

Croissance, survie et détection des Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans différents types de matrices fromagères

Sarah Ganet

► **To cite this version:**

Sarah Ganet. Croissance, survie et détection des Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans différents types de matrices fromagères. Bactériologie. 2012. <hal-01466440>

HAL Id: hal-01466440

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01466440>

Submitted on 13 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par

Sarah GANET

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Croissance, survie et détection des
Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines
(STEC) dans différents types de matrices
fromagères**

Soutenu le 14 Novembre 2012

devant le jury suivant :

Mme. THEVENOT-SERGENTET Delphine – Tuteur scientifique

Mme. MATHIEU Laurence – Tuteur pédagogique

Mme. MIALET Sylvie - Rapporteur

Mr. TERZIAN Christophe – Président du jury

Mémoire préparé sous la direction de :

Mme Delphine THEVENOT-SERGENTET – delphine.sergentet@vetagro-sup.fr

VetAgro Sup - Laboratoire d'étude des microorganismes alimentaires pathogènes (LMAP), 1 avenue Bourgelat, 69280 MARCY L'ETOILE.

Et de

Mme Laurence MATHIEU – laurence.mathieu@univ-lorraine.fr

Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Laboratoire d'hydroclimatologie médicale, environnement et santé, UMR 7564 CNRS, Université de Lorraine, LCPME, Pole de l'Eau, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandoeuvre les Nancy



Table des matières

<u>Introduction</u>	5
<u>Mémoire bibliographique</u>	7
<u>A. Caractères généraux de l'espèce <i>E. coli</i></u>	7
<u>B. Facteurs de virulence des STEC</u>	9
<u>I. Les Shiga-toxines</u>	9
<u>1. Structure des Shiga-toxines</u>	9
<u>2. Mécanismes d'action des toxines Stx</u>	10
<u>3. Rôle des toxines dans la physiopathologie</u>	10
<u>II. Les facteurs d'adhésion</u>	11
<u>1. L'intimine</u>	11
<u>2. Autres facteurs d'adhésion</u>	12
<u>III. Autres facteurs de virulence</u>	12
<u>C. Aspect clinique des <i>E. coli</i> et pathologies humaines des EHEC</u>	13
<u>I. La colite hémorragique</u>	14
<u>II. Le syndrome hémolytique et urémique : SHU</u>	14
<u>III. Le purpura thrombotique et thrombocytopénique : PTT</u>	15
<u>D. Epidémiologie</u>	16
<u>I. Le réservoir animal</u>	17
<u>II. Les modes de transmission</u>	17
<u>III. Principales épidémies</u>	19
<u>E. Détection dans les aliments</u>	21
<u>I. Méthodes génétiques</u>	22
<u>1. Principe de la PCR en temps réel</u>	22
<u>II. Etape de confirmation</u>	23
<u>F. Connaissances relatives aux fromages</u>	24
<u>I. Définition</u>	24
<u>II. Le fromage dans l'alimentation -Consommation</u>	26
<u>III. Généralités sur la technologie fromagère</u>	26
<u>1. La coagulation</u>	27
<u>2. L'égouttage du coagulum</u>	28
<u>3. L'affinage</u>	29
<u>IV. La qualité hygiénique</u>	30
<u>1. Les contrôles chimiques</u>	30
<u>a. Le dosage de la matière sèche (extrait sec)</u>	30
<u>b. Le dosage de la matière grasse</u>	31
<u>2. Les contrôles de sécurité microbiologiques</u>	31
<u>Références bibliographiques</u>	33

Abréviation

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AEEC : EnteroAgregatif *Escherichia coli*
AFNOR : Agence Française de NORmalisation
AFSSA/ANSES : Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments/Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
AggR : gène codant pour l'adhésine fimbriaire aggrégative (AAF)
ANR : Agence Nationale pour la Recherche
AOC : Appellation d'Origine Controlée
AOP : Appellation d'Origine Protégée
ARN : Acide RiboNucléique
astA : gene codant la toxine EAST1
 a_w : Activité en eau
CDT : Cytolethal Distending Factor (cyclomoduline)
Cif : Cycle inhibiting factor (cyclomoduline)
CNIEL : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
CT : Cycle Threshold
DAEC : Diffused Adhesion *Escherichia coli*
DGAI : Direction Générale de l'Alimentation
eae : gene codant pour l'intime
EAST1 : Entérohémolysine thermostable (toxine)
E. coli : *Escherichia coli*
EHEC : *E. coli* EntéroHémorragique
ehx : gène codant pour l'entérohémolysine
EIEC : EnteroInvasive *Escherichia coli*
EPEC : *E. coli* entéropathogène
EPT : Eau peptonée tamponnée
EspP : sérine protéase
ETEC : EnteroToxinogene *Escherichia coli*
Fil : Fédération Internationale de Laiterie
Gb3 : Globotriosylcéramide
GDL : Glucono Delta-Lactone
HFD : Humidité du Fromage Dégraissé
hlyA : gène codant pour l'hémolysine A
HPI : High Pathogenicity Island
IMS : Immuno Magnetique Separation
ISO : International Organization for Standardisation
KatP : catalase peroxydase
LEE : Locus d'Effacement des Entérocytes
LMAP : Laboratoire d'Etude des Microorganismes Alimentaires Pathogères
MGB : Minor Groove Binding
Nle : Non LEEencoded Effector
PCR : Polymerase chaine reaction
pH : potentiel d'hydrogène

PTT : Purpura Trombotique et Trombocytopénique
Saa : STEC autoagglutinating adhesin
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique
STEC : ShigaToxine producing *Escherichia coli*
StcE : métalloprotéase
stx : gène codant la Shiga-toxine
Stx : Shigatoxine
SubAB : cytotoxine subtilase
VNC : Viable Non Cultivable

Introduction

Les *E. coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) sont reconnus à l'échelon international comme des pathogènes émergents. La dénomination STEC regroupe toutes les souches d'*E. coli* possédant les gènes *stx* codant une toxine particulière appelée Shiga like toxine. Selon la définition de l'AFSSA (avis du 15 juillet 2008), les STEC considérés comme pathogènes appartiennent aux 5 sérotypes O157:H7, O26:H11, O111:H8, O103:H2, O145:H28. Ils sont à l'origine de colites hémorragiques sévères, mais également de Syndromes hémolytiques et Urémiques (SHU). Ces SHU sont à ce jour, la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant entre 1 mois à 3 ans. Les STEC ont été associés à des épidémies alimentaires parfois de grande envergure, impliquant un très grand nombre d'aliments dont les végétaux comme les laitues, les pousses de radis, le jus de fruits et l'eau mais surtout la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite (Casenave *et al.*, 1993).

Le lait cru a rarement été associé à des épidémies humaines, cependant, les fromages au lait cru ont, quant à eux, été impliqués dans des cas sporadiques ou épidémiques (Baylis, 2009). En France, en novembre 2005, 11 enfants ont développé une infection à *E. coli* O26:H11 après avoir consommé du camembert contaminé. Quelques mois avant, 4 cas groupés d'infection à STEC avaient été recensés dans une même famille : après avoir consommé du fromage de chèvre au lait cru contaminé par *E. coli* O157:H7, 2 adultes et 2 enfants avaient présenté des diarrhées sanglantes, les 2 enfants avaient développé une complication sous forme de SHU (Espié *et al.*, 2006c).

Les fromages au lait cru font partie intégrante de la richesse et de la diversité de la gastronomie française. Nombre de régions, de villes et de villages sont connus pour leurs fromages au lait cru (la Savoie, Laguiole, Camembert, Roquefort...). Leur part dans la production totale des fromages affinés s'élève à 15 % (179 751 tonnes en 2006). Les fromages sous AOC (Appellation d'origine Contrôlée) et AOP (Appellation d'origine Protégée) représentent une large part de ces fromages au lait cru (140 619 tonnes en 2006 soit 78% de la production). Ainsi, une épidémie de grande ampleur pointant du doigt des fromages au lait cru contaminés par des STEC pathogènes pourrait entraîner la disparition de ces produits de terroir.

