays développés. Le réservoir en est le tube digestif du bétail et, en particulier, la viande de bœuf contaminée notamment dans les collectivités de restauration (fast food). Elles se caractérisent essentiellement et typiquement par une diarrhée sécrétoire puis sanglante, mais ce dernier caractère peut être inconstant. Elle peut toucher aussi bien l'adulte que l'enfant. L'incubation est de 4 à 5 jours. Elle s'accompagne de douleurs abdominales, de vomissements et de fièvre. Elle dure environ 4 à 15 jours. La guérison est habituelle. Cependant, chez environ 10% des enfants de moins de 10 ans et chez les personnes âgées, la maladie se complique d'un syndrome hémolytique et urémique associant une anémie hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale. Si le traitement approprié permet dans la plupart des cas, une résolution sans séquelle, 3 à 5% évoluent vers le décès et 12 à 30% ont des séquelles telles que hypertension artérielle, insuffisance rénale chronique ou séquelles nerveuses (**43, 75**).

Outre les âges extrêmes de la vie, les facteurs favorisant du SHU sont la sévérité de la diarrhée et son caractère sanglant, les traitements ralentisseurs du transit et, pour certains auteurs, les antibiotiques (**19**).

5-2-e-Les diarrhées à EIEC

Elles sont proches des diarrhées à *Shigella* du fait de sa pathogénicité. Leur incidence semble faible en particulier dans les pays développés. Le plus souvent, il s'agit d'une diarrhée sécrétoire mais, dans un petit nombre de cas (7%), elle se traduit par un tableau dysentérique avec fièvre, douleurs abdominales, ténésmes et diarrhée sanglante (**65**).

Outre les caractéristiques de la diarrhée (nombre de selles et importance, caractère sanglant ou non), l'existence de signes de gravité sera recherchée de façon systématique afin d'orienter l'attitude thérapeutique. Ainsi seront précisés notamment l'âge (< 3 mois), l'existence d'une fièvre, d'un tableau toxi-infectieux, de signes de dénutrition sévère, de déshydratation et de co-

morbidité associée telle que déficit immunitaire acquis ou primitif, drépanocytose, autre foyer infectieux. En fonction de ces critères, pourront être décidés une hospitalisation, des bilans étiologiques et coprologiques complémentaires. Ces critères sont également essentiels pour la décision d'un traitement médicamenteux associé, notamment antibiotique (16).

4 REPONSE IMMUNITAIRE

La prolifération bactérienne au contact et éventuellement à l'intérieur de l'épithélium intestinal déclenche une réponse immunitaire spécifique. Il s'agit d'une réponse de type anticorps d'abord localisée à la muqueuse et composée principalement d'IgA sécrétoires dont la fonction serait d'empêcher la fixation des bactéries à la muqueuse, et probablement de faciliter la destruction par les phagocytes (opsonines). Les bactéries envahissantes induisent également une infiltration tissulaire intense par de nombreux polynucléaires neutrophiles qui détruisent les bactéries dans la muqueuse intestinale. Une réponse immunitaire systémique est détectable dans les jours qui suivent la diarrhée, avec apparition d'anticorps sériques anti-O et anti-H et d'anticorps anti-toxine dont le rôle dans la guérison n'est pas encore clairement défini. Il a été bien démontré chez l'animal que l'immunité est transférable aux nouveau-nés par le colostrum et le lait maternel (7)

VI. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

6-1 PRELEVEMENT

La nature du prélèvement varie selon les manifestations cliniques: selles, urines, liquide céphalo-rachidien, sang, pus, liquide articulaire...(11)

6-2 ISOLEMENT

E. coli, comme toutes les entérobactéries, ne présente pas d'exigences particulières pour sa culture. L'isolement et le repiquage sont réalisés sur des milieux ordinaires tels que la gélose nutritive ou la gélose lactosée au bromocrésol pourpre (BCP). Les colonies sont rondes, lisses, à

bord régulier, avec un diamètre de 2-3 mm après 18 heures d'incubation à 37°C. On peut rencontrer des mutants, cultivant sous forme naine, très peu visibles sur les milieux déficients en facteurs de croissance.

L'isolement de *E. coli* à partir des prélèvements poly microbiens est effectué à l'aide de milieux sélectifs :

-la gélose Mac Conkey est utilisée pour l'isolement de *E. coli* à partir des liquides biologiques et des denrées alimentaires. *E. coli* se présente sous l'aspect de colonies rouges entourées d'un halo opaque dû à la précipitation de sels biliaries.

-la gélose Drigalski et la gélose EMB peuvent être utilisées pour l'isolement de *E. coli* à partir des selles. L'aspect des colonies est alors caractéristique: jaunes dans le premier cas, plates bleues foncées avec un éclat métallique en lumière réfléchie dans le second.

Des milieux récemment décrits tels que la gélose Mac Conkey supplémentée par du β -glucuronide, permettent une identification présomptive de *E. coli* à partir d'une primo culture (**24**, **48**) par détection de l'activité β -glucuronidase présente chez 94% des souches (**60**)

6-3 IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

L'identification de *E. coli* au laboratoire repose sur un ensemble de tests biochimiques. Ceux-ci sont actuellement miniaturisés et commercialisés sous forme de systèmes prêts à l'emploi : Kits, matériels pour automates (**50**).

Ils permettent la caractérisation des espèces de *E. coli* isolées dans les laboratoires de bactériologie clinique de façon aisée et précise (**58**).

La galerie API 10E est également suffisante pour l'identification des souches typiques d'*E. coli*. La galerie API 20E largement utilisée et les autres systèmes tels que Enterotube Enteric-Tek et Miniték permettent le diagnostic d'espèce après 18 à 24 heures d'incubation. Avec la galerie API20EC spécialement adaptée à l'étude des bactéries coliformes, il est possible de séparer les différentes espèces appartenant au genre *Escherichia*. Des systèmes automatisés

peuvent être également utilisés (ATB 32GN, API System, réf 3210 ; auto bac IDX Organon ; Vitek bio Mérieux). Ils présentent les mêmes performances que les précédents. D'autres systèmes permettent d'obtenir une identification précise en 4 heures à partir d'un milieu d'isolement (**3, 51, 52**) : Rapid 20^E, Quintet 34 Enterobacteriaceae, Micro ID system

6-4-IDENTIFICATION DES FACTEURS DE PATHOGENICITE

6-4-1 ETEC

L'identification spécifique des adhésines est peu intéressante du fait de leur grande diversité et parce qu'elles sont aussi partagées par d'autres pathovars.

-Le sérogroupage ou le sérotypage est possible, mais n'est pas conseillé à cause de la grande variabilité des sérotypes et de l'instabilité des plasmides contrôlant le pouvoir pathogène de certains sérotypes.

-La détection des toxines thermolabile et thermostable produites peut s'effectuer de différentes façons selon les moyens du laboratoire :

- L'entérotoxine thermostable non immunogène ST peut être détectée par :
 - épreuve sur souriceau nouveau-né par inoculation intra gastrique du surnageant de culture ;
 - PCR du gène ST ;
 - Hybridation avec sonde oligo nucléotidique ST.
- Les entérotoxines thermolabiles LT/I et LT/II peuvent être détectées et identifiées par :
 - Séro neutralisation de l'effet cyto pathogène sur cellules Y1 de surrénales de souris ;
 - Méthode immuno enzymatique ELISA, utilisant le récepteur de la toxine, le ganglioside GM1 ;

- Erythro dosage de l'entérotoxine LT ;
- Agglutination de particules de latex sensibilisées ;
- PCR du gène LT ;
- Hybridation avec sonde oligo nucléotidique LT

6-4-2 EHEC

Comme le sérotype O157 : H7 est le plus fréquemment isolé, il est aussi le plus recherché dans les selles. Les souches ont des caractères identiques à la plupart des *E. coli* et fermentent le lactose. Par contre 80 à 95% des O157 : H7 isolés des selles humaines ne fermentent pas le sorbitol rapidement en 24 heures (plus de 90% des *E. coli* le fermentent) ; 92 à 96% ne produisent pas de β -glucuronidase. Leur croissance est faible à 44-45°C, température utilisée pour la détection des coliformes dans l'eau et les aliments. La présence des vérotoxines n'a pas été observée chez les *E. coli* O157 : H7 avec des antigènes somatiques H différents de H7 ; toutefois, beaucoup de souches immobiles ayant perdu leurs antigènes flagellaires produisent des vérotoxines (39).

Ces nouvelles bactéries obligent le bactériologiste à reconsidérer les techniques d'identification à but de diagnostic : détection de vérotoxines libres, mise en évidence des gènes de vérotoxines, d'attachement et effacement (*eae*), de l'entéro hémolysine, recherche d'anticorps dirigés contre différents lipopolysaccharides. Ces techniques sont parmi les plus performantes actuellement (39).

6-4-2-a-Recherche de souches STEC possédant les gènes Stx et d'activité cytotoxique isolement et identification biochimique

- Isolement sur gélose Mac Conkey Sorbitol (SMAC) additionné de céfixime, rhamnose ou de tellurite avec identification des colonies ne fermentant pas le sorbitol (mais certaines souches O157 : H7 et les STEC non O157 fermentent le sorbitol)

- Réaction utilisant le milieu contenant le substrat 4-méthyl umbelliféryl-β-D-glucuronidase (MUG) en composé fluorescent (les colonies O157 : H7 sont négatives)
- Agglutination avec les sérums O157 et H7 (mais la co-agglutination avec d'autres bactéries est possible avec *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii* et *Escherichia hermannii*). Les tests d'agglutination au latex permettent l'identification de *E. coli* sérotype O157 (OXOID).
- Séparation immuno magnétique avec Dynabeads anti-*E. coli* O157.
- Détection par immuno fluorescence directe des O157 : H7.
- Agglutination si possible avec d'autres sérums (O126 : H11, O103 : H2, O111)

Activité cytotoxique

- Recherche directe d'activité cyto toxique libre dans les selles sur culture cellulaire Vero ou Hela et séro neutralisation avec un sérum anti-SLT. C'est la technique de référence mais elle est lourde à mettre en œuvre.
- Détection de la toxine SLT par méthode immuno enzymatique ELISA, utilisant leur récepteur, le globotriosyl céramide Gb3.

6-4-2-b-Techniques moléculaires de détection de facteurs de pathogénicité des STEC

La détection par PCR des différents gènes de pathogénicité à partir des souches pures ou de selles totales associée à l'isolement de souches pathogènes en cause permet de confirmer le diagnostic (figure 7) (5)

- Détection des gènes *slt1*, *slt2* par PCR (souches et selles) (5)
- Détection du gène *eaeA* par PCR (souches et selles)
- Détection du gène EHEC-*hly* par PCR (souches et selles)

Plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats de la PCR comme un prélèvement inadéquat, le mode de transport, l'intervalle entre le début de la diarrhée et le prélèvement, les congélations et décongélations.

- Détection de souches STEC par hybridation sur colonies avec sonde oligo nucléotidique spécifique des gènes *slt*, *eaeA* et EHEC-*hly* (détection de 1000 bactéries STEC/g de selles).

La stratégie d'isolement et de détection de souches STEC montrée dans la figure (7)

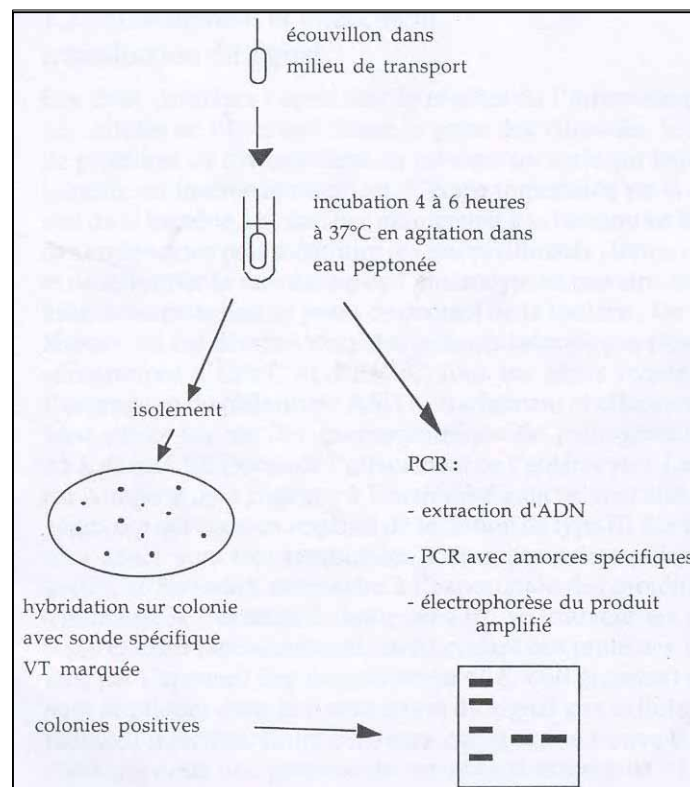


Figure 7 : Protocole pour la recherche de souches possédant les gènes codant les vérotoxines.

6-4-2-c- Contrôle des souches isolées et sérodiagnostic

Pour chaque souche isolée, l'identification biochimique, le sérotypage et la PCR pour la détection des gènes de pathogénicité sont indispensables, ainsi que la recherche d'anticorps spécifiques anti-lipopolysaccharides anti-LPS .

6-4-3 EIEC

L'identification des souches EIEC repose surtout sur le pouvoir pathogène expérimental, la culture cellulaire et le sérotypage :

- Sérogroupe somatique car la majorité des souches sont immobiles ;
- épreuve de Séréný ou Kérato conjonctivite expérimentale chez le cobaye ou le lapin qui est la méthode de référence ;
- épreuve d'invasion sur cellules Hela.

Mais de plus en plus, des méthodes moléculaires plus facilement applicables se développent avec

- la détection du gène *ial* par PCR ;
- l'hybridation avec sonde oligo nucléotidique spécifique du gène *ial* ;
- la détection du gène codant l'antigène Ipah par PCR ;
- l'hybridation avec sonde oligo nucléotidique spécifique du gène Ipah ;
- la détection du gène *sen* codant une entérotoxine.

Tous les EIEC contiennent une séquence IS630 commune avec *Shigella* qui peut être détectée par PCR (39).

6-4-4 EPEC

Le diagnostic est réalisé par recherche :

- du profil d'adhésion localisée sur cellules Hep-2 ;
- du sérogroupe ou du sérotype: après 18 heures d'incubation à 37°C, cinq colonies suspectes (*E coli* lactose positif) sont agglutinées avec un sérum monovalent, contenant des anticorps dirigés contre les 9 sérotypes les plus fréquents en Europe. Une agglutination positive avec le sérum monovalent n'a qu'une valeur d'orientation et elle doit être confirmée en utilisant les sérums monovalents spécifiques.

On peut aussi effectuer différentes méthodes:

- technique de coloration de l'actine fluorescente (FAS test) ;

- détection du gène eae « attachement et effacement » par PCR (souches et selles) ;
- détection du gène bfp par PCR ;
- détection des souches par hybridation sur colonies avec sonde EAF ou BFP et eae.

6-4-5 EaggEC ou AAEC

Il est réalisé par les méthodes suivantes :

- profil d'adhésion agrégatif sur cellules Hep-2, ou sur lame de verre ;
- hémagglutination d'hématies de rats en présence de D-mannose ;
- détection du gène ast A de l'entérotoxine thermostable 1 (EAST1) par PCR ;
- détection du gène agg A codant les fimbriae 1 (AAF/I) par PCR ;
- hybridation avec sonde plasmidique de 60Mda (**39**).

6-4-6 DAEC

Il est réalisé par :

- détection du gène *afa* par PCR ;
- profil d'adhésion diffuse sur cellules Hep-2 ;
- hybridation avec sonde AIDA pour confirmation. (**39**)

VII. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES ET TRAITEMENT

Le comportement de *E. coli* vis-à-vis des antibiotiques apparaît stable. En effet, les fréquences de résistance ont peu varié depuis une vingtaine d'années et ces souches sont d'autre part peu touchées par les résistances acquises. D'une manière générale, 30 à 50% des souches sont résistantes à l'ampicilline par production d'une β -lactamase d'origine plasmidique, 15% résistent au cotrimoxazole et 20% aux sulfamides. *E. coli* est sensible aux céphalosporines de 2^e et 3^e générations bien que des β -lactamases à spectre élargi inactivant le céfotaxime ou la ceftazidime aient été décrites parmi les bacilles à Gram négatif (**47, 86**).

Ils sont sensibles également aux aminosides, excepté la kanamycine et aux quinolones (5 à 7% des souches sont résistantes à l'acide nalidixique). La sensibilité des souches de *E. coli* isolées en ville et à l'hôpital est à peu près identique (**21, 66, 88**).

Dans les cas de diarrhées à *E. coli*, l'emploi des antibiotiques ne sera réservé qu'aux cas graves (**59**), la ré équilibration hydro électrolytique demeurant le principal traitement.

VIII. PREVENTION

La prévention des infections digestives à *E. coli* repose essentiellement sur des mesures hygiéno-diététiques. Concernant EPEC et la prévention de la diarrhée des « voyageurs », la prescription d'antibiotiques n'est pas indiquée du fait de l'émergence de souches résistantes. En revanche, il est recommandé en cas de voyage en zone endémique d'éviter l'eau et les crudités qui risquent d'être contaminées. Il a été également proposé l'utilisation des silicates ou du substantive de bismuth (interdit en France). Certaines souches de probiotiques seraient également efficaces (**17**)

Les mêmes mesures préventives peuvent être suggérées pour l'EAEC en zone endémique.

Pour les souches EPEC et EIEC, la contamination étant essentiellement féco-orale, leur prévention repose essentiellement sur l'hygiène en particulier dans les collectivités (crèches et hôpitaux). De même, les silicates pourraient être efficaces. La prévention des infections à EHEC repose sur les mesures d'hygiène pour éviter la contamination inter humaine et la surveillance vétérinaire des restaurations collectives (**70, 17**).

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

I. CADRE DE L'ETUDE

1-1-SERVICE DE PEDIATRIE DE H.A.L.D

Les selles ont été collectées au service de Pédiatrie de l'hôpital Aristides Le Dantec de décembre 2001 à avril 2002. Elles proviennent d'enfants âgés de 0 à 12 ans.

1-2-LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE EXPERIMENTALE DE L'INSTITUT PASTEUR DE DAKAR

L'étude a été réalisée au laboratoire de bactériologie expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar.

1-3-POPULATION D'ETUDE

Deux groupes ont été constitués :

- Enfants consultant pour diarrhée : groupe malade
- Enfants consultant pour une autre pathologie : groupe témoin

TABLEAU DES INCLUSIONS CHEZ LES ENFANTS DIARRHEIQUES

REF	SEXE	AGE	ASPECT/SELLES	NOMBRE <i>E. coli</i>
D01	F	24 mois	Liquide, verdâtre, mucus	8
D02	M	24 mois	Molle, verdâtre, mucus	10
D03	M	5 mois	Pâteuse, mucus	5
D04	M	2 mois	Semi-liquide, mucus	5
D05	M	10 mois	Molle, verdâtre, mucus	5
D06	M	7 mois	Molle, verdâtre, mucus	4
D07	M	24 mois	Molle, verdâtre, mucus	4
D08	F	10 mois	Pâteuse, mucus	5
D09	F	18 mois	Pâteuse, mucus	1
D10	M	1 mois	Pâteuse, mucus	5
D11	F	24 mois	Pâteuse, mucus	5
D12	M	1 mois	Pâteuse, mucus	5
D13	M	4 mois	Pâteuse, mucus	2
D14	M	11 mois	Pâteuse, mucus	5
D15	F	1 mois	Pâteuse, mucus	9
D16	M	8 mois	Pâteuse, mucus	4
D17	M	8 mois	Molle, verdâtre, mucus	10
D18	M	12 mois	Molle, verdâtre, mucus	6
D19	F	10 mois	Molle, verdâtre, mucus	9
D20	M	6 mois	Liquide, verdâtre, mucus	9
D21	F	3 mois	Molle, verdâtre, mucus	10
D22	F	14 mois	Molle, verdâtre, mucus	10
D23	F	2 mois	Pâteuse, mucus	7
D24	M	2 mois	Pâteuse, mucus	2
D25	M	4 mois	Liquide, verdâtre, mucus	6
TOTAL				150

TABLEAU DES INCLUSIONS CHEZ LES ENFANTS TEMOINS

REF	SEXE	AGE	NOMBRE DE <i>E. coli</i>
S001	F	12 mois	2
S002	F	12 mois	10
S003	F	144 mois	7
S004	F	96 mois	10
S005	M	18 mois	2
S006	M	3 mois	8
S007	M	2 mois	2
S008	M	24 mois	6
S009	F	1 mois	6
S010	F	1 mois	5
S011	M	36 mois	5
S012	F	132 mois	6
S013	M	15 mois	7
S014	M	19 mois	14
S015	M	7 mois	5
S016	F	1 mois	5
S017	M	4 mois	5
S018	M	6 mois	6
S019	M	15 mois	6
S020	M	1 mois	9
S021	M	36 mois	8
TOTAL			124

II. MATERIELS ET METHODES

2-1-MATERIELS

Pour tout sujet recruté, il est réalisé un prélèvement de selles accompagné d'un numéro d'identification. Ce numéro est précédé de la lettre D pour les selles d'aspect diarrhéique et S pour les selles d'aspects normaux.

Sur l'échantillon de selles, il est réalisé un diagnostic micro biologique qui se compose d'une analyse parasitologique et bactériologique ainsi qu'une recherche de rotavirus.

La coproculture doit être mise en route dans les 2 ou 3 heures qui suivent le prélèvement car il se produit, en quelques heures, une acidification nocive pour certaines espèces bactériennes.

A la réception du prélèvement, on note l'aspect macroscopique des selles (liquides, pâteuses, molles, etc....) et la présence ou non de pus, de mucus ou de sang.

On dilue un fragment de selles dans de l'eau distillée. Ensuite, on procède à l'examen microscopique à l'état frais, entre lame et lamelle puis après coloration de Gram.

A partir d'une dilution au $1/10^6$ en eau distillée, on isole sur les milieux Bromocrésol pourpre (BCP), salmonella-Shigella (SS), Mac Conkey (MC), Hektoen (HK), Sabouraud et Rapaport.

On incube à 37°C pendant 16 heures. Les colonies suspectes sont ensemencées sur le milieu urée-indole puis incubé à 37°C pendant 2 heures. Les souches urée- et indole+ sont ensemencées dans la gélose ordinaire, le milieu Kliger-Hajna, le citrate de simmons et incubés pendant 24 heures à l'étuve. C'est sur ces milieux que se fera la lecture des caractères biochimiques (lactose, H₂S, fermentation du glucose etc...).

Parallèlement, sur chaque prélèvement de selles, on isole 10 souches de *E. coli* (5 lactose+ et 5 lactose-) sur lesquelles on recherchera les facteurs de pathogénicité par la technique de PCR (réaction de polymérisation en chaîne), les phénotypes d'adhésion par culture cellulaire et les antibiogrammes.

2-2-Methodes

2-2-1-Protocole PCR-virulence (20)

Neuf facteurs de pathogénicité ont été recherché sur 274 souches de *E. coli* cf tableau PCR (annexe).

2-2-1-1-Liste et référence du matériel utilisé pour la PCR-virulence

- rTaq DNA polymérase Pharmacia Bio Tech (réf : 27-0798)
- dNTP 100mM solution Pharmacia réf : 27-203501
- Tampon 10X : Pharmacia Biotech réf : 27-0798
- Amorces (primers). Eurogentec oligold ; réf : 720528
- DNA ladder : 1Kd (250µg) Gibco BRL réf: 15615016
- Huile minérale Sigma (réf: M5904)
- Agarose :
 - qualité biologie moléculaire. Appligène
 - Oncor réf 13002
 - Low melting agarose (bas point de fusion) ; qualité biologie moléculaire ; Appligène Oncor réf : 130071
- Polaroid boite de 20 films type 667 réf Pasteur : 26650.
- Comprimés de bromure d'Ethidium : 100mg Sigma ; réf : E2515

Thermocycleur (Mastercycleur 5330 eppendorf) réf : 5330900018-02

2-2-1-2-Préparation des lysats

- Préparer le milieu CAYE (milieu pour la recherche de *E. coli* entérotoxigènes LT/ ST (voir annexe).
- Répartir 1ml par tube.
- Ensemencer la totalité des souches lactose+ et lactose- isolées et incubé à 37°C pendant 18heures.
- Le lendemain, vérifier que les cultures ont à peu près le même trouble.
- Pour chaque malade, prendre 200µl de chaque culture lactose+, les pooler, faire de même pour les cultures des colonies lactose-.
- Centrifuger 5mn à 6000t/min
- Re suspendre le culot dans 500µl d'eau distillée.
- Centrifuger (lavage).
- Reprendre dans 500µl d'eau distillée et faire bouillir 10mn à 100°C (ne pas oublier de percer les bouchons). Les bactéries éclatent et l'ADN est libéré.
- Centrifuger 1000t/min pendant 5min.
- Récupérer 300µl du surnageant, stocker à -20°C.

2-2-1-3-Protocole technique

2-2-1-3-a-Préparation du mélange réactionnel

Pour une réaction :

-Eau bi distillée stérile qsp	40µl
-Tampon réaction 10X	5µl
-Nucléotides	8µl
-Primers X	1,5µl
-Primers Y	1,5µl
-Taq polymérase	0,5µl

-Lysat 10µl

DNA 5µl

En pratique, on prépare un mélange réactionnel pour l'ensemble des souches à tester :

-Mettre 40µl du mélange réactionnel par tube de 0,5ml.

-Ajouter 10µl de lysat par tube.

Dans chaque série, adjoindre 3 témoins :

5µl ADN de la souche témoin positif

5µl ADN de la souche témoin négatif

10µl d'eau pour le témoin H₂O

-Mettre 1 à 2 gouttes d'huile minérale

-Mettre les tubes dans le thermocycleur.

-Programmer :

Programme 1 : PCR eae, PCRa_{fa}

Programme 2 : PCR b_{fp} A

Programme 3 : PCR VT1, PCR VT2, PCR LT

Programme 4 : PCR Sta

Programme 5: PCR EaggEC, PCR ipaH.

2-2-1-3-b-PCR eae (**38**)

Primer:

Eae A 5'-GCA AAT TTA GGT GCG GGT CAG CGT T3'

Eae A 5'-GGC TCA ATT TGC TGA GAC CAC GGTT3'

Souche témoin positif: E2348-69 (O : 127 ; H₆)

Souche témoin négative : HB101

Amplicon :494pb

Concentration du gel en agarose : 2%

Programme 1

29 cycles

-Dénaturation : 1minute 94°C

-Hybridation : 1minute 65°C

-Polymérisation : 2minutes 72°C

30° cycle

-Dénaturation : 1minute 94°C

-Hybridation : 1minute 65°C

-Polymérisation : 5 minutes 72°C

-Temps de réalisation : 3h20min.

2-2-1-3-c-PCR bfp A

Primers

5'-CAA-TGG-TGC-TTG-CGC-TTG-CT-3'

5'-GCC-GCT-TTA-TCC-AAC-CTG-GT-3'

Souche témoin positive : E2348-69

Souche témoin négative : HB101

Amplicon : 324pb

Concentration du gel en agarose : 2%

29 cycles

-Dénaturation : 1minute 94°C

-Hybridation : 1minute 57°C

-Polymérisation : 2minutes 72°C

30° cycle

-Dénaturation : 1minute 94°C

-Hybridation : 1minute 57°C

-Polymérisation : 5minutes 72°C

2-2-1-3-d-PCR VT1 (STLI)

Primers

5'-GAA-GAG-TCC-GTG-GGA-TTA-CG-3'

5'-AGC-GAT-GCA-GCT-ATT-AAT-AA-3'

Souche témoin positive: EDL 933 ou O : 42

Souche témoin négative : HB101

Amplicon : 130pb

Concentration du gel en agarose : 3%

Programme 3

29 cycles

-Dénaturation : 1minute 94°C

-Hybridation : 1minute 56°C

-Polymérisation : 2minutes 72°C

30° cycle

-Dénaturation : 1minute 94°C

-Hybridation : 1minute 56°C

-Polymérisation : 5minutes 72°C

2-2-1-3-e-PCR VT2 (SLTII)

Primers:

5'-AAG-AAG-ATG-TTT-ATG-GCG-GT-3'

5'-CAC-GAA-TCA-GGT-TAT-GCC-TC-3'

Souche témoin positive : EDL 933

Souche témoin négative : HB101.