Il est donc urgent de mettre à disposition des industriels de la filière et des gestionnaires du risque, un outil de détection rapide, sensible et spécifique de ces pathogènes. Dans un premier temps, mon travail a consisté à mettre en place une PCR (Polymerase chain reaction) en temps réel destinée à détecter d'*E. coli* O157:H7. Ce sérotype a été choisi parmi les cinq car il est le plus souvent impliqué (plus de 80% des cas) dans les Toxi-Infections Alimentaires à STEC (Morgan *et al.*, 1993).

Les épidémies recensées pointent du doigt l'urgence de mieux connaître le comportement des STEC dans les matrices alimentaires et ainsi de mieux pouvoir les

détecter. C'est pourquoi dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au devenir des STEC dans différents process types de fabrications de fromage.

Des STEC inoculés artificiellement dans du lait ont subi différents traitements au cours de fabrications fromagères : les pâtes pressées non cuites avec affinage long, les pâtes pressées non cuites avec affinage court, les pâtes persillés, les pâtes pressées cuites, et les pâtes lactiques.

Et enfin nous avons étudié le comportement des STEC en présence d'autres microorganismes expérimentalement ensemencés au cours de la fabrication d'une pâte pressée non cuite dont certains paramètres de fabrication ont été modifiés. Les STEC ont fait l'objet d'une attention particulière lors de la fabrication du fromage ce qui nous a permis d'étudier leur interaction en présence d'une souche bactérienne de *Hafnia alvei* naturellement présente en quantité importante dans les fromages.

Mémoire bibliographique

A. CARACTERES GENERAUX DE L'ESPECE *E. COLI*

En 1885, le pédiatre allemand Théodore Escherich isole et décrit pour la première fois le bacille *Bacterium coli commune*, fréquemment présent dans les selles des nourrissons. En 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli*.

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, fréquemment retrouvé dans l'intestin et les fèces des mammifères. Les espèces qui constituent cette famille sont des bacilles à Gram négatif de dimension moyenne (0,5-1µm de large et 1-6µm de long), aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor *et al.*, 1990).

Le genre *Escherichia* regroupe traditionnellement cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. fergusonii*. Chaque espèce d'*Escherichia* possède des caractéristiques biochimiques spécifiques, permettant de les différencier (Grimont, 1987). Il faut noter que Priest and Barker (2010) ont démontré que les souches d'*E. blattae*, anciennement classés dans le genre *Escherichia*, devaient en réalité être reclassées dans le genre *Shimwellia* en tant qu'espèce *Shimwellia blattae*.

Escherichia coli fait partie de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) (Greatorex and Thorne, 1994), ainsi il représente près de 80% de la microflore aérobie (Ghebru, 1988). A ce titre *Escherichia coli*, et plus largement les coliformes thermotolérants¹, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes de même origine (par exemple *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Shigella*...).

Même si la plupart des souches sont non pathogènes de l'Homme, certaines peuvent être à l'origine de pathologies extra-intestinales (infections urinaires, infections systémiques telles que des septicémies, méningites²) (Pohl, 1993) ou intestinales (Levine, 1987).

Les souches d'*E. coli* pathogènes intestinaux (STEC) sont capables de se multiplier, de persister dans le tractus digestif en contournant les défenses immunitaires de l'hôte, et d'induire des dommages au niveau des cellules du tube digestif. Néanmoins, ces souches

¹ Qui fermentent le lactose à 44°C

² La méningite est une inflammation des méninges (enveloppes de la moelle épinière et du cerveau dans lesquelles circule le liquide céphalorachidien).

ont développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques de gravité variable, pouvant être accompagnés de complications extra-digestives.

La classification des STEC la plus utilisée par les microbiologistes est fondée en grande partie sur les travaux de Kauffmann (1947), et se base sur la détermination :

- du sérotype, identifié selon l'antigène somatique O. Plus de 180 sérogroupes O d'*E. coli* sont actuellement connus (Stenutz *et al.*, 2006);
- du sérotype, identifié au sein du sérotype sur la base des antigènes H flagellaires (56 antigènes différents) et éventuellement des antigènes K de la capsule (80 antigènes) (Gyles, 2007).

B. FACTEURS DE VIRULENCE DES STEC

I. Les Shiga-toxines

La dénomination STEC (*Escherichia coli* producteur de Shiga-toxin) regroupe toutes les souches d'*E. coli* possédant les gènes *stx* codant une toxine particulière, appelée Shiga-toxine ou vérotoxine, quels que soient les signes cliniques associés. Cette cytotoxine est capable de lyser *in vitro* les cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique) en stoppant de façon irréversible leur multiplication.

Ces toxines sont regroupées sous le terme de Shiga-toxines (Stx) étant donné leurs homologies avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1 (Strockbine *et al.*, 1988).

Néanmoins, tous les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme. Les STEC isolés de patients présentant des signes cliniques sont dénommés EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques).

1. Structure des Shiga-toxines

Les shigatoxines sont codées par deux gènes, *stx1* et *stx2*, qui sont généralement portés par des prophages de type Lambda³. Les Shiga-toxines sont des hexapeptides de 70-kDa constitués d'une sous-unité A (active) de 33-kDa qui porte l'activité catalytique, et de 5 sous-unités B (Binding) de 7,7-kDa nécessaires à la fixation au récepteur Gb3 (globotriosyl céramide 3) (Fraser *et al.*, 2004).

Deux grandes classes de Shiga-toxines sont aujourd'hui identifiées : les toxines Stx1, qui sont neutralisables par des anticorps anti-Shiga-toxine de *Shigella dysenteriae* 1, et les toxines Stx2 qui ne le sont pas (Calderwood *et al.*, 1996). Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99 % et 56 % d'homologie vis à vis de la séquence en acides aminés de la toxine de type 1 de *Shigella dysenteriae* (Strockbine *et al.*, 1988). Elles se distinguent par leurs propriétés immunologiques, mais leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. Cependant, les toxines Stx1 et Stx2 ne semblent pas traverser de la même façon la barrière de l'épithélium intestinal (Hurley *et al.*, 1999). Par ailleurs, des études ont montré que Stx2 serait 1000 fois plus cytotoxique sur les cellules endothéliales rénales humaines que la toxine Stx1 (Louise et Obrig, 1995). Ces résultats sont à rapprocher des données épidémiologiques indiquant que les souches responsables des troubles les plus sévères chez l'homme produisent la toxine Stx2 (Boerlin, 1999).

Depuis la première description des Shiga-toxines, un nombre conséquent de variants génétiques des toxines Stx1 et Stx2 ont été décrits (Beutin *et al.*, 2007).

³ Virus à ADN double brin prolongé d'une queue permettant l'ancrage à la bactérie.

Le gène *stx1* possède 3 sous-types (*stx1a*, *stx1c* (ovins), *stx1d*) alors que le gène *stx2* en possède 7 (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d* (activable⁴), *stx2e* (porc), *stx2f* (aviaire), *stx2g*) (Brett *et al.*, 2003).

Ces sous-types présentent des différences d'activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs (Calderwood *et al.*, 1996).

2. Mécanismes d'action des toxines Stx

Lors d'une première étape, la toxine se fixe à la membrane cytoplasmique de la cellule cible : les sous-unités B, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3 (galactose- (1-4)-galactose- (1-4)-glucosyl-céramide) (Lingwood *et al.*, 1987).

Cependant, le mécanisme impliqué reste à l'heure actuelle inconnu (Schüller *et al.*, 2004). La toxine est ensuite internalisée par un mécanisme d'endocytose et passe à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont disulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme, exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque la sous-unité 60S du ribosome (Lea *et al.*, 1999), conduisant à un arrêt des synthèses protéiques et par conséquent à la mort cellulaire.