Amplicon : 346pb

Concentration du gel en agarose : 2%

Programme 3

29cycles

Dénaturation:1minute	4°C
----------------------	-----

Hybridation:1minute	56°C
---------------------	------

Polymérisation:2minutes	72°C
-------------------------	------

30° cycle

Dénaturation:1minute	94°C
----------------------	------

Hybridation:1minute	56°C
---------------------	------

Polymérisation:5minutes	72°C
-------------------------	------

2-2-1-3-f-PCR ipaH

Primers

5'-GCT-GGA-AAA-ACT-CAG-TGC-CT-3'

5'-CCA-GTC-CGT-AAA-TTC-ATT-CT-3'

-Souche témoin positive: M90T (maintenir sur gélose rouge Congo)

-Souche témoin négative : HB101

Amplicon : 424pb

Concentration du gel en agarose : 2%

Programme 5

29 cycles

-Dénaturation:1minute	94°C
-----------------------	------

-Hybridation:1minute	53°C
----------------------	------

-Polymérisation:2minutes	72°C
--------------------------	------

30° cycle

-Dénaturation: 1 minute 94°C

-Hybridation: 1 minute 53°C

-Polymérisation: 5 minutes 72°C

2-2-1-3-g-PCR afa

Primers

5'-GCT-GGG-CAG-CAA-ACT-GAT-AAC-TCT-C3'

5'-CAT-CAA-GCT-GTT-TGT-TCG-TCC-GCC-G3'

Souche témoin positive: A30

Souche témoin négative : HB101

Amplicon : 750pb

Concentration du gel en agarose : 2%

Programme 1

29 cycles

-Dénaturation: 1 minute 94°C

-Hybridation: 1 minute 65°C

-Polymérisation: 2 minutes 72°C

30° cycle

-Dénaturation: 1 minute 94°C

-Hybridation: 1 minute 56°C

-Polymérisation: 5 minutes 72°C

2-2-1-3-h-PCR LT

Primers

5'-GCG-ACA-AAT-TAT-ACC-GTG-CT-3'

5'-CCG-AAT-TCT-GTT-ATA-TAT-GT-3'

Souche témoin positive: EDL1493

Souche témoin négative : HB101

Amplicon : 707pb

Concentration du gel en agarose : 2%

Programme 3

29 cycles

-Dénaturation:1minute 94°C

-Hybridation:1minute 56°C

-Polymérisation:2minutes 72°C

30^e cycle

-Dénaturation:1minute 94°C

-Hybridation:1minute 56°C

-Polymérisation:5minutes 72°C

2-2-1-3-i-PCR EaggEC

Primers

5'-CTG-GCG-AAA-GAC-TGT-ATC-AT-3'

5'-CAA-TGT-ATA-GAA-ATC-CGC-TGT-T-3'

Souche témoin positive : 17.2

Souche témoin négative : HB101

Amplicon : 630pb

Concentration du gel en agarose : 2%

Programme 5

29 cycles

-Dénaturation:1minute 94°C

-Hybridation:1minute 53°C

-Polymérisation:2minutes	72°C
30° cycle	
-Dénaturation:1minute	94°C
-Hybridation:1minute	53°C
-Polymérisation:5minutes	72°C

2-2-1-3-j-PCR Sta

Primers

5'-CTG-TAT-TGT-CTT-TTT-CAC-CT-3'

5'-GCA-CCC-GGT-ACA-AGC-AG-AT-3'

ou

5'-TCT-GTA-TTG-TCT-TTT-TCA-CC-3'

5'-TTA-ATA-GCA-CCC-GGT-ACA-AGC-3'

Souche témoin positive : EDL1493

Souche témoin négative : HB101

Amplicon :182pb

Concentration du gel en agarose : 3%

Programme 4

29 cycles

-Dénaturation:1minute	94°C
-Hybridation:1minute	43°C
-Polymérisation:2minutes	72°C
30° cycle	
-Dénaturation:1minute	94°C

-Hybridation: 1 minute 43°C

-Polymérisation: 5 minutes 72°C

NB : Maintenir les amplicons à +4°C

2-2-1-4- Analyse du produit d'amplification par électrophorèse

-Préparer 1 litre de TAE 1X (20ml de TAE 50X dans 980ml d'eau distillée stérile)

-Préparer un grand gel d'agarose :

2% (2g d'agarose dans 100ml de TAE 1X)

3% (3g d'agarose dans 100ml de TAE 1X)

-dissoudre au four à micro ondes

-Ramener à 40-50°C ; ajouter 10µl de BET à 10mg/ml

-Couler le bac après la mise en place des cales et du peigne

-Après solidification du gel (15-30minutes), enlever les cales ; recouvrir de tampon TAE 1X

-Eliminer les bulles d'air ; retirer délicatement le peigne

-Charger les puits avec 10µl d'extrait (5µl de la solution bleue+5µl du produit PCR)

-Charger un puits extrême avec le marqueur de taille

-Fermer la cuve

-Connecter la cuve au générateur

-Régler le générateur à 100-125Volts pendant 45minutes

-Révéler sur une table UV à 100%

-Avant de procéder à l'irradiation, mettre des lunettes ou un masque de protection.

Les bandes d'ADN sont fluorescentes grâce au BET ; une photo du gel peut alors être prise auquel

cas ne pas omettre d'interposer un filtre rouge entre l'objectif et le trans illuminateur

L'appareil Polaroid est réglé à 5,6/4.

Le gel peut être conservé à +4°C pendant 24-48h.

2-2-2-Culture cellulaire et adhésion (37)

2-2-2-1-Liste et référence du matériel utilisé pour la culture cellulaire et adhésion

- Giemsa R colorant (RAL réf : 320-311)
- Milieu Essentiel Minimum (MEM) Gibco-BRL réf : 31095-052
- Sérum de veau fœtal Gibco BRL réf : 10106-060
- Pénicilline 5000U/ml
- Streptomycine 5000g/ml
- Trypsine 1X liquide 0,25% Gibco-BRL réf : 25050-014
- a- D mannose (Méthyl a-D –mannopyranoside) Sigma réf: M6882
- Labtek 8 cupules NUNC distribuée par Gibco BRL réf : 177402K
- 9- Méthanol : Carlo Erba réf : 414814

2-2-2-2-Entretien de la lignée Hela

2-2-2-2-a-Milieu de culture complet

-MEM (Eagle 1X) with Earler Salt with glutamine chez Gibco-BRL; réf 31095-052

-Sérum de veau fœtal utilisé non-dé complémenté à 10% final chez Gibco-BRL ; réf ; 10270-098

-Antibiotiques : Pénicillines 5000U/ml

Streptomycine : 5000g/ml utilisé à 2,5% final

-Acides aminés non essentiels 100X, utilisé à 1% chez Gibco-BRL réf : 11140-035

-Trypsine Gibco-BRL (1X) (0,25% = 1/250) réf : 25050014

NB : Solution ATB

Pour 200ml 1MUI Pénicilline

1g Streptomycine

qsp 200ml

Filtrer 0,2µl ; répartir 10ml/tube ; conserver à -20°C

Utilisation à 1% final

Trypsine Gibco 0,25%

A utiliser comme 0,025% c'est-à-dire diluée comme suit :

Pour 50ml : 5ml sol.sels 10X

 5ml tryps.0,25X

 40ml eau distillée stérile

2-2-2-2-b-Entretien de la lignée cellulaire

-Bain-marie à 37°C pendant 10min pour tous les composants du milieu de culture.

-Bain-marie à 37°C pendant 3-4min pour la solution de trypsine à 0,025%.

NB: Ne pas laisser incuber trop longtemps la trypsine sinon son activité enzymatique chute.

-Oter le contenu de la boîte de culture du "passage" précédent.

-Effectuer un rinçage avec du MEM (10ml pour une boîte 10cm de diamètre).

-Oter tout le MEM.

-Rincer le tapis cellulaire avec 2ml de trypsine 0,025% (rapidement).

-Trypsiner les cellules avec 4ml de trypsine 0,025% à 37°C.

-Ajouter 8ml de MEM (2X).

-Reprendre-le tout dans des boîtes à centrifuger.

-Centrifuger pendant 8min à 1500rpm.

-Décanner.

-Remettre en suspension le culot cellulaire dans Vml de MEM.

-Compter les cellules N à l' aide d' une cellule de Malassez (5 grands carrés).

$$N = X/5.10^5 \text{ nombres de cellules/ ml}$$

-Faire une nouvelle boîte avec un volume final de 20ml soit:

200µl antibiotique

200µl sérum de veau fœtal à 10%

200µl acides aminés non essentiels

Vml cellules

Qsp 20ml en MEM

-Ajouter doucement avant-arrière-droite gauche

-Etuver à 37°C sous 5% de CO₂.

2-2-2-3-Mise en culture des bactéries

La veille de l'épreuve, cultiver les souches à examiner et les souches témoins positives (une souche par phénotype):

-Phénotype localisé ou LA

-Phénotype diffus ou DA

-Phénotype aggrégant ou AA

-Et négative 18 heures à 37°C dans un tube de 17 à vis contenant 5ml d'eau peptonée additionnée de D-mannose à 1% (poids/ volume) afin d'inhiber l'adhésion des *E coli* par leur pili de type I. Les cultures ne doivent pas être agitées.

2-2-2-4-Préparation de la chambre de culture sur lames de verre pour cellules Hep-2

-Rincer les chambres de culture de 1ml (Labtek par exemple) avec 200µl d'une solution de sels de Earle ou de sels de Hanks; les vider par retournements

-Distribuer par chambre 400µl de milieu de base pour la culture des cellules Hep-2 (sans antibiotique).

-Préparer dans un bécher stérile, une suspension contenant 2ml de milieu de base et 10gouttes de la suspension cellulaire à 50%; les homogénéiser par aspiration et refoulement.

-Distribuer par chambre 50µl de cette préparation cellulaire et les incuber 18heures à 37°C sous CO₂ à 5%.

-Afin de réaliser l'épreuve du pouvoir d'adhésion cellulaire, il est indispensable que les cellules Hep-2 ne soient pas confluentes (confluence maximum de 50%).

2-2-2-5-Réalisation de l'épreuve

-Avant l'épreuve, préparer les suspensions bactériennes afin d'avoir approximativement 10^7 bactéries /ml.

Les suspensions sont réalisées à partir de culture en eau peptonée, en diluant les bactéries dans le milieu de base sans antibiotique destiné à la culture des cellules Hep-2 contenant 1% de D-mannose (MEM: 90ml + D-mannose 10%: 10ml)

En général, on réalise deux suspensions bactériennes:

Suspension diluée au	1/10	et	1/20
MEM à 1% de D-mannose	450µl		475µl
Cult. Bact en EP +mannose	50µl		25µl

-Vider les chambres de cultures cellulaires de leur milieu par retournements.

-Laver les chambres trois fois 5-10minutes avec 400µl de la solution de sels de Earle ou d'une solution de PPS+CaCl₂ 1Mm+ MgCl₂ 1Mm ou milieu MEM+ 1% D-mannose.

NB: Cette étape est importante puisqu'elle permet l'élimination des antibiotiques utilisés dans les milieux de culture.

-Vider les chambres comme précédemment et éprouver chaque souche en ajoutant 400µl de suspensions bactériennes en milieu pour culture cellulaire dans une cupule.

-Incuber les bactéries 3heures à 37°C sous CO₂ (mettre les Labtek dans des boites de pétri pour éviter la contamination).

Au terme de l'incubation, vider les chambres comme précédemment; les laver avec du PBS pour éliminer les bactéries non adhérentes; retirer leur paroi, fixer les cellules au méthanol.

-Colorer au Giemsa rapide: 1/15

2-2-2-6-Lecture des résultats

Avant toute lecture, réaliser les contrôles suivants:

-Vérifier l'absence d'adhésion des bactéries aux cellules pour le témoin négatif (efficacité de l'inhibition des pili de type I par le D-mannose).

Une adhésion résiduelle est possible et non significative lorsque au moins 5% des cellules ont permis la fixation de moins de 5 bactéries par cellules en moyenne.

-Pour les témoins positifs, les phénotypes d'adhésion doivent être correctement exprimés sur au moins 40% des cellules Hep-2.

-Pour chacun des trois témoins positifs, vérifier qu'il y a au moins 10 bactéries fixées par cellule en moyenne.

-Lire les résultats au grossissement 40 à sec puis confirmer la lecture à l'immersion au grossissement 100.

2-2-3-Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Nous avons étudié la sensibilité aux antibiotiques de toutes les souches renfermant au moins un facteur de pathogénicité.

La méthode utilisée est la technique de diffusion en milieu gélosé.

Les antibiotiques testés sont les suivants :

-Ampicilline (AM), Ticarcilline (TIC), Amoxicilline-acide clavulanique (AMC).

-Céfalotine (CF), Céfoxitine (FOX), Céfotaxime (CTX), Chloramphénicol (C).

-Imipénem (IPM), Gentamycine (GM), Tobramycine (TM), Amikacine (AN).

-Fluméquine (UB), Norfloxacin (NOR), Colistine (CS), Cotrimoxazole (SXT).

-Tétracycline (TE).

Après 24 heures d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et interprétés d'après des diamètres critiques figurant sur des abaques.

Parallèlement, nous avons recherché les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). Cette recherche s'effectue par la mise en évidence d'une synergie entre le céfotaxime testé et l'acide clavulanique. Pour cela, il faut placer, au centre d'une gélose ensemencée avec la souche test, un

disque d'amoxicilline-acide clavulanique et à 30 mm de ce disque (centre à centre), tout autour, les disques de céfotaxime, ceftazidime et aztréonam. Si la souche produit une BLSE, il y'a une augmentation très nette (≥ 4 mm) du rayon d'inhibition autour du céfotaxime, et ce en regard du disque contenant l'acide clavulanique. Ceci est classiquement décrit comme une image en « bouchon de champagne ».

III- RESULTATS

3-1- Première analyse : Facteurs de pathogénicité

3-1-1- Fréquence des différents facteurs de pathogénicité en fonction des sujets

Dans cette étude, nous avons collecté les selles de 25 sujets diarrhéiques et 21 sujets témoins. Au total, 150 souches pures de *E. coli* ont été isolées des selles diarrhéiques et 124 souches des selles témoins.

Neuf facteurs de pathogénicité ont été recherchés sur ces souches pures.

Les facteurs recherchés étaient absents chez 74% des souches diarrhéiques contre 95% des souches témoins.

Le facteur Eagg a été identifié chez 10% (n=15) des souches diarrhéiques et est absent chez les souches témoins.

Par contre, le facteur *eae* est identifié chez 9,3% (n=14) des souches diarrhéiques et chez 4,8% (n =6) des souches témoins.

Les facteurs *afa* et *ipaH* ont été identifiés respectivement chez 6% (n = 9) et chez 0,66% (1) des souches diarrhéiques et sont absents chez les souches témoins.

Les facteurs *bfp*, *SLT-I*, *SLT-II*, *LT* et *Sta* n'ont pas été isolés dans cette étude.

Le cas où deux facteurs différents étaient associés chez un même sujet, n'a pas été recensé.

Tableau I : Prévalence des différents facteurs de pathogénicité de *Escherichia coli* n (%) en fonction des sujets

Facteurs de pathogénicité	Sujets diarrhéiques N=150	Sujets témoins N=124
Absences de facteurs	111 (74)	118 (95)
<i>eae</i>	14 (9,3)	6 (4,8)
Eagg	15(10)	0 (0)
<i>afa</i>	9(6)	0 (0)
ipaH	1(6,6)	0 (0)
<i>bfp</i>	0 (0)	0 (0)
SLT-I	0 (0)	0 (0)
SLT-II	0 (0)	0 (0)
LT	0 (0)	0 (0)
STa	0 (0)	0 (0)

3-1-2- Symptomatologie clinique en fonction des facteurs de pathogénicité chez les sujets diarrhéiques

Sur les souches où le facteur *eae* a été identifié, les selles étaient liquides chez 64% (n=9) des cas, molles chez 21% (n=3) des cas et pâteuses chez 14% (n=2) des cas.

Le facteur *Eagg* entraînait des selles d'aspect mou chez 66% (n=10) des cas et d'aspect liquide chez 33% (n=5) des cas.

Le facteur *afa* était identifié seulement dans les selles pâteuses alors que le facteur *ipah* était présent dans des souches isolées de selles liquides.

La présence de mucus a été notée dans tous les prélèvements de selles.

Cependant, ces résultats sont à interpréter avec précaution du fait de la petite taille de l'échantillon.

Tableau II : Symptomatologie clinique n (%) en fonction des facteurs de pathogénicité chez les sujets diarrhéiques

Consistance des selles	<i>Eae</i> N=14	<i>Eagg</i> N=15	<i>Afa</i> N=9	<i>Ipah</i> N=1
Liquides / semi-liquides	9 (64)	5 (33)	0 (0)	1 (1.00)
pâteuses	2 (14)	0 (0)	9 (1.00)	0 (0)
molles	3 (21)	10 (66)	0 (0)	0 (0)

3-1-3- Fréquence des facteurs de pathogénicité en fonction de l'âge chez les sujets diarrhéiques

La majorité des facteurs *eae* (78%) et la totalité des facteurs *Eagg* et *afa* ont été retrouvés chez des patients de 0 à 6mois. Le facteur *eae* a été retrouvé chez des enfants de 7 à 12mois et 19 à 24mois.

Seul le facteur *ipaH* a été identifié dans la tranche d'âge 19-24mois.

Aucun facteur n'a été identifié dans la tranche d'âge 13-18mois

Tableau III : Fréquence des facteurs de pathogénicité n (%) en fonction de l'âge chez les sujets diarrhéiques

Tranche d'âge	0 à 6mois	7 à 12mois	13 à 18mois	19 à 24mois
<i>eae</i>	11 (78)	1 (7)	0 (0)	2 (14)
<i>Eagg</i>	15 (1.00)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>afa</i>	9 (1.00)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ipaH</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.00)

3-1-4- Fréquence des facteurs de pathogénicité en fonction du sexe chez les sujets diarrhéiques

les facteurs *eae* et *Eagg* sont isolés respectivement chez 92% (n=13) et chez 33% (n=10) chez les patients de sexe masculin contre 8% (n=1) et 66% (n=10) chez les patients de sexe féminin.

Les facteurs *afa* et *ipaH* ont été uniquement isolés chez des patients de sexe féminin.

La taille de l'échantillon recommande de les utiliser avec précaution

Tableau IV : Fréquence des facteurs de pathogénicité n (%) en fonction du sexe chez les sujets diarrhéiques.

sexe	<i>Eae</i> N=14	<i>Eagg</i> N=15	<i>Afa</i> N=9	<i>Ipah</i> N=1
masculin	13 (92)	5 (33)	0 (0)	0 (0)
féminin	1 (8)	10 (66)	9 (1.00)	1 (1.00)

3-2- Deuxième analyse : Phénotype d'adhésion cellulaire

3-2-1- Fréquence des phénotypes d'adhésion en fonction des sujets

La culture sur cellules Hep-2 a été effectuée sur toutes les souches de *Eschérichia coli* isolées.

Le phénotype d'adhésion localisée est prédominant aussi bien chez les diarrhéiques que chez les témoins car il est présent chez 52,6% (n=79) des diarrhéiques contre 53% (n=66) chez les témoins.

Le test d'adhésion était négatif chez 28,6% (n=43) des souches diarrhéiques contre 32% (n=40) des souches témoins.

L'adhésion était aggrégative chez 10,6% (n=16) contre 6,4% (n=8) alors qu'elle était diffuse chez 8% (n=12) des diarrhéiques contre 8% (n=10) des témoins.

Donc les phénotypes d'adhésion sont retrouvés avec des proportions identiques dans les deux groupes.

Tableau V : Fréquence des phénotypes d'adhésion n (%) en fonction des sujets.

Phénotype d'adhésion	Sujets diarrhéiques N=150	Sujets témoins N=124
localisé	80 (53,3)	66 (53)
aggrégatif	16 (10,6)	8 (6,4)
diffus	12 (8)	10 (8)
négatif	42 (28)	40 (32)

3-2-2- Symptomatologie clinique en fonction des phénotypes d'adhésion chez les sujets diarrhéiques

Quarante-huit pour cent des phénotypes d'adhésion localisée est associé à des selles pâteuses, 40% à des selles molles et 11% à des selles liquides.

Le phénotype agrégatif est de 68% (n=11), 25% (n=4) dans les selles pâteuses et 6% (n=1) dans les selles liquides. Le phénotype diffus est de 84% (n=10) dans les selles molles et de 16% (n=2) dans les selles liquides. On a noté une absence d'adhésion chez 35% (n=15) des selles liquides et molles et chez 28% (n=12) des selles pâteuses.

Tableau VI : Symptomatologie clinique en fonction des phénotypes d'adhésion chez les sujets diarrhéiques

Consistance des selles	Localisé N=80	Agrégatif N=16	Diffus N=12	Négatif N=42
Semi-liquides / liquides	9 (11)	1 (6)	2 (16)	15 (35)
pâteuses	39 (48)	4 (25)	0 (0)	12 (30)
molles	32 (40)	11 (68)	10 (84)	15 (35)

3-2-3- Relation entre phénotype d'adhésion et facteurs de pathogénicité en fonction des sujets

Pour les souches où aucun facteur n'a été identifié, nous avons noté la prédominance du phénotype d'adhésion localisée.

Le facteur *eae* présentait une adhésion localisée chez 64% (n=9) des cas, négative chez 28,5% (n=4) des cas et aggrégative chez 7% (n=1) des cas chez les sujets diarrhéiques alors qu'il présentait seulement une adhésion localisée chez les témoins.

Le facteur *afa* présentait une adhésion localisée chez 55% (n=5) des cas et 45% (n=4) des cas seulement chez les diarrhéiques.

De même, le facteur *Eagg* était associé à une adhésion localisée chez 66% (n=10) des cas et à une adhésion agrégative chez 33% (n=5) des cas.

Le seul facteur *ipah* isolé chez les sujets diarrhéiques était associé à une adhésion diffuse.

Tableau VII : Relation entre phénotype d'adhésion et facteurs de pathogénicité en fonction des sujets

Facteurs de pathogénicité	localisé	agrégatif	diffus	négatif
Chez les sujets diarrhéiques	N=80	N=16	N=12	N=42
Absence de facteur	56 (70)	10 (62,5)	11 (91)	34 (81)
<i>eae</i>	9 (11)	1 (6,25)	0 (0)	4 (9,5)
<i>Eagg</i>	10 (12,5)	5 (31,25)	0 (0)	0 (0)
<i>afa</i>	5 (6,25)	0 (0)	0 (0)	4 (9,5)
<i>ipaH</i>	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)
Chez les sujets témoins	N=66	N=8	N=10	N=40
Absence de facteur	60 (91)	8 (1.00)	10 (1.00)	40 (1.00)
<i>eae</i>	6 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

3-3-Troisième analyse : Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la technique de diffusion en milieu gélosé a été effectuée chez 39 souches diarrhéiques et 6 souches témoins.

Elle a montré une sensibilité globale de ces pathotypes à tous les antibiotiques testés sauf aux amino-pénicillines, carboxy-pénicillines, à l'association aminopénicillines-inhibiteurs de bêta-lactamases, au chloramphénicol, au cotrimoxazole, à la tétracycline et à la céfalotine.

Tableau VIII : Fréquence globale de sensibilité aux antibiotiques des différentes souches.

	AM	TIC	CF	FOX	CTX	AMC	C	CS
Souches Diarrhé.	0 (0)	0 (0)	16 (41)	39 (100)	39 (100)	0 (0)	23 (58)	38 (97,5)
Souches témoins	0 (0)	0 (0)	5 (83,5)	6 (100)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)

	IPM	GM	TM	AN	UB	NOR	SXT	TE
Souches Diarrhé.	39 (100)	38 (97,5)	39 (100)	39 (100)	38 (97,5)	38 (97,5)	7 (18)	0 (0)
Souches témoins	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	0 (0)	0 (0)

Les souches EPEC diarrhéiques et témoins sont résistantes dans leur globalité à l'ampicilline, à la ticarcilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique, au cotrimoxazole et à la tétracycline. Le chloramphénicol est sensible à 85% des souches EPEC, à 6% des souches EaggEC et à 100% des souches DAEC.

La céfalotine s'est révélée sensible chez 22% des souches EPEC diarrhéiques, 11% des souches DAEC et 73% des souches EaggEC.

Le cotrimoxazole n'est sensible que chez 6% des souches EaggEC et 55% des souches DAEC. Par contre, l'ampicilline, la tétracycline et même l'amoxicilline-acide clavulanique sont résistants à tous ces pathotypes

Tableau IX : Fréquence de sensibilité aux antibiotiques des souches présentant différents facteurs de pathogénicité.

% Sensibilité	AM	TIC	CF	FOX	CTX	AMC	C	CS
<i>eae</i>	0 (0)	0 (0)	3 (21,5)	14 (100)	13 (92)	0 (0)	12 (85)	14 (100)
<i>eagg</i>	0 (0)	0 (0)	11 (73)	15 (100)	15 (100)	0 (0)	1 (6)	14 (94)
<i>afa</i>	0 (0)	0 (0)	1 (11)	9 (100)	9 (100)	0 (0)	9 (100)	9 (100)
<i>ipaH</i>	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>Eae</i> témoins	0 (0)	0 (0)	5 (83,5)	6 (100)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)

	IPM	GM	TM	AN	UB	NOR	SXT	TE
<i>eae</i>	14 (100)	13 (92)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>eagg</i>	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	14 (94)	14 (94)	1 (6)	0 (0)
<i>afa</i>	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	5 (55)	0 (0)
<i>ipaH</i>	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)
<i>Eae</i> témoins	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	0 (0)	0 (0)

La majorité des souches testées sont productrices de pénicillinases haut niveau suivi du phénotype « Tri ». Nous avons dénombré 4 souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi parmi les souches diarrhéiques et 2 chez les témoins. Par contre, on a noté l'absence de phénotype sauvage et de céphalosporinases haut niveau.

Près de 98% des souches sont sensibles aux aminosides et aux quinolones.

Quarante-un pour cent des souches diarrhéiques ont présenté une résistance au chloramphénicol.

Par contre, le niveau de résistance est très important pour le cotrimoxazole et la tétracycline.

Tableau X : Fréquence n (%) des phénotypes de résistance aux bêta-lactamines

	Pénicilline Bas niveau	Pénicilline Haut niveau	Tri	Bêta-lactamase à Spectre élargi
Souches Diarrhé.	1 (2,5)	24 (62)	10 (25,5)	4 (10)
Souches Témoins	0 (0)	1 (16,5)	3 (50)	2 (33,5)

	AMINOSIDES		QUINOLONES				C	SXT	TE
	Phén. sauvage	KG	I	II	III	IV			
Souches Diarrhé.	38 (97,5)	1 (2,5)	38 (37,5)	0 (0)	39 (100)	1 (2,5)	0 (0)	16 (41)	32 (82)
Souches témoins	6 (100)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	6 (100)

IV-DISCUSSION-RECOMMANDATIONS

Cette étude a été effectuée chez 46 patients (25 enfants présentant une diarrhée et 21 enfants témoins) ; 150 souches de *E coli* diarrhéiques et 124 souches témoins ont été isolées. Sur celles-ci, nous avons recherché les neuf facteurs de pathogénicité, les phénotypes d'adhésion cellulaire et le profil de sensibilité aux antibiotiques.

Dans près de 27% des cas, un facteur de pathogénicité, au moins, a été identifié. Nous avons noté une prévalence des facteurs eae (9,5 %)et Eagg (10 %)suivis des facteurs afa et ipaH.

Les facteurs de virulence bfp, LT, Sta, SLT-I et SLT-II n'ont pas été retrouvés dans cette étude.

Le facteur Eagg présentait soit une adhésion localisée soit une adhésion aggrégative. Ce résultat est en corrélation avec les travaux de Schmidt H. et coll. (**83**) qui avaient isolé des souches Eagg associées à une adhésion diffuse et d'autres ne présentant pas d'adhésion. De même, Baudry et coll. (**6, 84**) avaient suggéré l'existence de différentes catégories de souches Eagg. Il serait intéressant d'étudier l'hétérogénéité de ces souches Eagg.

Le facteur eae qui est caractéristique des EPEC était associé à une adhésion localisée, aggrégative ou négative. En effet, d'autres études antérieures (**42, 71**) avaient montré des souches EPEC associées à une adhérence localisée, diffuse et aggrégative. Une mutation du gène nécessaire à l'adhérence peut expliquer l'absence d'adhésion de ces souches.