3. Rôle des toxines dans la physiopathologie

In vivo, les Shiga-toxines sont produites par les EHEC après colonisation de la muqueuse intestinale mais les mécanismes de sécrétion de ces toxines par les bactéries ne sont pas précisément connus. Les toxines traversent ensuite l'épithélium intestinal. Les toxines sont ensuite véhiculées dans la circulation sanguine (toxémie) par les globules rouges ou les polynucléaires jusqu'aux organes cibles (Fernandez *et al.*, 2006). Les cellules endothéliales vasculaires, en particulier celles du côlon, des glomérules rénaux et du système nerveux central, sont particulièrement riches en Gb3. Elles constituent donc les cellules cibles privilégiées des Shiga-toxines, ce qui explique les manifestations cliniques observées lors d'infections par les EHEC : colite hémorragique, insuffisance rénale, troubles neurologiques.

Les Shiga-toxines constituent l'un des principaux facteurs de virulence des STEC mais tous les variants ne présentent pas la même toxicité chez l'homme. Par ailleurs, d'autres facteurs de virulence interviennent dans le processus infectieux, en particulier ceux permettant la colonisation du tube digestif.

⁴ Toxicité augmentée de 10 à 1000 fois dans le mucus intestinal humain (Kokai-Kun *et al.*, 2000).

II. Les facteurs d'adhésion

Après avoir atteint l'estomac, les bactéries se retrouvent dans l'intestin où elles colonisent la muqueuse en adhérant aux cellules épithéliales. Le côlon est le principal site de colonisation des STEC chez l'Homme (Griffin *et al.*, 1990).

La colonisation du tube digestif est une étape majeure de la physiopathologie des STEC et fait intervenir plusieurs facteurs d'adhésion dont les principaux sont les facteurs impliqués dans le développement des lésions d'attachement et d'effacement des entérocytes.

1. L'intimine.

Les souches de STEC possèdent des facteurs de virulence leur permettant d'adhérer de façon intime aux cellules épithéliales. Cette adhésion est à l'origine de lésions dites d'attachement-effacement caractérisées par un effacement des microvillosités intestinales subséquent à une réorganisation du réseau d'actine⁵ de la cellule épithéliale. Ce réarrangement du cytosquelette provoque l'apparition d'un piédestal sous la bactérie (Frankel *et al.*, 1995).

Dans la plupart des cas, les gènes nécessaires à la formation de lésions d'attachement et d'effacement sont localisés sur un îlot de pathogénicité de 43,36 kb appelé LEE pour Locus d'Effacement des Entérocytes⁶, situé sur le chromosome bactérien.

A ce jour, au moins 14 variants du gène ont été retrouvés chez les *E. coli* possédant le LEE (alpha _, beta _, gamma _, delta _, epsilon _, zeta _, iota _, eta η κ kappa _, lambda _, mu _, nu _, theta _, et xi _).

Toutes les souches possédant le locus d'effacement des entérocytes (LEE), incluant le gène *eae*, appartiennent au groupe des AEEC pour « *Attaching and effacing E. coli* », quels que soient les signes cliniques associés. Lorsqu'elles sont associées à une diarrhée aqueuse chez l'Homme et qu'elles ne produisent pas de toxines Stx on les appelle EPEC.

Les souches STEC qui possèdent le gène *eae* et *stx* et qui provoquent des lésions d'attachement et d'effacement aux cellules intestinales de l'iléon distal et du côlon sont dites EHEC « typiques ».

Les souches EHEC typiques appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O111:H8, O103:H2 et O145:H28 (mobiles et non mobiles) sont les souches les plus fréquemment associées à des signes cliniques graves (SHU) et aux épidémies et sont dites souches « EHEC typiques majeures » (AFSSA saisine 2010-SA-0031).

⁵ Protéine importante pour l'architecture et les mouvements cellulaires

⁶ Les LEE sont des opérons transcriptionnels fonctionnels (des groupes de gènes permettant de coder des protéines).

Le terme d'EHEC « atypiques » est utilisé pour désigner des souches qui ne possèdent pas le gène *eae* et ne produisent donc pas de lésion d'attachement et d'effacement (Nataro and Kaper, 1998). Les souches EHEC « atypiques » possèdent le gène *stx* au même titre que les souches EHEC « typiques ».

2. Autres facteurs d'adhésion

Les souches LEE-négatives sont en général non pathogènes, mais certaines d'entre elles ont cependant été associées à des SHU (EHEC atypiques). Ces souches atypiques possèdent donc d'autres facteurs d'adhésion permettant une colonisation de la muqueuse colique aussi efficace que l'intimine.

Plusieurs adhésines potentielles ont été décrites chez des souches EHEC atypiques telles que l'adhésine Saa (pour « STEC autoagglutinating adhesin ») des souches O113:H21 isolées en Australie en 1998 (Paton *et al.*, 2001), les facteurs d'adhésion plasmidiques des souches O111:H2 isolées en France en 1996 (Morabito *et al.*, 1998), ou encore l'adhésine AggR (l'adhésine fimbriaire aggrégative AAF) retrouvée dans la souche épidémique *E. coli* O104:H4 allemande en 2011.

Ainsi, de nombreuses protéines susceptibles de jouer un rôle dans la colonisation du tube digestif par les EHEC ont été décrites. Cependant leur implication dans la pathogénicité des souches reste encore à démontrer.

III. Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence potentiels, codés par des gènes présents sur le chromosome ou sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages ou îlots de pathogénicité) ont été décrits chez les souches EHEC (Croxen et Finlay, 2010).

Ils regroupent :

- des toxines, telles que l'entérohémolysine (Ehx), l'entérohémolysine thermostable EAST1, la cytotoxine subtilase (SubAB), les cyclomodulines CDT (pour « Cytotoxic Distending Factor ») et Cif pour « Cycle inhibiting factor ») ;
- des protéases, telles que la sérine protéase EspP, la catalase peroxydase KatP, la métalloprotéase StcE ;
- des systèmes de captation du fer, notamment le sidérophore codé par l'îlot de pathogénicité HPI (pour « High Pathogenicity Island ») ;
- des systèmes de résistance à l'acidité gastrique ;
- des uréases ;
- des protéines de fonction inconnue telles que les effecteurs Nle (pour « Non LEEencoded effector »).

La liste de ces facteurs de virulence potentiels ne cesse de s'allonger mais à ce jour, leur rôle respectif dans la pathogénicité des EHEC n'est pas démontré.

Les « O Islands » (OI) sont des cas particuliers car ils correspondent à des îlots ou segments génétiques présents dans le génome des EHEC (dont *E. coli* O157:H7) mais absents du génome des *E. coli* non pathogènes. Au total, 177 îlots ont été identifiés (Perna *et al.*, 2001) dont certains contiennent des facteurs de virulence potentiels, d'où leur qualification d'îlots de pathogénicité.

Certains îlots regroupent des gènes codant pour des effecteurs de type III appelés Nle (Tobe *et al.*, 2006). La distribution des gènes *nle* au sein des îlots est variable d'une souche à l'autre, et l'on remarque que plus les îlots contiennent de gènes *nle* (c'est à dire plus ils sont complets), plus le risque de pathologie est important. Cette observation est valable pour trois îlots de pathogénicité: OI-57, OI-71 et OI-122 (Coombes *et al.*, 2008). Au total, 14 gènes *nle* (*nleA*, *nleB*, *nleC*, *nleE*, *nleF*, *nleG*, *nleG2-1*, *nleG2-3*, *nleG5-2*, *nleG6-2*, *nleG9*, *nleH1-2*, *nleH1-1*, et *ent/espL2*) ont été identifiés comme étant plus fréquemment présents dans des souches EHEC que dans des souches STEC n'ayant jamais provoqué d'épidémie ou de SHU (Coombes *et al.*, 2008). De plus, ces gènes contribuent de manière additive à la virulence (« effet dose ») puisque les souches à l'origine soit de SHU soit d'épidémies contiennent un nombre plus élevé de gènes *nle* que les souches non virulentes.

Plusieurs autres facteurs encore inconnus ou mal déterminés semblent intervenir dans le pouvoir pathogène des EHEC. De plus, bien que les caractéristiques de la souche incriminée, en particulier l'ensemble des facteurs de virulence exprimés, soient probablement déterminantes, le processus infectieux des EHEC est multifactoriel et dépend aussi de facteurs liés à l'hôte.

Points à retenir

La dénomination STEC (*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines) regroupe toutes les souches d'*E. coli* possédant les gènes *stx* codant une toxine particulière, appelée Shiga-toxine ou vérotoxine.

Les STEC sont qualifiés de pathogènes émergents, néanmoins, tous les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme.

La dénomination EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques) concerne les STEC pathogènes pour l'homme possédant les gènes *eae* et *stx*.

Les shigatoxines et l'intimine constituent les deux protéines majeures impliquées dans le pouvoir pathogène des EHEC, même si tous les variants de *stx* ou de *eae* ne semblent pas présenter la même toxicité ou la même spécificité pour l'Homme.

C. ASPECT CLINIQUE DES E. COLI ET PATHOLOGIES HUMAINES DES EHEC

En médecine humaine, sur la base des signes cliniques observés chez les patients, les souches d'*E. coli* pathogènes sont classées en 6 groupes :

- Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) responsables de la « diarrhée du voyageur ». La contamination se fait essentiellement par les eaux de boisson.
- Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) responsables de diarrhées aqueuses pouvant évoluer vers un syndrome dysentérique (lésions de l'intestin grêle ou du colon).
- Les *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC) entraînent des diarrhées aqueuses persistantes chez les jeunes enfants et les immunodéprimés.
- Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) sont à l'origine de diarrhées et d'infections urinaires.
- Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont responsables de diarrhées sévères, principalement chez les enfants de moins de 12 mois dans les pays en voie de développement. Des lésions histopathologiques particulières apparaissent lors des infections, appelées lésions d'attachement et d'effacement (Kaper *et al.*, 2004).
- Les *E. coli* enterohémorragiques (EHEC) sont associés à des troubles variés allant de la diarrhée aqueuse bénigne à la colite hémorragique. Dans les cas les plus graves, ces signes digestifs peuvent être associés à une insuffisance rénale sévère, le syndrome hémolytique et urémique (SHU), ou à un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) parfois accompagné d'une atteinte sévère du système nerveux central (Karmali *et al.*, 1983), comme précisé ci-dessous.

I. La colite hémorragique

La colite hémorragique constitue la principale manifestation clinique de l'infection à *E. coli* O157:H7 (Tarr, 1995). Elle se définit par des crampes abdominales, une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante chez un patient généralement apyrétique⁷ ou subfébrile⁸ (Griffin and Tauxe, 1991). La diarrhée sanglante est présente dans 90% des cas diagnostiqués (Tarr, 1995). La période d'incubation de 2 à 10 jours, est plus longue que celle observée pour les autres diarrhées infectieuses (Sharp *et al.*, 1994). L'évolution est généralement spontanément favorable (90% des cas) en quelques jours.

Il n'existe pas de traitement spécifique en dehors de la suppression des apports alimentaires et de la mise en route d'une nutrition parentérale⁹ si nécessaire jusqu'à l'évolution positive de l'état de santé du patient (Su et Brandt, 1995). A noter que l'utilisation d'antibiotiques reste à ce jour controversée.

II. Le syndrome hémolytique et urémique : SHU

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) a été décrit pour la première fois en 1955 par (Gasser *et al.*, 1955) mais le lien entre la survenue d'un SHU et une infection intestinale par des EHEC n'a été établie qu'en 1983 (Karmali *et al.*, 2004). Deux types de SHU ont été décrits.

⁷ Qui ne présente pas de fièvre

⁸ Qui présente une fièvre légère comprise entre 37.3 et 38°C

⁹ Fait de suppléer artificiellement à l'alimentation d'un patient par voie intraveineuse en évitant ainsi le circuit habituel de l'alimentation et de la digestion

Le SHU typique touche surtout l'enfant de moins de 3 ans et survient brutalement après une diarrhée sanglante dans la majorité des cas.

L'apparition du SHU se fait en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs. Deux à 7 % des patients atteints d'une infection intestinale à *E. coli* O157:H7 développent un SHU. Cette incidence est supérieure chez l'enfant et les personnes âgées : 10 % chez les enfants de moins de 10 ans et 10 à 20 % chez les sujets âgés (Griffin and Tauxe, 1991).

Une atteinte d'autres organes (pancréas, foie et système nerveux central) est également possible (Siegler, 1995). L'atteinte du système nerveux central est d'ailleurs actuellement la principale cause du décès, comme le montre cette enquête française qui indique que 4 des 286 enfants atteints de SHU entre 1993 et 1996, sont décédés suite à une atteinte du système nerveux central. (Decludt *et al.*, 2000).

Ce tableau clinique est caractéristique et ne pose généralement pas de problème de diagnostic.

Le SHU atypique, quant à lui, survient sans prodrome diarrhéique et sans prédominance saisonnière. Il apparaît après des symptômes respiratoires, de la fièvre ou des vomissements et son diagnostic n'est pas aussi aisé que pour la forme typique (Amirlak and Amirlak, 2006).

Il n'existe pas de traitement spécifique modifiant l'évolution du SHU. Toutefois, la mise en route précoce d'un traitement symptomatique rigoureux a une importance capitale et permet de maintenir actuellement un taux de mortalité inférieur à 5%.

Il consiste essentiellement en des apports nutritionnels et hydro-électrolytiques par voie orale, éventuellement entérale au moyen d'une sonde gastrique, voire parentérale à l'aide de solutions isotoniques dans les cas les plus graves (Loukiadis, 2007).

Malgré une guérison apparente, la plupart des patients sont susceptibles de développer des complications tardives. Ainsi, les patients ayant présenté un SHU avec une anurie de plus d'une semaine doivent faire l'objet d'une surveillance à très long terme (Nangaku *et al.*, 2007).

III. Le purpura thrombotique et thrombocytopénique : PTT

Le purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) est une entité clinique décrite pour la première fois par Moschcowitz en 1925 (Moschcowitz, 2003). Comme pour le SHU, l'étiologie du PTT peut être de diverses origines (toxique, auto-immune...), et la relation entre l'infection par *E. coli* O157:H7 et l'apparition de ce syndrome est récente (Kovacs *et al.*, 1990).

Le PTT est rare et survient le plus souvent chez l'adulte (pic de fréquence chez les femmes autour de 40 ans). Il est exceptionnel chez l'enfant et la personne âgée. Le PTT se caractérise par une anémie hémolytique micro-angiopathique, une thrombocytopénie, une fièvre, une atteinte neurologique prédominante (modifications du comportement,

paresthésie, aphasie, troubles visuels, coma) et des anomalies rénales inconstantes (insuffisance rénale présente dans environ la moitié des cas) (Tarr *et al.*, 2005).

Le PTT et le SHU peuvent être distingués par des critères épidémiologiques et cliniques mais également biologiques

Le 25 avril 2008 la Direction générale de l'alimentation (DGAL) a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) afin de donner une définition des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines (STEC) considérées comme pathogènes pour l'homme.