Le facteur *bfp*, responsable de l'adhésion à distance des souches EPEC aux entérocytes, n'a pas été identifié. Ce qui confirme la thèse selon laquelle le gène eae est un facteur indispensable à l'expression du pouvoir entéro pathogène des souches d'EPEC (**26, 27, 49**).

Le facteur afa, isolé dans cette étude, présentait une adhésion localisée ou négative. Là aussi, une mutation du gène peut expliquer ce résultat d'autant plus que des travaux récents au Mexique (**39**) et à Clermont-Ferrand (**54**) le confirment.

Une seule souche entéro-invasive (*ipaH*) présentant une adhésion diffuse, est identifiée. Cette tendance est confirmée par une étude réalisée chez des enfants au Brésil (**90**) qui a montré la faible incidence de ce pathotype.

Dans l'étude, nous avons noté l'absence de souches ETEC (LT, ST) habituellement présents dans les zones à hygiène précaire (**64**). Ce résultat est en contradiction avec les travaux réalisés sur des enfants, au Brésil (**90**), qui avaient montré une prévalence des souches ETEC. Aussi, l'étude de Gassama A.(**36**) effectuée chez des adultes au Sénégal, avait noté leur absence.

Les souches EHEC (SLT-I ; SLT-II) n'ont pas été identifiées. Ce qui est en accord avec les données de la littérature qui stipulent que les souches EHEC sont à l'origine de la plupart des épidémies aux USA et au Canada (**15, 44, 78, 80**).

La plupart des souches où aucun des facteurs recherchés n'a été identifié, ont présenté des phénotypes d'adhésion localisée, aggrégative ou diffuse. Ce qui laisse supposer la présence d'autres facteurs de virulence comme les afa-2, sfa ou pap etc... Les travaux de Aïdara A. et coll (**1**) réalisés chez des enfants à Dakar avaient isolés des souches fortement suspectées d'être à l'origine de diarrhées mais qui n'ont pu être classées. Des études ultérieures pourront permettre de mieux les élucider.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la technique de diffusion en milieu gélosé a été effectuée sur 39 souches diarrhéiques (15 souches d'EaggEC, 14 souches d'EPEC, 9 souches de DAEC et 1 souche d'EIEC) et 6 souches EPEC témoins.

Toutes les souches ont montré une sensibilité globale à tous les antibiotiques testés sauf aux amino-pénicillines, aux carboxy-pénicillines, à l'association amino-pénicillines et inhibiteurs de bêta-lactamases, aux céphalosporines de 1^{ère} génération, au cotrimoxazole et aux cyclines.

L'étude de Soussy et coll (**87**) avait montré une sensibilité de 85% au cotrimoxazole, de 75% au chloramphénicol, de 65% à l'ampicilline et de 60% à la tétracycline. Notre étude a révélé une grande résistance à ces antibiotiques atteignant même 100% quelques fois.

Les souches EPEC et EaggEC ont présenté une résistance totale à l'ampicilline, la ticarcilline, la tétracycline et même à l'amoxicilline-acide clavulanique. La résistance au chloramphénicol et au cotrimoxazole est aussi importante.

Les travaux de Vila J.(**90**) réalisés en Tanzanie chez des enfants de moins de 5 ans avaient déjà constaté la résistance de souches EPEC et EaggEC à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la tétracycline et au cotrimoxazole.

Cette tendance est confirmée par la recherche des bêta-lactamases à spectre élargi. La majorité des souches sont classées parmi les souches productrices de pénicillinases haut niveau.

La résistance aux bêta-lactamines serait due à une céphalosporinase naturelle appelée AmpC exprimée à bas niveau, avec une CMI à 2-4µg/ml pour l'ampicilline ou la céfalotine (**40**)

La résistance à la tétracycline est, généralement, due à un efflux actif, parfois à des mutations sur le gène -marA responsable d'une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques alors que, pour le chloramphénicol, elle est liée à la présence d'une acétyl transférase inactivant l'antibiotique ; plus rarement, modification du gène -marA (**2**).

La résistance au cotrimoxazole serait liée à une modification quantitative ou qualitative de la cible de ces antibiotiques, la dihydro-folate réductase. Le plus souvent, la résistance est due à ces enzymes plasmidiques, résistant à l'antibiotique et qui, présentés en plus des enzymes chromosomiques, provoquent un « shunt métabolique » (**41**).

Le traitement utilisant l'ampicilline, le cotrimoxazole, la tétracycline et même l'association amoxicilline-acide clavulanique ne se justifie plus.

V-CONCLUSION

Les diarrhées infectieuses aiguës ont une place importante dans la pathologie infantile, en particulier dans les pays en voie de développement. Parmi les diarrhées dues aux différents pathotypes de *E. coli*, les plus fréquentes sont, vraisemblablement, celles dues aux EPEC et aux EAEC.

Leur diagnostic conditionne une attitude préventive et thérapeutique efficace. Ce diagnostic est encore actuellement difficile car il repose sur l'étude des facteurs de pathogénicité des bactéries. Mieux définir les interactions bactéries-cellules de l'hôte lors des processus diarrhéiques permettrait de mieux comprendre la physiopathologie, de développer des outils de diagnostic vis-à-vis de ces pathogènes, et surtout d'assurer la mise au point de vaccins efficaces.

L'étude a été réalisée chez 46 enfants : soit 25 présentant une diarrhée et 21 témoins. 150 souches pures de *E. coli* diarrhéiques et 124 souches témoins ont été isolées.

Chez 27% des souches diarrhéiques, au moins un facteur de pathogénicité a été identifié. Deux facteurs différents n'ont pas été retrouvés chez un même patient.

Les facteurs Eagg (10%) et eae (9,5%) se sont révélés plus prévalents chez les souches diarrhéiques suivis des facteurs afa (6,5%) et ipaH (0,6%) alors que seul le facteur eae était isolé faiblement (5%) chez les témoins.

Aucune souche productrice de toxine n'a été retrouvée dans cette étude.

L'influence du sexe, de l'âge ou de l'aspect des selles sur la prévalence des facteurs de virulence n'a pu être déterminée du fait de la petite taille de l'échantillon.

Les phénotypes d'adhésion ont été recherchés sur toutes les souches. Les différents modèles d'adhérence sont proportionnellement identiques aussi bien chez les patients diarrhéiques que chez les témoins. Le phénotype localisé s'est montré plus prévalent (54% chez les cas contre 53% chez les témoins) suivi du phénotype négatif (32% versus 28%), aggrégatif (16% contre 8%) et diffus (12% contre 8%).

Des études ultérieures axées sur les phénotypes d'adhésion en relation avec les facteurs de pathogénicité devraient permettre de mieux élucider le rôle de ces gènes.

La technique de PCR utilisée s'est avérée sensible et spécifique pour la détection des facteurs de virulence alors que la culture sur cellule Hep-2 pourrait servir de technique de confirmation du diagnostic.

Aujourd'hui, l'utilisation de l'ampicilline, la ticarcilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, les céphalosporines de 1^{ère} génération, le cotrimoxazole ou la tétracycline dans le traitement des diarrhées à *E. coli* ne se justifie plus. Par contre, les céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} génération, en général, semblent encore efficaces, les quinolones étant à éviter chez les enfants.

1-Aïdara A., Arborio M., Samb A., Diop M. I., Boye C. et Diop M. B.

Incidence des *Escherichia coli* pathogènes sur les diarrhées aiguës infantiles à Dakar.
Bull. Soc. Path. 1988; 81: 202-210

2-Alekshun M.N. and Levy S.B.

Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon.
Antimicrob. Agents chemother. 1997; 41: 2067-2075.

3-Appelbaum P.C., Jacobs M.R., Buick M.K., Flanagan M.M.et Gymer G.A.

Evaluation of the Micro ID, the API 20E and the Rapid 20 E for same day identification of *Enterobacteriaceae*.

Fur. J. clin. Microbiol. 1985; 4:498-501.

4-Armstrong G.L., Hollingsworth J., Morris J.G.

Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* 0157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world.

Epidemiol. Rev. 1996; 18: 29-51.

5-Bastian S.N., Carle I., Grimont F.

Comparison of 14 polymerase chain reaction systems for the detection and subtyping of stx genes in shiga-like toxin – producing *Escherichia coli*.

Research in Microbiology 1998, 149 (7): 457-472.

6- Baudry B., Savarino S.J. , Vial P., Kaper J.B., Levine M.M.

A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli* a recently discovered diarrheal pathogen.

J. Infect. Dis. 1990, 161; 1249-1251

7- Berche P., Gaillard J.-L., Simonet M.

Bactériologie, les bactéries des infections humaines.

Médecine – Sciences Flammarion Paris. 1991 ; 8 : 100-111

8-Bhan M.K., Raj P., Levine M.M. et al.

Enteroggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India.

J. Infect. Dis. 1989, 159; 1061-1064

9- Borderon E.et Horodniceanu T.

Metabolically deficient dwarf-colony mutants of *E. coli* : deficiency and resistance to antibiotics of strains isolated from urine culture.

J. clin. Microbiol. 1978; 8: 629-634.

10-Boudalliez B., Berquin P., Mariani – Kurkdjian P et coll.

Possible person to person transmission of *Escherichia coli* 0111 associated hemolytic uremic syndrome.

Pediatr. Nephrol. 1997; 11: 36.

11- Boujaafar N., Druel B., Freney J., Renaud F.

Escherichia coli.

In Manuel de bactériologie clinique.

Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet.

Editions scientifiques Elsevier- Paris. 1992 ; 2 : 729-738.

12- Brenner D.J., Davis B.R., Steigerwalt A.G., et al.

A typical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermanii* sp nov.

J. clin. Microbiol. 1982; 15: 703-713.

13- Brenner D.J., Mc Whorter A.C., Knedson J.K., Steigerwalt A.G.

Escherichia vulneris: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds.

J. clin. Microbiol. 1982; 15: 1133-1140.

14- Burgess N.R.H., Mc Dermott S.N., Whiting I.

Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cock roach *Blatta orientalis*.

J. hyg. 1973; 71:1-7.

15- Carter A.O., Borczyk A.A. Carlson J.A. et coll.

A several outbreak of *Escherichia coli* 0157 :H7 associated hemorrhagic colitis in a nursing home.

N. Engl. J. Med. 1987; 317: 1496-500.

16- Cezard J.P.

Aspects cliniques et traitement chez l'enfant.

In. Choutet P., Goldstein F.W. *Escherichia coli*; Aspects fondamentaux et cliniques.

Phases 5 Editions Médicales ; 2000; 36-41.

17- Cezard J.P.

Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës de l'enfant.

Revue Intern. de Pédiatr. 1997 ; 28 : 38-40.

18- Chabanon G., Archamband M.

Facteurs d'uropathogénicité chez *Escherichia coli*.

Méd. Mal. Inf. 1987 ; 17 (N° spécial) : 30-40

19 - Cimolai N., Basalgia S., Mah D.G., Morrison B.J. and Carter J.E.

A continuing assessment of risk factors for the developpment of *Escherichia coli* 0157: H7 associated with haemolytic uremic syndrome.

Clin. Nephrol. 1992; 4:2: 85-89

20- Courcoux P. et Le bouguenec C.

Diarrhées et le Sida en zone tropical ;

In « Guide pour l'identification des pathogènes de *Escherichia coli* associés à des diarrhées
; 1995 ; 1-7.

21- Damjanovic V. et Whitfield E.

Antibiotic sensitivities of urinary pathogens isolated from patients in Liverpool 1984-1985.

J. hyg. camb 1986; 97: 299-303.

22- Darfeuille – Michaud A., Anbel D., Forestier C., Rich C., Joly B.

Facteurs intervenant dans les variations du pouvoir d'adhésion des colibacilles entérotoxigènes
aux entérocytes humains in vitro.

Pathol. Biol. 1991 ; 91 : 185-190.

23- Darland G., Davis B.R.

Biochemical et serological characterization of hydrogen sulfite – positive variants of
Escherichia coli.

App. Microbiol. 1974 ; 27 : 54-58.

24- Delisle G.J. et ley A.

Rapid detection of *Escherichia coli* in urines samples by a new chromogenic β -glucuronidase
assay;

J. clin. Microbiol. 1989; 27: 778-779.

25- Demers B., Sansonetti P.

Mécanismes moléculaires des diarrhées bactériennes.

Méd. Ther. 1997 ; 3 : 315-325.

26- Donnenberg M.M., kaper J.B.

Enteropathogenic *Escherichia coli*

Infect. Immun. 1992; 60: 3953-3961.

27- Donnenberg M.S., Tacket C.O., Losonsky G., Nataro J.P., Kaper J.B. et Levine M.M.

The role of eae gene in experimental humain enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)
infection.

J. Clin. Invest. 1993; 92: 1412-1417.

28- Donnerberg M.S., Kaper J.B., Finlay B

. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells
Trends. Microbiol. 1997; 5; 109-114.

29- Dupont C., Benhamou P-H :

Traitement de la diarrhée aiguë de l'enfant
In. Rambaud J.C., Rampal. P. Diarrhées aiguës infectieuses.
Doin éditeurs-Paris 1993; 157-167.

30- Evans D.G., Evans D.J

New surface associated heat labile colonization factors antigen (CFA/II) produced by
enterotoxinogenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08
Infect. Immun. 1978; 21: 638-647.

31- Farmer J.J., Davis B.R., Hickman-Brenner F.W., et al.

.Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from
clinical specimens.
J. Clin. Microbiol. 1985; 21: 46-76.

32- Farmer J.J., Fanning G.R., Davis B.R., O'hara C.M., et al.

Escherichia fergusonii and *Escherichia taylora*, two new species of *Enterobacteriaceae* isolated
from clinical specimens.
J. clin. Microbiol. 1985; 21: 77-81.

33- Forestier C., Livrelli V. et Joly B.

Actualités sur l'épidémiologie et les facteurs de pathogénicité des *Escherichia coli* enterovirulents.
La lettre de l'infectiologue 1998 ; 33 : 9-14.

34- Frankel G., Phillips A.D., Rosenshine I. et al.

Enteropathogenic and enterohaemonagic *Escherichia coli*: more subversive elements.
Mol. Microbiol. 1998; 30: 911-921.

35- Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C. *Escherichia coli*.

In. Manuel de Bactériologie clinique
Edition scientifique Elsevier Paris 1992;2: 729-738.