Grace à tous ces éléments, l'avis du 15 juillet 2008, mis à jour le 31 mai 2010 de l'AFSSA précise que :

« A ce jour, les souches STEC hautement pathogènes « EHEC typiques majeurs », peuvent être définies selon les critères génétiques suivants :

EHEC O157:H7 = *rfbEO157, flicH7, stx1* et/ou *stx2, eae-gamma*, (OI#122).
EHEC O26:H11 = *wzxO26, flicH11, stx1* et/ou *stx2, eae-bêta*, (OI#122).
EHEC O145:H28 = *ihp1O145, flicH28, stx1* et/ou *stx2, eae-gamma*, (OI#122).
EHEC O103:H2 = *wzxO103, flicH2, stx1* et/ou *stx2, eae-epsilon*, (OI#122).
EHEC O111:H8 = *wbd1O111, flicH8, stx1* et/ou *stx2, eae-thêta*, (OI#122).

{	{	{	{
Antigène somatique	Antigène flagellaire	Variant intimine	Facteurs de pathogénicité O Island 122

Les formules antigéniques sont détaillées car l'appartenance à un sérotype ne peut préjuger à elle seule de la pathogénicité des souches.

Il faut souligner le caractère temporaire de cette définition. Celle-ci devra être révisée en fonction des nouvelles observations cliniques, des résultats d'investigations épidémiologiques, en fonction des résultats des projets de recherche et du développement de méthodes fines.

D. EPIDEMIOLOGIE

Selon les pays, les infections dues aux EHEC sont recensées soit directement, soit indirectement par la surveillance des cas de SHU. Chaque pays possède un système qui lui est propre (AFSSA, 2003). Par exemple, en France, la surveillance des infections dues aux EHEC est basée, depuis 1996, sur les données de recensement des SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans et repose sur un réseau hospitalier de néphrologues pédiatres volontaires. Ainsi, les données relatives à l'épidémiologie des infections humaines pourraient dépendre du système de surveillance mis en place dans chaque pays et pourraient donc être biaisées.

L'incidence annuelle du SHU pédiatrique en France est proche de celle observée dans d'autres pays européens et s'échelonne à moins d'un cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans (King *et al.*, 2009). En France, depuis 1996, des cas sporadiques de SHU avec une recrudescence saisonnière pendant la période estivale ont été enregistrés (juin-

septembre) (Haeghebaert *et al.*, 2003). Cette augmentation estivale est aussi observée dans d'autres pays: Angleterre et Pays de Galles (Bolton *et al.*, 2000), Belgique, Pays-Bas et Allemagne (van de Kar *et al.*, 1996), ou encore en Amérique du Nord (Michel *et al.*, 1999).

I. Le réservoir animal

Les études épidémiologiques ont permis d'identifier les réservoirs des souches STEC : bien que des souches STEC potentiellement pathogènes aient été retrouvées chez un grand nombre d'espèces animales (y compris chez l'homme), les ruminants, et en particulier les bovins semblent être les principaux réservoirs des STEC (Gyles, 2007). Chez ces espèces, le portage et l'excrétion de STEC sont asymptomatiques. Des animaux porteurs sains de STEC peuvent donc être à l'origine d'épidémies d'infections sévères chez l'homme.

Des STEC, appartenant au sérotype O157 mais aussi à d'autres sérotypes associés à la maladie chez l'homme tels que O5, O6, O75, O91, O128 ou O146, ont été fréquemment mise en évidence dans les fèces des bovins (Bettelheim, 2007) du monde entier et dans certains pays, comme l'Australie, cette espèce est même considérée comme le principal réservoir de STEC (Gyles, 2007). Les veaux sont les porteurs les plus importants.

Des STEC potentiellement pathogènes pour l'homme ont été retrouvées dans les denrées alimentaires d'origine ovine (viande, mais aussi lait et produits laitiers) (Bettelheim, 2007, Chapman *et al.*, 2000), y compris en France (Vernozy-Rozand *et al.*, 2005b). Certains STEC ont de plus été isolés chez des caprins (Pritchard *et al.*, 2000). Par contre les porcs ne semblent pas constituer un réservoir très important de STEC pathogènes pour l'homme (Caprioli *et al.*, 2005).

De plus, aucune souche de STEC n'a pu être mise en évidence chez les poulets (Heuvelink *et al.*, 1999) bien que des STEC O157 aient été détectées chez les dindes (Heuvelink *et al.*, 1999) ainsi que dans différentes denrées alimentaires issues de volailles (Leclercq et Mahillon, 2003).

Bien que tous les STEC isolés chez l'animal ne soient pas systématiquement de réels EHEC (EHEC=isolés de cas humains), les ruminants semblent constituer des réservoirs importants de STEC et pourraient jouer un rôle non négligeable dans la dissémination des souches dans l'environnement (Howie *et al.*, 2003).

II. Les modes de transmission

Les études épidémiologiques ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination à STEC.

Les principaux modes de transmission des STEC à l'homme sont :

- **la consommation d'aliments contaminés insuffisamment cuits ou crus.** Elle est la principale source de contamination humaine (la moitié des épidémies à

EHEC typiques et atypiques). Les produits carnés d'origine bovine sont à l'origine d'un grand nombre d'infections à *E. coli* O157:H7 (Vernozy-Rozand et Montet, 2001) suite principalement à une cuisson insuffisante (Roberts *et al.*, 1995) ou une ingestion crue. La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mise en cause (Paton *et al.*, 1996). Les STEC sont généralement introduits dans la chaîne alimentaire au moment de l'abatage et lors des étapes de transformation.

Le lait et les produits laitiers pasteurisés ou non ont également été à l'origine d'épidémies (Allerberger *et al.*, 2001). La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. En effet, les conditions de traite et l'environnement dans lesquels elle se réalise jouent un rôle prépondérant dans la contamination du lait par les STEC.

Les fruits et légumes crus (salade, radis, épinards, oignons, etc) peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol.

La consommation de viande de bœuf hachée crue contaminée de manière croisée par une mauvaise hygiène des mains du personnel a aussi été décrite (Nataro et Kaper, 1998).

- **la transmission de personne à personne.** Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire (Stephan et Untermann, 1999). La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. Cette transmission est d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (Sugiyama *et al.*, 2005), les centres de soins journaliers (Reida *et al.*, 1994) et dans les centres psychiatriques (Pavia *et al.*, 1990). Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles (Ludwig *et al.*, 1998) et dans les hôpitaux (Bolduc *et al.*, 2004). La durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors de colites hémorragiques et de 31 jours lors de SHU (Karch *et al.*, 1995). Des épisodes de transmission interhumaine ont été observés durant la dernière épidémie allemande incriminant des graines germées de Fenugrec contaminées par *E. coli* O104:H4 (Hauri *et al.*, 2011).
- **l'ingestion d'eau contaminée.** Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. Entre 1971 et 2000, des souches d'*E. coli* pathogènes étaient retrouvées dans 6% des épidémies dues à l'ingestion d'eau de boisson contaminée au USA (Craun *et al.*, 2005). En Angleterre, 7 personnes ont été malades suite à l'ingestion accidentelle d'eau de baignade contaminée par *E. coli* O157 (Ihekweazu *et al.*, 2006). Enfin, une épidémie à *E. coli* O157:H7 a fait plus de 2 300 malades au Canada en mai 2000 suite à la consommation d'eau de boisson (Hrudey *et al.*, 2003). Des souches d'*E. coli* O157:H7 ont été isolées dans des eaux de surface ou des eaux usées au Canada (Jokinen *et al.*, 2010). Plusieurs épidémies liées à l'ingestion de végétaux contaminés par des EHEC (typiques et

atypiques) ont été recensées suite à l'irrigation des cultures par des eaux contaminées, à l'épandage de fumier ou de lisier d'animaux contaminés (Ackers *et al.*, 1998). Certaines études suggèrent même que l'eau d'irrigation puisse contaminer les végétaux par leurs racines (Wachtel *et al.*, 2002).

- **le contact avec des animaux** (notamment les bovins). La transmission d'*E. coli* O157:H7 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors de cas sporadiques (O'Brien *et al.*, 2001) mais aussi lors d'épidémies (Crump *et al.*, 2002). Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *E. coli* O157 est plus élevé dans les populations vivant en contact permanent avec les animaux (Evans *et al.*, 2000). Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à *E. coli* O157:H7, notamment durant des événements en plein air, tels que des festivals (Crampin *et al.*, 1999) ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (Ogden *et al.*, 2002). En Ecosse, des échantillons de sol souillé ont été impliqués dans 11% des infections environnementales à *E. coli* O157:H7 (Strachan *et al.*, 2006).

III. Principales épidémies

Pendant les années 80, la plupart des infections consécutives aux EHEC étaient essentiellement associées à la consommation de denrées d'origine animale. L'épidémiologie des infections à EHEC a considérablement changé depuis ces dix dernières années, et l'ingestion de végétaux ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement sont de plus en plus impliqués en clinique humaine. Ceci s'explique sans doute par :

- une recherche plus exhaustive des sources potentielles de contamination lors d'une épidémie à EHEC,
- une multiplication des élevages intensifs bovins,
- et par une modification du régime alimentaire chez l'homme, avec une consommation accrue de fruit, légumes et aliments crus dans les pays développés.

La première épidémie recensée a eu lieu aux USA en 1982 : 46 personnes ont été malades suite à la consommation de viande hachée de bœuf contaminée par *E. coli* O157:H7 (Riley *et al.*, 1983). La plus importante épidémie mondiale a été liée à la présence du sérotype O157:H7 dans des germes de radis blanc ayant été consommés au Japon et ayant conduit à plus de 9 000 malades et 12 décès (Michino *et al.*, 1999).

En Ecosse, entre 1994 et 2003, sur 35 épidémies à *E. coli* O157:H7 identifiées, 19 (54%) étaient associées à des sources environnementales de contamination (Strachan *et al.*, 2006). De même aux Etats-Unis, 12% des épidémies survenues entre 1982 et 2002 étaient liées à l'eau ou à un contact avec un animal porteur. Soulignons que 21% des épidémies investiguées présentaient une source de contamination inconnue (Rangel *et al.*, 2005).

La plupart des ces épidémies ont été liées à des souches classiques de EHEC, et particulièrement au sérotype O157:H7, portant les gènes *eae* et *stx*.

La dernière épidémie due à une souche d'*E. coli* O104:H4 se distingue particulièrement. En effet, les souches isolées suite à l'épidémie Française de Juin 2011 sont similaires (profil PFGE identiques) à celles identifiées et caractérisées dans le cadre de l'épidémie observée en mai-juin en Allemagne de cette même année. Cette homologie des isolats combinée au caractère rare de la souche à l'origine de ces épidémies, laisse supposer que ces deux événements sont liés à une source commune. L'enquête épidémiologique a identifié des germes de Fénugrec comme étant la source la plus probable de contamination (ANSES, 2011).

Cette souche épidémique appartient au sérotype O104:H4, et possède le gène *stx2* qui code la shiga-toxine de type 2. Elle ne possède pas les gènes *eae* (codant l'intimine), *hlyA* (codant l'hémolysine A) et *astA* (codant la toxine EAST1) mais héberge le gène *aggR*, codant un facteur de régulation de l'expression de fimbriae responsables d'une très forte adhérence à la muqueuse intestinale. Cette souche épidémique n'est pas un EHEC sur le plan génétique mais une souche d'EAEC qui a acquis un gène *stx2*. Par ailleurs, cette souche présente un profil de multi-résistance aux antibiotiques (résistance aux molécules suivantes : ampicilline, céfotaxime, ceftazidime, streptomycine, sulfaméthoxazole, triméthoprime, cotrimoxazole, tétracycline et acide nalidixique) (ANSES, 2011).

J'ai choisi de faire un focus particulier sur les principales épidémies dues aux STEC dans les produits laitiers et les fromages car cette matrice alimentaire est soumise aux différentes études du mémoire expérimental présenté ci-après.

Le lait cru peut être une source importante d'infection par des pathogènes d'origine alimentaire. De nombreuses intoxications alimentaires associées à la consommation directe de lait cru ou de lait insuffisamment traité ou encore d'une re-contamination du lait après traitement thermique ont été recensées (Baylis, 2009). La présence d'agents pathogènes dans le lait résulte donc de la contamination par des matières fécales pendant la traite. Une bonne hygiène au moment de la traite, notamment au niveau des matières fécales des mamelles et le fait d'assurer un environnement propre, est donc importante pour réduire la prévalence de ces agents pathogènes dans le lait cru. Des travaux montrent l'envahissement des cultures épithéliales mammaires par *E. coli* O157:H7 ce qui suggère également la possibilité de contamination du lait avant la traite (Matthews *et al.*, 1997). Cependant le lait cru reste largement utilisé dans les fabrications fromagères en raison de la flore annexe à l'origine des propriétés organoleptiques qu'il possède et pour la saveur qu'il confère au produit final.

A ce jour, il n'existe pas de critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires concernant la détection des STEC (JO L332 du 7.12.2007). Cependant, le "paquet hygiène" (règlement Européen) impose aux producteurs de mettre sur le marché des produits alimentaires indemnes de toute contamination. Par ailleurs, l'ANSES a émis un avis définissant génétiquement les STEC considérées comme hautement pathogènes pour l'homme (Saisine n°2010-SA-0031 liée à la saisine n°2008-SA-0122).

Point à retenir

Depuis 2008, l'AFSSA (actuelle ANSES) a émis un avis définissant les souches STEC pathogènes des souches dites « EHEC typiques majeurs » selon leurs critères génétiques.

L'ingestion de STEC (aliments contaminés ou ingestion accidentelle) peut se traduire par une diarrhée évoluant dans 90 % des cas en diarrhée sanglante, se compliquant, chez 10 % des sujets, d'un SHU.

Les personnes les plus sensibles sont les enfants de moins de 3 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans.

Les animaux, tout comme l'homme, peuvent être porteurs sains de STEC.

L'élevage d'animaux de boucherie, en particulier des bovins, semble être la principale source de contamination de l'environnement. Dans le monde, les principaux aliments mis en cause lors d'épidémies à STEC sont : la viande hachée de bœuf insuffisamment cuites, les produits laitiers non pasteurisés, les végétaux crus et l'eau de distribution.

Le lait et les produits laitiers peuvent être un vecteur de contamination par les STEC. Ceux-ci sont impliqués dans de nombreuses épidémies alimentaires, il est donc indispensable de pouvoir les détecter rapidement dans les aliments.

E. DETECTION DANS LES ALIMENTS

L'actualité place régulièrement au-devant de la scène des problèmes liés à la sécurité alimentaire. Dans le but de minimiser les risques d'infection des consommateurs, de nombreux contrôles microbiologiques sont imposés tout au long de la chaîne de fabrication des denrées alimentaires.

En ce qui concerne la détection des STEC, la seule norme existante est spécifique à la détection d'*E. coli* O157:H7. En effet, la norme NF EN ISO 16654 :2001 (« Méthode horizontale pour la recherche des *E. coli* O157 ») détaille une méthode destinée à rechercher *Escherichia coli* appartenant au séro groupe O157 dans les aliments. Il existe par ailleurs un grand nombre de méthodes alternatives validées AFNOR et commercialisées permettant la détection de ce séro groupe. Pour la détection des souches non-O157, un projet de spécification technique ISO/CEN a été voté à l'ISO (ISO TS 13136).