36- Gassama A

Place des souches de *Escherichia coli* dans les diarrhées de l'adulte: pathotypes, phénotypes
d'adhésion et Antibiotypie.
Mémoire de D.E.A. de chimie et de Biochimie de produits naturel 1999

37- Germani Y.

Identification des souches de *Escherichia coli* possédant un phénotype d'adhésion cellulaire particuliers

in « Méthodes de laboratoire » Pouvoir entéro-pathogène des bactéries ;

Res. Microbiol. 1995; 143: 81-83.

38- Germani Y., Begaud E., Le bouguénec C.

Detection of the *Escherichia coli* attaching and effacing gene (eae A) in enteropathogenic strains by polymerase chain reaction.

Res. Microbiol. 1997; 148: 177-181

39- Giron J.A., Jones T., Millan-Velasco F. et all.

Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in mayan children in Mexico.

J. Infect. Dis. 1991;163: 507-513

40- Goldstein F.W, Kitzis M.D., Miegi M. and Acar J.F.

Susceptibility of high level cephalosporine-resistant *Escherichia coli* to b-lactam antibiotics.

Eur. J. of clin. Dis. And inf. 2000

41- Goldstein F.W. and stein E.G.

Trimethoprim and trimethoprim – sulfamethoxazole (cotrimoxazole).

In. Antimicrobiol therapy and vaccines. Yu V.L., Merigan T.C, Barrière J.R.,

Eds. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland USA. 1999: 995-1007.

42- Gomes T.A.T., Blake P.A., Trabulsi L.R.

Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to hela cells in infants with diarrhea and matched controls.

J. Clin. Microbiol. 1989; 27: 266-269.

43- Griffin P.M.

Escherichia coli 0157: H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

In : Blaser M.J., Qsmith P.D., Ravdin J.L., Greenberg H.B. and Guerrant R.L.(ed) Infections of the gastro-intestinal tract.

Raven Press. New York NY. 1995: 739-761.

44- Griffin P.M., Ostroff S.M., Tauxe R.V et al.

Illness associated with *Escherichia coli* 0157: H7 infections: a broad clinical spectrum.
Ann. Intern. Med. 1988; 109: 705-712.

45- Griffin P.M.and Tauxe R.V.

The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* 0157:H7; other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome.
Epidemiol. Rev. 1991; 13: 60-98.

46- Grimont F.

Recherche de *Escherichia coli* pathogènes dans les selles
Spectra biologie 1998 ; 17 ; 27-36.

47- Gutmann L., Kitsis M.D., Billot–Klein D., Goldstein F., Tran Van Nhieu G., Lu T., Carlet J., Collatz E. et Williamson R.

Plasmid-mediated β -lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam
. Rev. Infect. Dis. 1988; 10: 860-866.

48- Henrichsen C.

Rapid presumptive identification of *Escherichia coli* from urines samples a simple plating method.
Med. Lab. Sci. 1986; 43: 2-8.

49- Hicks S., Frankel G., Kaper J.B., Dougan G. and Phillips A.D.:

Role of intimin and bundle forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro.
Infect. Immun. 1998; 66(4); 1570-1578.

50- Izard D., Husson M.O., Vincent P. et Leclerc H.

Méthodes rapides et automatiques d'identification des entérobactéries.
Ann. Biol. Clin. 1983 ; 41 : 419-426.

51- Izard D., Husson M.O., Vincent P., Leclerc H.

Etude critique de 3 systèmes rapides d'identification des entérobactéries.
Rev. Fr. Lab. 1983 ; 120 : 48-50.

52- Izard D., Husson M.O., Vincent P., Leclerc H. Monget D., Boeufgras J.M.

Evaluation of the four-hour rapid 20 E system for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*.
J. clin. Microbiol. 1984; 20: 51-54.

53- Jallat C., Darfeuille – Michaud A. et Joly B

Actualité sur les coli bacilles responsables de diarrhées chez l'homme
Journées nationales de Biologie Lyon 15, 1994 : 25-33.

54- Jallat C., Levrelli V., Darfeuille – Michaud A., Rich C., Joly B.

Escherichia coli trains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains
J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 2031-2037.

55- Jerse A.E., Yu J., Tall B.D., Kaper J.B.

A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87 : 7839-7843

56- Karmali M.A., Steele B.T., Petric M. and Lim C.

Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin – producing *Escherichia coli* in stools.
Lancet 1983; i: 619-620

57- Karmali Ma .

Infection of verocytotoxin – producing *Escherichia coli*.
Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2: 15-38.

58- Kelly M.T. et Latimer J.M..

Comparison of the automicrobic system with API Enterotube, Micro ID, Micro Media system and conventional methods for identification of *Enterobacteriaceae*.
J. Clin. Microbiol. 1980; 12: 659-662.

59- Kernbaum S.

Infections du tube digestif, diarrhées bactériennes, virales et fongiques.
In. Kernbaum S, ed Eléments de Pathologie Infectieuse
Simep, Paris, 1985.:203-219

60- Killian M. et Bulow P.

Rapid diagnostic of *Enterobacteriaceae*.
Detection of bacterial glucosidases.

Actua. Pathol. Microbiol. scand sect B1976; 84: 245-251.

61- Le Minor L.,

Diagnostic de facteurs de pathogénicité des *Escherichia coli*, présent et perspectives.

Méd. Mal. Inf. 1987 ; 17 (N° spécial) : 87-91

62- Le Minor, Richard C.L., Mollaret H.H., Bercovier H., Alons J.M.

Entérobactéries. In: Le Minor L. et Veron M. Bactériologie médicale.

Flammarion, Paris, 1982, 240-315

63- Levine M.M.

Escherichia coli infections.

N. Engl. J. Medical 1985 ; 313 : 445-447.

64- Levine M.M., Ferricio C., Prado V., Cayazzo M., Abrego P., et al.

Epidemiologic studies of *E. coli* diarrheal infections in a low socio-economic level peri-urban community in Santiago, Chili.

Am. J. Epidemiol. 1993,138: 849-869.

65- Levine M.M.

. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxinogenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagics and Enteroadherent.

J. infect. Dis. 1987; 155: 377-98.

66- Lionsquy G., Delaitre E., Pin P, Bourlioux P. et Bourlioux N.

Fréquence d'isolement et de résistance aux antibiotiques des *E. coli* responsables d'infections urinaires en ville, en centre hospitalier spécialisé et centre hospitalier général.

Path. Biol. 1984 ; 32 : 389-392.

67- Mariani – Kurkdjian P, Bingen E.

Mécanismes physiopathologiques des *E. coli* intestinaux.

In: Choutet. P, Goldstein F.W. *Escherichia coli* : Aspects fondamentaux et cliniques

Phase 5 Editions Médicales.2000, 22-33.

68- Mariani – Kurkdjian P., Bingen E.

Escherichia coli 0157:H7, un agent pathogène émergent.

Pres. Med. 1999; 28: 2067-2074.

69- Mc Daniel T.K., Kaper J.B.

A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* K-12.
Mol. Microbiol. 1997; 23: 399-407.

70- Nataro J.P., KAPER J.B.

Diarrheagenic *Escherichia coli*.
Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11: 142-201.

71- Natarro J.P., Kaper J.B., Robins –Brown R., Prado V., Vial P., Levine M.M.

Patterns of adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* to hep- 2 cells.
Pediatr. Infect. Dis. J. 1987; 6: 829-31.

72- O'Brien A.D., homes P.K.

Shiga and Shiga like toxins.
Microbiol. Rev. 1987; 51: 206-220.

73- Orskov F., Genus I.

Escherichia. coli
Castellani and chalmers 1919, 941.
In: Krieg N. R. and JG Holt J. G., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology,
vol 1 –the Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1986

74- Orschov I., Orschov F.

Serology of *Escherichia coli* fimbriae.
Prog. Allergy 1983; 33: 80-105.

75- Pickering L.K., Obrig T.G., strapleton F.B.

Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
Pediatr. Infect. Dis. J. 1994; 13: 459-476.

76- Renaud F., Freney J., Gavini F., Boeufgras J.M., Fleurette J.

Comparaison de deux systèmes d'identification d'entérobactéries coliformes nouvellement
décrites ou rarement rencontrées en clinique.
Ann. Biol. Clin. 1990 ;48 :111-115.

77-Ricci L. and all.

A new fimbrial putative colonization factor (PCFO2) in human enterotoxigenic *Escherichia coli*
isolated in Brazil.
Inst. Pasteur, 1997;148: 65-69.

78- Riley K.L.W., Remis R.S., Helgerson S.D et al.

Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype.
N. Engl. J. Med. 1983; 308: 681-685.

79- Rotbaum R., MC Adams A.J., Giannella R., Partin J.C

A clinico pathogenical study of enterocyte adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants.
Gastroenterology 1982; 83: 441-454.

80- Salmon R.L., Farrel I.D., Hutchison J.G. et al.

A Christening party outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* 0157: H7.
Epidemiol. Infect. 1989; 103: 249-254.

81- Sansonetti P.J.

Escherichia coli entéropathogènes: données récentes sur la virulence.
Bull. Inst. Pasteur 1985 ; 83 : 5-18.

82- Sansonetti P.J.

Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness : from all assay systems to shigellosis .
Curr. Opin. Inf. Dis. 1992; 180: 1-19.

83- Schmidt H., Knop C., Franke S., Aleksic S., Heesemann J. and Karch H.

Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 701-705.

84- Scotland S.M., Smith H.R., Said B., Willshaw G.A., Cheasty T. and Rowe B.

Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching and effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence factor probe.
J. Med. Microbiol. 1991; 35: 278-283.

85- Silva M.R., Toledo M.R.F., Trabulsi L.R.

Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. 1980; 11: 441-444

86- Sirot D., Sirot J., Labia R., Morand A., Courvalin P., Darfeuille–Michaud A., Perroux R. et Cluzel R.

Transferable resistance to third–generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1 a novel B – lactamase.

J. Antimicrob. Chemoth. 1987; 20: 323-324

.

87- Soussy C., Duval J. et Courvalin P.

Résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli*: état actuel et nouvelles acquisitions.

Med. Mal. Infect. 1988 ; 18 : 29-36.

88- Soussy C.J. Quinolones In. Courvalin P., Goldstein F.W.,

L'antibiogramme, MPC,

videom, Paris.1985; 57-63.

89- Tarr I.P.

Escherichia coli 0157:H7: clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection.

Clin. Infect. Dis. 1995; 20: 1-20.

90- Tornieporth N.G., John. J., Salgado K. and all.

Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR.

J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 1371-1374

91- Vila J., Vargas M., Casals C., Urassa H., Mshinda H., Schellemborg D. and Gascon J.

Antimicrobiol resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifukara, Tanzania.

Antimicrobiol. Agents chemoth. 1999; 43: 3022-3024.

I- Préparation des milieux de culture

1- Solution métaux

- MgSO ₄ , 7H ₂ O	5g
- MnCL ₂	0,5g
- FeCl ₃	0,5g ou 0,5ml
- H ₂ SO ₄	100ml
- Eau distillée	100ml

Conserver à la température du laboratoire.

2- Milieu CAYE

- Casamino-acide	20g
- Extrait de levure	6g
- NaCl	2,5g
- Solution métaux	1ml
- KH ₂ PO ₄	1000ml

Conserver à la température du laboratoire .

II- Réactifs pour PCR

Le mélange réactionnel comprend:

-L'ADN (lysat)

- Les amorces : ce sont les primers qui sont à diluer de sorte à avoir 15-20 pmol/μl (éviter de diluer tout le stock)

- les nucléotides (dNTP) : ils sont fournis par Pharmacia à 100mM chacun . Faire un mélange des quatre de sorte à les avoir à une concentration finale à 1,25mM .

- Le tampon : tampon 10x Pharmacia Biotech ; sinon préparer le tampon d'amplification 10x .

- l'eau doit être très pure : (eau bi distillée stérile)

- La polymérase :(Taq DNA polymérase) Pharmacia Biotech 1,2U/réaction

1 -Amorces (primers)

-Séquences des amorces : ce sont les bornes du gènes

- Température d'hybridation :

2°C pour A et T

4°C pou C et G

En pratique , on enlève 5°C à la température d'hybridation théorique

Si on obtient une température supérieure à 65°C , on garde 65°C comme température d'hybridation .

Pour les amorces utilisées, on a les températures d'hybridation suivantes .

-eaeA	65°C
-ipaH	53°C
-EAggEc	53°C
-SLTI=VTI	56°C
-SLTII= VTII	56°C
-afa	65°C
-bfpA	57°C
-LT	56°C
-Sta	43°C

Les primers sont à diluer de sorte à avoir 15-20 pmol/μl (éviter de diluer tout le stock).

Aliquoter et conserver à -20°C .

Au moment des manipulations, les introduire dans de la glace pilée.

*Bfp gène 119:

Quantité:4130μg

Reprendre dans 100μl (41,30μg/μl)

Faire une dilution au 1/10 (100µl+900µlEBDS) puis au 1/400(10µl(1/10)+390µl EBDS)

*Bfp gène 443: dilution au 1/400

*eaeA gène 2412-2:Dilution au 1/350

*eaeA gène 2905-2:Dilution au 1/350

*LT gène 39-76: Dilution au 1/450

*LT gène 765-7: Dilution au 1/400

*ipaH gène 1061-10:Dilution au1/400

*ipaH gène 1484-14: Dilution au 1/450

*EAggEC1-64: Dilution au 1/350

*EAggEC 765-6: Dilution au 1/350

*SLT₁1161-12: Dilution au 1/350

*SLT₁1301-13: Dilution au 1/300

*SLT₂ 426-445: Dilution au 1/400

*SLT₂ 752-771: Dilution au 1/450

*afa 12: Dilution au 1/300

*afa 88: Dilution au 1/350

*STa₁: Dilution au 1/150

*STa₂: Dilution au 1/110

2- NUCLEOTIDES

- d ATP 250µl

- dCTP 250µl

- d GTP 250µl

-dTTP 250µl

-Eau distillée 19ml

Aliquoter (1ml) par tube ; stocker à -20°C .

Au moment des manipulations, travailler dans de la glace pilée.