De manière générale, en microbiologie alimentaire, le protocole classique de recherche des STEC et plus spécifiquement d'*E. coli* O157 dans les aliments suit toujours le même schéma : Prise d'essai, enrichissement sélectif ou non, Détection et Confirmation

Tout d'abord, un échantillonnage ou prise d'essai (en général de 25g) est réalisé. Sa nature et sa quantité est fonction de l'aliment à analyser. Ensuite, l'étape d'enrichissement (sélectif ou non), est réalisée dans un bouillon nutritif qui permet à la bactérie recherchée de se multiplier avant l'étape de détection qui peut être aussi bien immunologique que génétique. Cette étape de détection permet l'obtention d'un résultat

positif (une suspicion) ou négatif (arrêt des analyses). En cas de résultat positif, la présence de la bactérie cible est suspectée et une étape supplémentaire s'ajoute donc au protocole : l'étape de confirmation. Cette dernière permet de confirmer la présence de la bactérie suspectée dans l'aliment en déterminant son genre, son espèce et les facteurs de virulence qu'elle porte.

La détection des STEC reposent sur :

- Des **méthodes immunologiques** informant sur la présence des antigènes somatiques, notamment O157.
- Des **méthodes phénotypiques** avec l'utilisation des milieux de cultures gélosés basés sur les caractéristiques biochimiques
- Des **méthodes génétiques** spécifiques reposant sur l'amplification de séquences cibles d'acides nucléiques (Bax, Genedisc cyclor et IQ Check commercialisés respectivement par Oxoid, Genesystems et Biorad). Plusieurs méthodes de PCR en temps réel ont fait l'objet d'une validation, mais elles ne seront pas listées ici.

Je développerais uniquement cette dernière méthode puisqu'elle a fait l'objet d'une partie du mémoire expérimental.

I. Méthodes génétiques

Les tests génétiques sont basés sur l'amplification de séquences cibles de l'ADN spécifiques de l'agent recherché. Avant l'amplification, une étape de préparation (extraction) des acides nucléiques est indispensable.

La préparation des acides nucléiques nécessite plusieurs étapes successives :

- La lyse des micro-organismes
- L'extraction des acides nucléiques
- La purification des acides nucléiques
- La concentration des acides nucléiques

Toutes ces étapes ne sont pas indispensables et parfois, le protocole se réduit à une seule étape, la lyse bactérienne qu'elle soit physique, chimique ou les deux. Rappelons que *E. coli* est une bactérie à Gram négatif, nécessitant des méthodes de lyses moins rigoureuses que celles destinées à lyser les bactéries à Gram positif.

Cette extraction d'acides nucléiques peut aussi se faire de manière automatisée.

1. Principe de la PCR en temps réel

La « Polymérase Chain Reaction » ou PCR est une technique de réplication ciblée *in vitro*. Elle permet grâce à une enzyme spécifique d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe (gras, protéine, paroi bactérienne, ADN, ARN...) d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie (Poitras et Houde, 2002).

L'amplification d'ADN a lieu grâce à une succession de cycles comprenant trois étapes :

- **La phase de dénaturation.** Lors de cette étape très courte (environ une minute), une déshybridation d'une séquence cible d'ADN double brin est réalisée entraînant la formation de deux ADN simple brin.
- **La phase d'hybridation des amorces.** Cette étape permet aux amorces ou « primer » en anglais de se fixer des deux côtés du fragment d'ADN simple brin spécifique à amplifier. La température de cette étape est déterminée en fonction de la température de fusion (T_m) des amorces.
- **La phase d'élongation.** Lors de cette étape, l'amplification de la séquence d'ADN cible est effectuée grâce à une enzyme, la Taq-polymérase. A la fin de ce premier cycle de l'ADN double brin est obtenu et un nouveau cycle peut alors recommencer.

Il existe plusieurs techniques pour la détection des amplicons lors d'une PCR en temps réel : le SYBERGreen¹⁰, les sondes d'hydrolyse (décrite ci-dessous), et les sondes d'hybridation, comme les molécules Beacons ou Scorpions¹¹.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé les sondes d'hydrolyse (Taqman et Taqman MGB). Les sondes Taqman sont spécifiques de la partie du génome à amplifier (contrairement aux agents intercalants comme le SYBER-Green), et sont composées d'un reporter (émetteur) qui émet de la fluorescence et d'un quencher (extincteur) qui l'absorbe. Lorsque la sonde est intacte (reporter et quencher à coté), le quencher absorbe la fluorescence émise par le reporter. Dans ce cas, il n'y a pas d'émission de fluorescence. Au cours de l'élongation du brin d'ADN, la Taq-polymérase catalyse la sonde. Le reporter est alors séparé du quencher et émet de la fluorescence.

Récemment de nouvelles sondes ont été mises au point. Elles utilisent la technologie Taqman couplée à la technologie MGB (Minor Groove Binding) (Kutyavin *et al.*, 2000). Ces sondes sont appelées Taqman MGB. Cette technologie permet d'obtenir des sondes plus courtes tout en augmentant leur spécificité. La présence du MGB permettant également de stabiliser les cinq à six dernières bases de la sonde (extrémité 3').

Il existe deux types d'automates pour réaliser des PCR en temps réel : les automates « fermés » et les automates « ouverts ». Les automates ouverts sont préférentiellement utilisés dans les laboratoires de recherche. Ces automates contiennent des logiciels qui permettent de créer des programmes de PCR spécifiques pour que les laboratoires emploient leurs propres amorces. L'interprétation des résultats est réalisée par le manipulateur.

Les automates fermés ne laissent pas le choix de l'utilisation des amorces et sondes au manipulateur, et généralement le logiciel interprète lui-même les résultats.

II. Etape de confirmation

L'ensemble des tests cités précédemment permet seulement de donner un résultat présomptif de la présence de STEC dans la prise d'essai analysée. Après un résultat

¹⁰ Agent fluorescent intercalant de l'ADN.

¹¹ Emission de fluorescence lors de l'hybridation de la sonde (forme épingle à cheveux), car éloignement du Quencher et du Reporter.

positif que ce soit avec une méthode immunologique ou encore génétique, il est toujours obligatoire de réaliser une confirmation de ce résultat. Cette étape consiste à isoler et identifier la bactérie cible recherchée (séro groupe, flagelles, présence des facteurs de virulence...).

Pour les souches *E. coli* O157, il existe deux méthodes d'isolement validées: l'IMS et le VIDAS ICE. Pour les STEC non-O157, seule l'IMS existe.

L'IMS pour Immuno Séparation Magnétique permet de rechercher et d'isoler les *E. coli* appartenant aux 5 sérogroupes (reconnus pathogènes par l'AFSSA) présentes dans le bouillon d'enrichissement.

F. CONNAISSANCES RELATIVES AUX FROMAGES

Les fromages au lait cru sont des produits à forte valeur ajoutée, ils ont ainsi une importance économique non négligeable : leur production représente environ 16% de la production nationale de fromages affinés.

En 2007, les volumes de fromages AOC¹² commercialisés s'élèvent à 193 631 tonnes. Certaines appellations sont exclusivement au lait cru, d'autres exclusivement au lait pasteurisé, d'autres enfin peuvent choisir d'utiliser du lait cru ou du lait pasteurisé.

Quarante quatre fromages bénéficient de l'AOC dont 29 au lait de vache, 12 au lait de chèvre, 2 au lait de brebis, 1 au lactosérum (Brocciu¹³). Ces fromages bénéficient tous d'une AOP¹⁴, sauf le gruyère dont le dossier est en cours de validation par l'Europe (Source : CNIEL / ODG / CNAOL sept 08). Outre ces fromages labélisés, rappelons qu'un grand nombre de fromages au lait cru existent en France et qu'ils représentent un important tonnage.

La production fromagère traditionnelle est donc un élément important du tissu économique et social des régions : elle s'inscrit dans une dynamique de développement rural et d'aménagement du territoire, elle évite la désertification de certaines zones en fournissant une source de revenus non négligeable aux agriculteurs

Les données concernant la connaissance relative des fromages sont essentiellement tirées du livre : *Initiation à la technologie fromagère, de Brulé, Mahaut et Jeantet de 2000.*

I. Définition

L'article 1^{er} du chapitre 1 du décret no 2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères dit que la dénomination « fromage » est réservée aux produits fermentés ou non, affinés ou non, obtenus à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse,

¹² AOC : L'Appellation d'Origine Contrôlée, est la dénomination d'un pays, d'une région ou d'une localité servant à désigner un produit qui en est originaire et dont la qualité et les caractères sont dus exclusivement ou essentiellement au milieu géographique.