3- TAMPON D'AMPLIFICATION

- 100mM Tris HCl pH 8,3 à 25°C

-500mM KCl

-15mM MgCl₂

-0,1% (m/v) gélatine , Sigma G 2500

4-Tableau PCR

Conc. gel en agarose	Facteurs de virulence	Taille amplicon	Temp. hybridation	Témoin positif	Pathotypes
2%	BfpA	325pb	57°C	E2348-69	EPEC
2%	eaeA	494pb	65°C	E2348-69	EPEC
3%	LT	707pb	56°C	EDL1493	ETEC
2%	SLTI	130pb	56°C	EDL933	EHEC
2%	SLTII	346pb	56°C	EDL933	EHEC
2%	agg	630pb	53°C	17.2	EaggEC
2%	ipaH	424pb	53°C	M90T	EIEC
2%	afa	750pb	65°C	A30	DAEC
3%	STa	182pb	43°C	EDL1493	ETEC

III-Solutions destinées à l'électrophorèse

1-EDTA 0,5M

-Triplex III	186g
-Eau distillée qsp	1000ml

Dissoudre à l'aide d'un barreau aimanté sur un agitateur magnétique

Ajuster à pH 8 .

Se conserve à la température du laboratoire

2- Tampon de migration:TAE 50X

-Tris base	242g
- Acide acétique glacial	57,1ml
- EDTA 0,5M pH 8	100ml
- Eau bi distillée qsp	1000ml

Dissoudre et ajuster à pH 8

Autoclaver 20minutes à 110°C

Conserver à la température du laboratoire.

3- Ladder (marqueurs de taille des fragments d'ADN)

-DNA ladder (échelle 1Kb)	50µl
-Solution bleue pour dépôt	250µl
-Eau bi distillée	350µl

Mélanger ; conserver à +4°C

4-Solution bleue pour dépôt

-Glycérol	50ml
-EDTA 0,5M pH 8	7ml
- Bleu de bromophénol	5mg
-Eau distillée qsp	100ml

Aliquoter; conserver à +4°C .

5-Bromure d'éthidium 10mg/ml

-Bromure d'éthidium 100mg

-Eau distillée 10ml

Dissoudre et transvaser dans un flacon bouché à vis ; envelopper le flacon dans une feuille de papier aluminium

Se conserve plusieurs semaines à +4°C.

IV-Réactifs pour la culture cellulaire

1- Solution de sels 10X EDTA :

EDTA 0,20g

NaCl 0,80g

KCl 0,20g

Na₂HPO₄ 1,15g

KH₂PO₄ 0,20g

Eau distillée stérile qsp 100ml

Autoclaver à 110°C pendant 20minutes

Conservation à +4°C

2-Solution de Giemsa:1/15

1V de colorant

7V H₂O distillée

7V H₂O du robinet

pH neutre

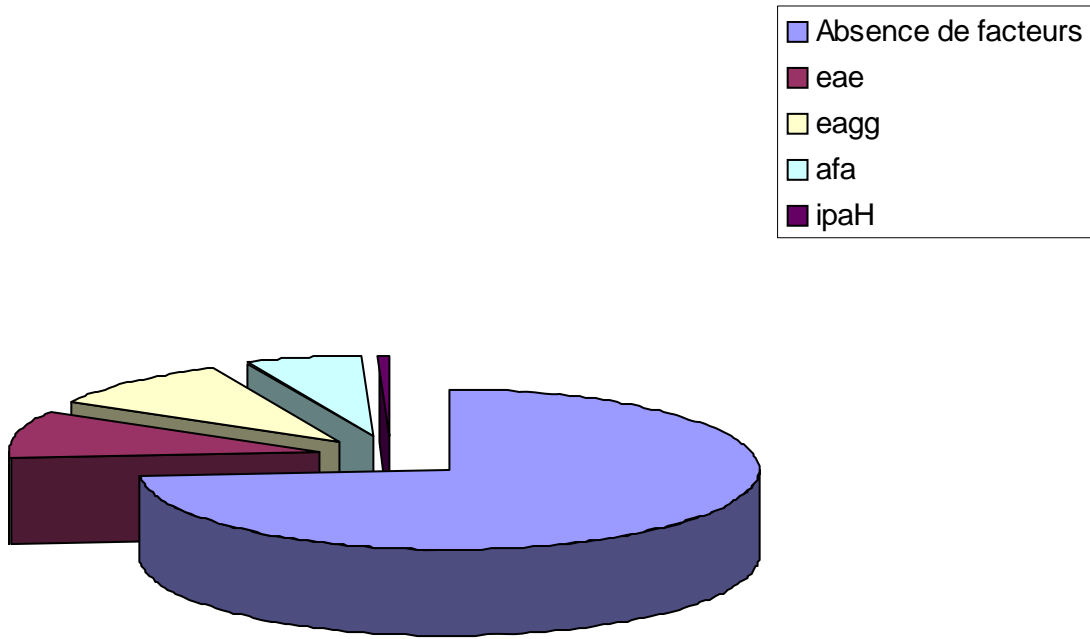


Figure 1: Répartition globale des facteurs de pathogénicité chez les sujets diarrhéiques

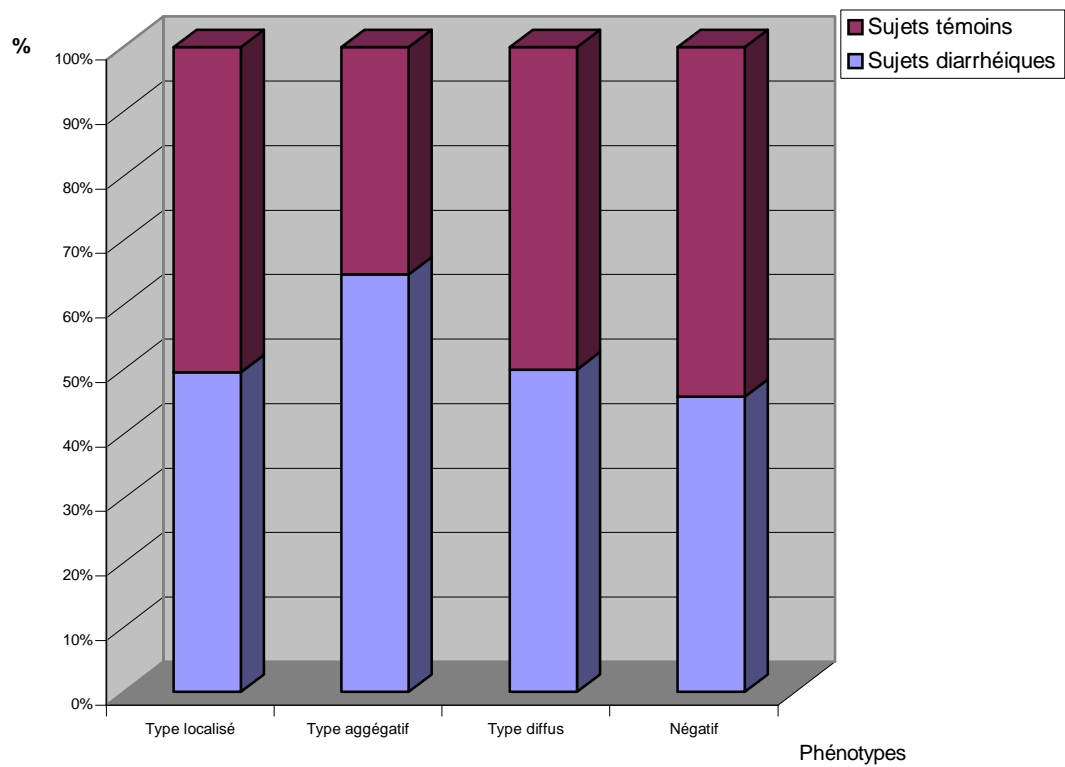


Figure 2: Fréquence des phénotypes d'adhésion en fonction des sujets

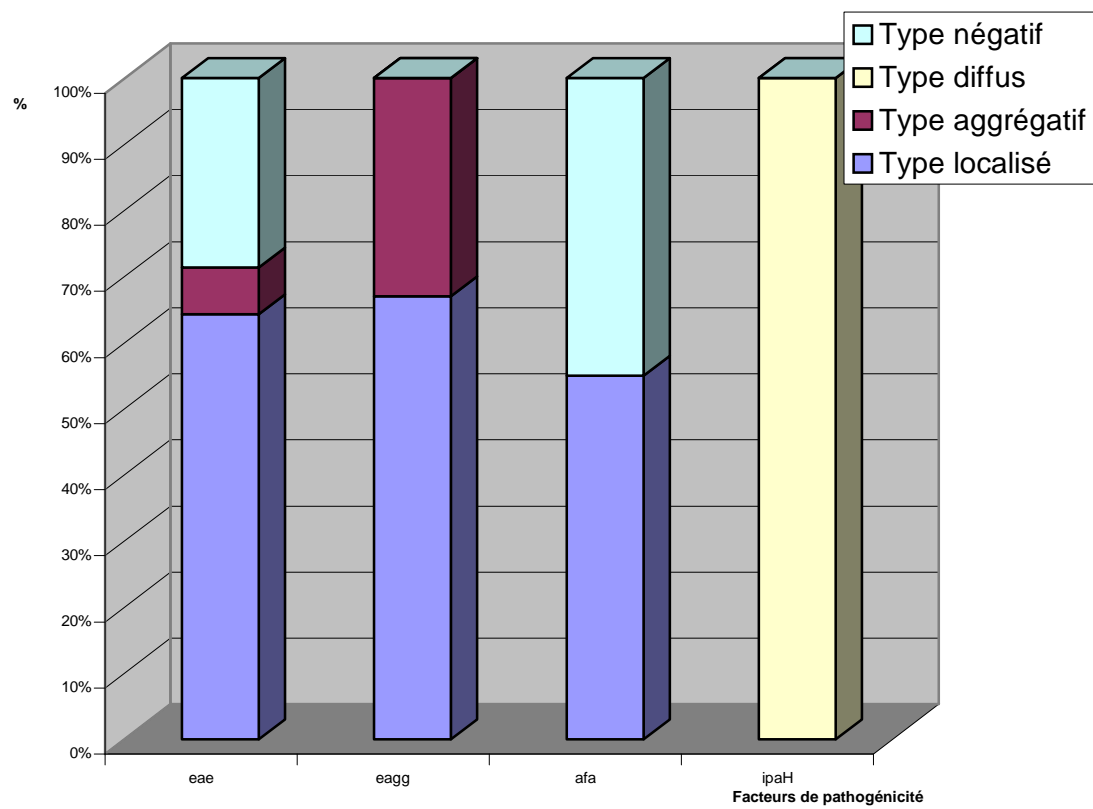


FIGURE 3: ASSOCIATION ENTRE PHENOTYPES D'ADHESION FACTEURS DE PATHOGENICITE.

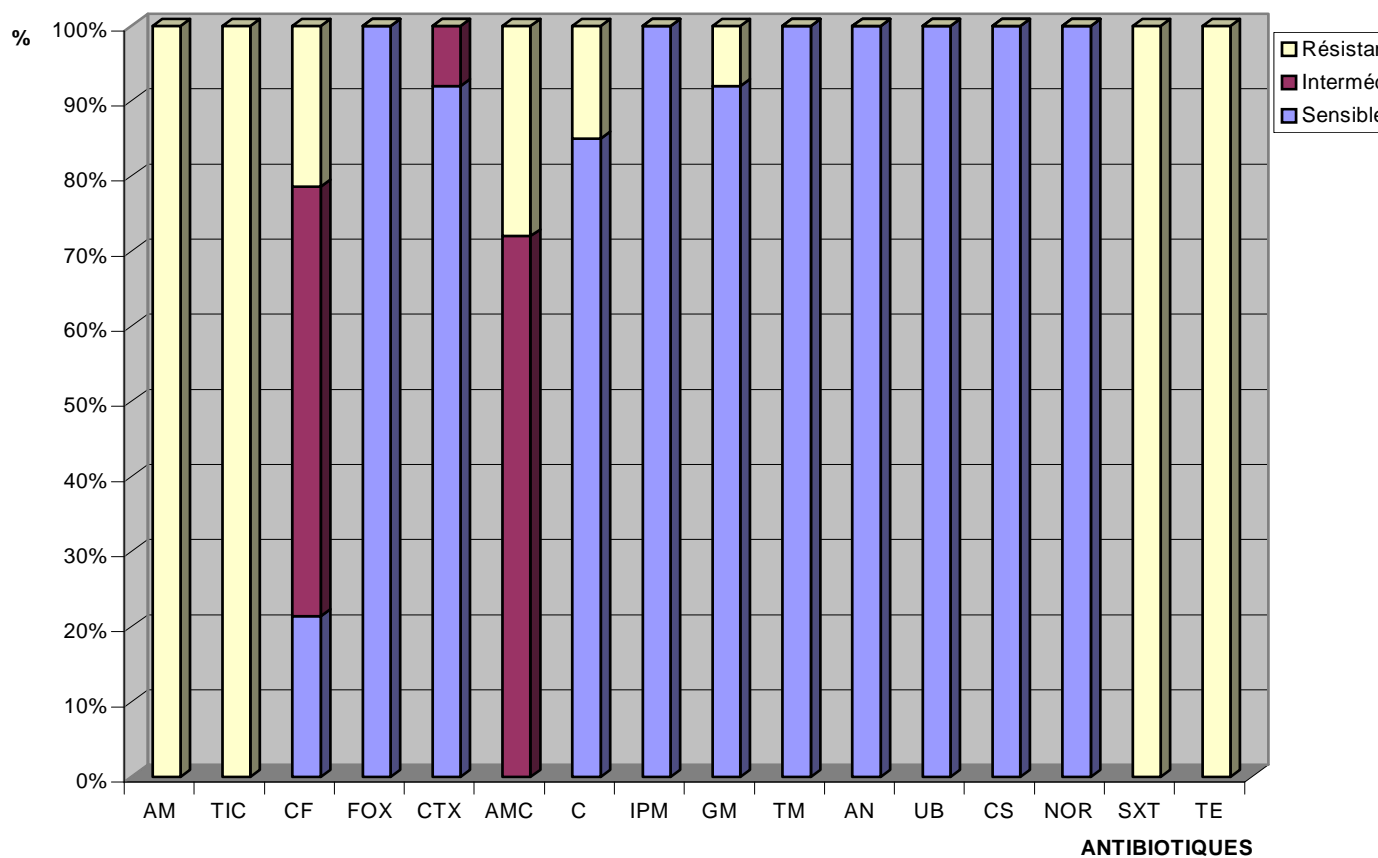


Figure 4 : PROFIL DE SENSIBILITE DES SOUCHES DIARRHEIQUES EPEC(eae) AUX ANTIBIOTIQUES

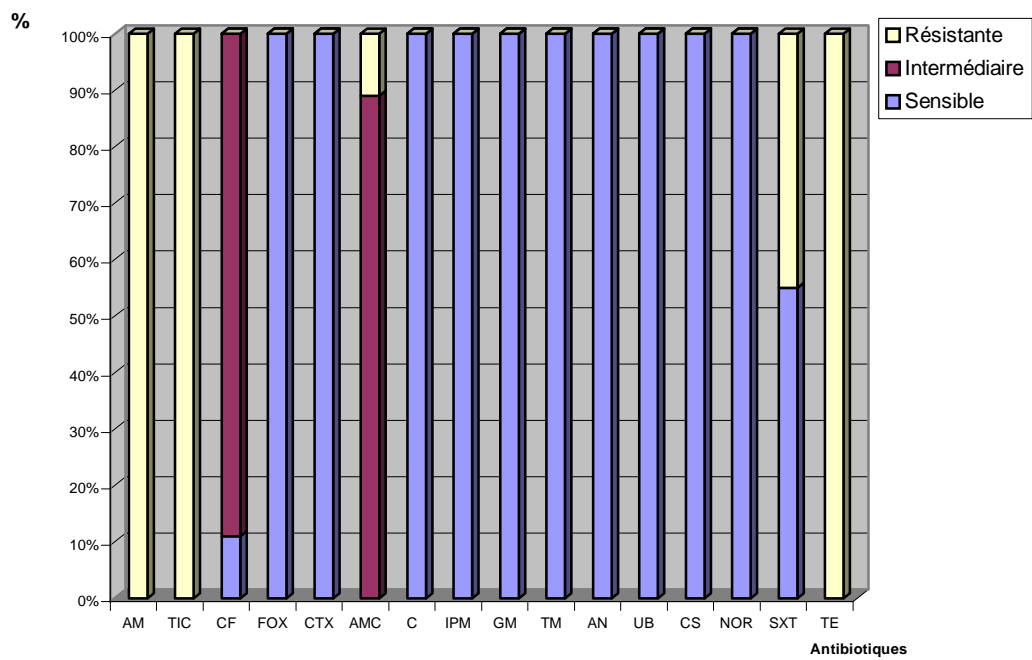


Figure 6: Profil de sensibilité des souches diarrhéiques DAEC (afa) aux antibiotiques

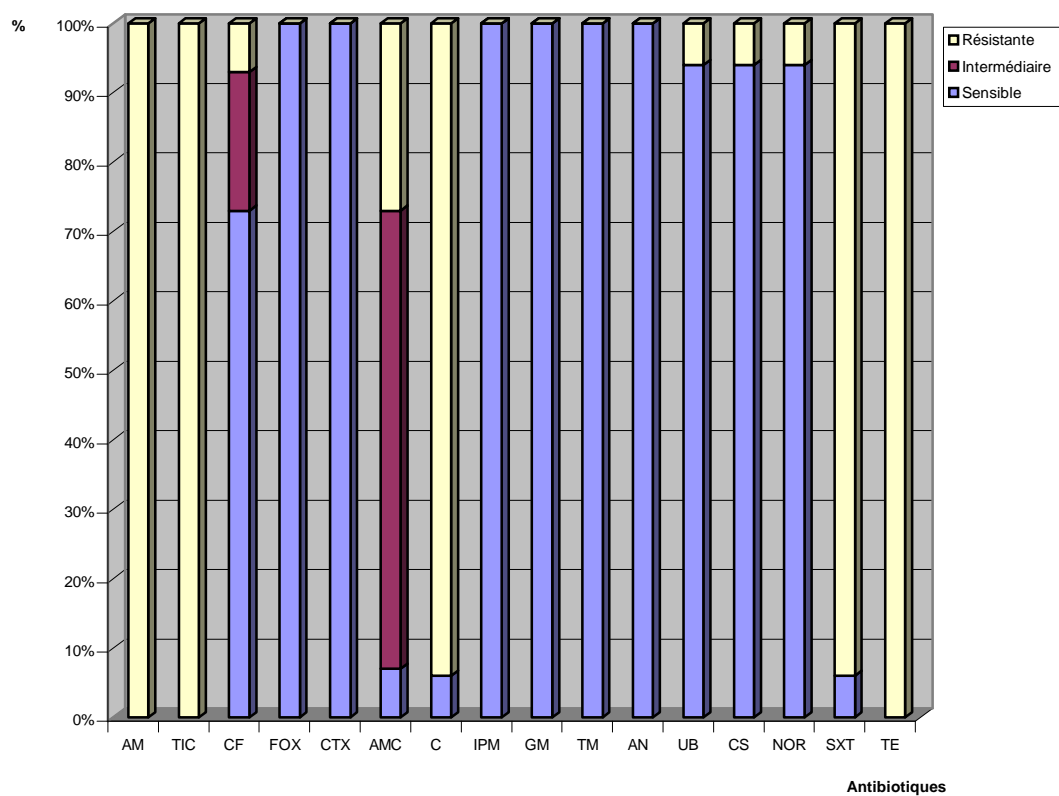


Figure 5: Profil de sensibilité des souches diarrhéiques d'EaggEC (Eagg) aux antibiotiques

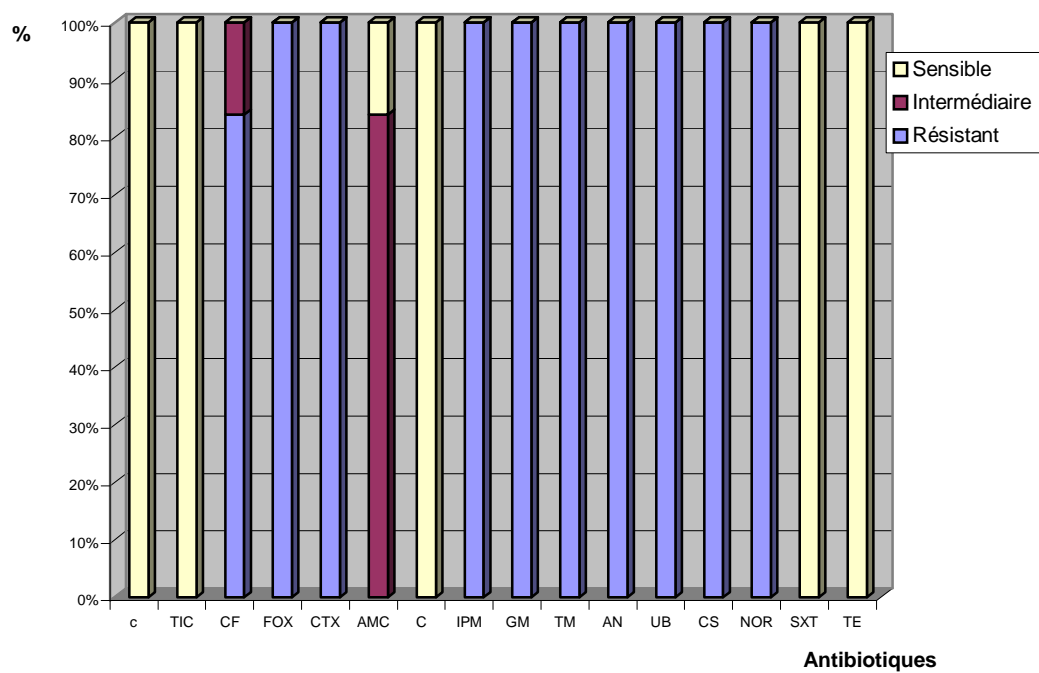


Figure 7: Profil de sensibilité des souches témoins EPEC (eae) aux antibiotiques

PHÉNOTYPES D'ADHÉSION

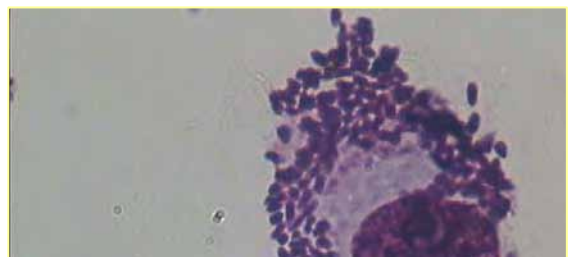
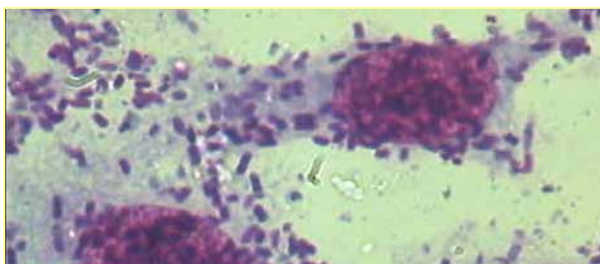


PHOTO A

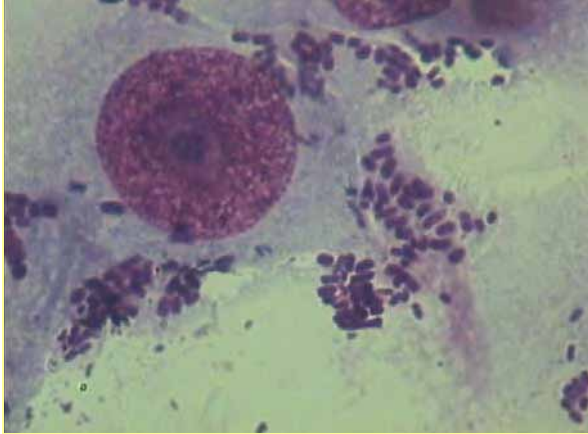


PHOTO B

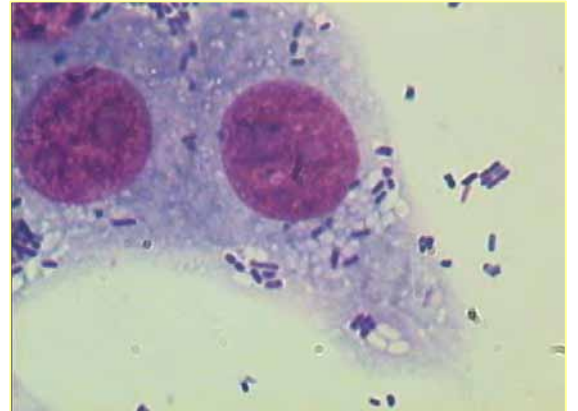


Photo A= Phénotype Diffus

Photo B= Phénotype Aggrégatif

Photo C= Phénotype Localisé

Photo D= Phénotype Négatif

MIGRATION DE PRODUITS DE PCR SUR GEL D'AGAROSE

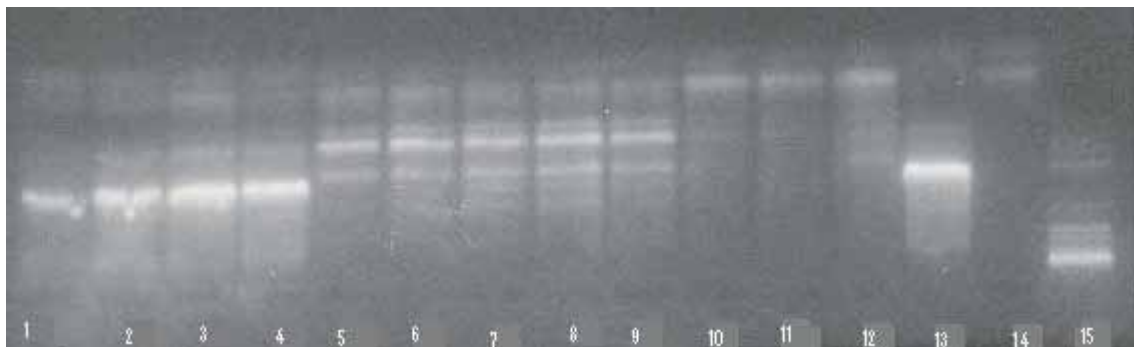


Photo A : PCR Eagg

1- 2-3-4 : Souches positives

5-6-7-8-9-10-11-12 : Souches négatives

13-Témoin positif

14-Hb101

15-Marqueur de taille(le témoins positif est à 630 pb)

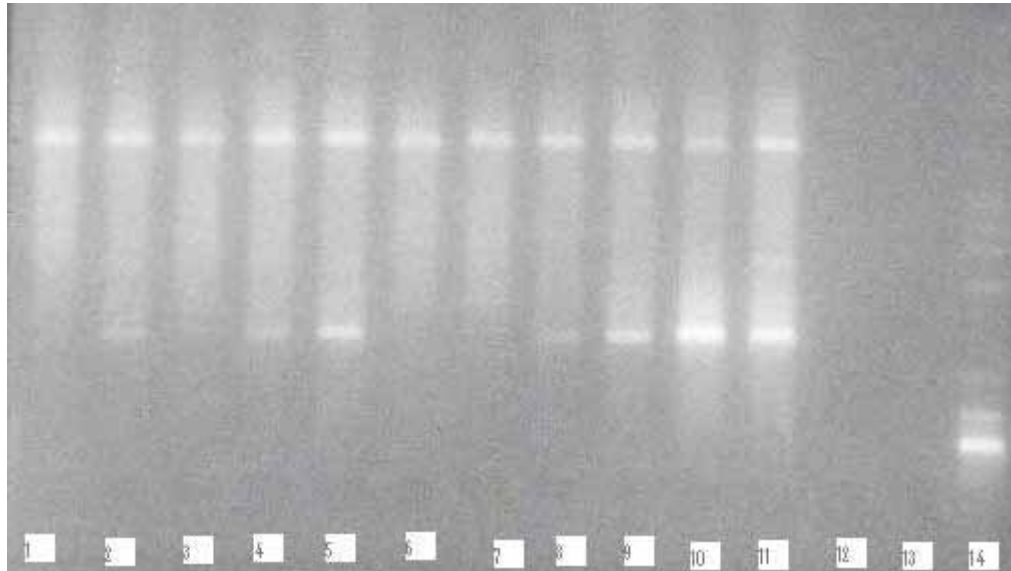


Photo B : PCRafa

1-2-3-4-5-6-7-8-9 : Souches positives

10-11 : Témoins positives

12-Témoin négatif

13-blanc

14-Marqueur de taille (le témoin positif est à 750 pb)