¹³ Fromage corse au lait de brebis

¹⁴ AOP : L'Appellation d'Origine Protégée est l'équivalent de notre AOC national, mais au niveau de l'Europe

babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse ».

La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23 grammes pour 100 grammes de fromage.

II. Le fromage dans l'alimentation -Consommation

En 2010, les Français étaient les deuxièmes consommateurs de fromages en Europe. La consommation annuelle française de fromage en 2010, y compris les frais (fromages blancs, petits suisses ou fromages salés) s'élève à 25,6 kg par habitant. La consommation de fromage (tous laits) en France depuis 10 ans a peu évolué, puisqu'elle est passée de 24.1 kg (2000) à 25.6kg (2010) par personne et par an. La production de fromages (tous laits et toutes catégories à la ferme et en laiterie) atteignait en France en 2008 (CNIEL, 2010) 1.8 millions de tonnes, soit 25% de la production fromagère de l'Union européenne. En 2008 la France est le 2^{ème} producteur de lait de l'Union Européenne derrière l'Allemagne.

Ce sont surtout les fromages frais et les pâtes molles qui sont les plus consommés : ils représentent plus de 60% de la consommation française.

La teneur en protéines varie de 10 à 30% dans les fromages, c'est donc un aliment protéique par excellence. Les fromages sont les aliments les plus riches en protéines, notamment les pâtes pressées dont la teneur en protéines (30%), dépasse celle de la viande (20%).

III. Généralités sur la technologie fromagère

Les fromages constituent une forme ancestrale de conservation des protéines, de la matière grasse ainsi que d'une partie du calcium et du phosphore, dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe.

Il existe une très grande variété de fromages selon la nature du lait et des technologies mises en œuvre.

Le fromage résulte de la concentration des éléments majeurs du lait (protéines, matière grasse) sous l'action de l'acidification et/ou d'une enzyme (le plus souvent, la présure extraite de la caillette des jeunes bovins avant sevrage).

Selon Brûlé *et al.* (1997), la transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales :

- la coagulation du lait qui correspond à des modifications physicochimiques des micelles de caséines sous l'action d'enzymes protéolytiques et (ou) de l'acide lactique, entraînant la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel,
- l'égouttage du caillé qui assure une déshydratation partielle du gel, obtenu par séparation d'une partie du lactosérum,
- l'affinage (qui peut-être très court) qui se caractérise par des transformations biochimiques des constituants du caillé, essentiellement sous l'action d'enzymes microbiennes.

Dans la plupart des fabrications, entre l'égouttage et l'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par action sur l'activité de l'eau.

En fabrication fromagère française, on peut considérer qu'il existe 7 grandes catégories de technologie :

- Les fromages frais ou pâtes fraîches ;
- Les pâtes molles à croûte fleurie et à croûte lavée ;
- Les pâtes persillées
- Les pâtes pressées non cuites et cuites ;
- Les pâtes dures ;
- Les pâtes filées
- Les fromages fondus.

Tous les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagère, car ils présentent des caractéristiques différentes, telle que la richesse et la composition en caséine, les équilibres salins, la teneur en lactose, la qualité hygiénique et l'histoire thermique.

La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre de 30 à 300nm, formée par l'association des différentes caséines et des composants salins dont les principaux sont le calcium et le phosphate.

Les trois grandes étapes de la fabrication fromagère sont développées ci-dessous.

1. La coagulation

Les micelles de caséines sont des colloïdes hydrophiles qui doivent leur stabilité à deux facteurs : les caractéristiques physiques de la surface et le degré d'hydratation. Toute modification de la micelle et/ou de l'environnement aura des répercussions sur sa stabilité et pourra entraîner le phénomène de coagulation comme l'acidification et/ou l'action protéolytique de certaines enzymes, ou les traitements thermiques. Cette déstabilisation du système colloïdal est la base d'un ensemble de technologies particulièrement utilisées en fromagerie.

On distingue deux types de coagulation :

- **La coagulation acide** : elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi=4.6) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de CO₂ ou addition de GDL¹⁵ (glucono delta-lactone) ou encore par ajout de protéines sériques à pH acide.
- **La coagulation présure** : elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzymes protéolytique. L'enzyme la plus couramment utilisée est la présure

¹⁵ Acide organique naturel permettant la coagulation du lait

2. L'égouttage du coagulum

Cette phase consiste en l'élimination plus ou moins grande du lactosérum emprisonné dans les mailles du gel formé par voie acide et/ou enzymatique. Cette élimination du lactosérum est plus ou moins rapide selon la nature et l'histoire du coagulum.

C'est un phénomène complexe et encore mal connu. Il est admis que l'égouttage dans sa globalité résulte d'un processus actif intégrant la synérèse¹⁶ et l'aptitude du gel à laisser le lactosérum s'écouler.

La synérèse est commandée par la contraction du gel ; elle est très marquée dans le cas des gels présure. Cependant, dans le cas des gels acides qui sont plus perméables, l'égouttage est spontané.

L'égouttage commence dans les cuves de coagulation, se poursuit dans les moules, puis dans les hâloirs¹⁷.

Le coagulum est constitué d'un réseau de caséines bien organisé. Lors de la réticulation, il se forme des liaisons nouvelles, calciques, électrostatiques et hydrophobes, conduisant à une rétraction du gel qui se manifeste par une expulsion du lactosérum contenu dans les mailles du réseau protéique. Quand aucune force extérieure n'est exercée, le gel garde tout au long de la synérèse sa forme initiale.

L'égouttage dépend donc en partie du gel obtenu. Pour l'égouttage du coagulum acide, le gel présente une forte perméabilité qui conduit à un simple écoulement statique du sérum qui reste toutefois faible en raison du manque de contraction.

Pour l'égouttage du coagulum présure, il est nécessaire pour rompre cet état de faire appel à un certain nombre de traitements mécaniques, physicochimiques et thermiques (tranchage, brassage, chauffage, pressage, salage et ressuyage). Ces traitements sont d'autant plus intenses que l'extrait sec recherché dans le fromage est élevé.

Les phases d'égouttage et d'acidification ont une place importante sur le mode d'obtention des caillés lactiques et présures, puisqu'elles régulent deux facteurs importants qui sont l'humidité du fromage dégraissé (HFD) et le pH.

Ces facteurs jouent un rôle dans l'orientation de la croissance microbienne et dans le développement des réactions enzymatiques et biochimiques au cours de l'affinage des caillés. Selon le mode d'acidification et d'égouttage des caillés, on distingue 4 grandes classes de fromages :

- Les caillés lactiques qui restent très humides : pâte fraîche
- Les caillés mixtes à dominante lactique : pâte molle
- Les caillés mixtes à dominante présure : pâte pressée non cuite
- Les caillés présures de type de pâte dure et pâte pressée cuite.

¹⁶ Contraction du caillé

¹⁷ Lieu de séchage du fromage

3. L'affinage

L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé. Ce substrat issu de la coagulation et de l'égouttage du lait est constitué de matière protéique, de matière grasse et d'une fraction des composants solubles du lait.

L'affinage est un processus biochimique complexe pour plusieurs raisons :

- ❑ La matrice issue de la coagulation et de l'égouttage du lait présente une très grande hétérogénéité physicochimique

- ❑ Les enzymes intervenant dans l'affinage ont plusieurs origines. Elles peuvent être présentes à l'origine dans le lait (plasmin, lipase), ajoutées au lait (enzymes coagulantes, micro-organismes), ou produites au cours de l'affinage par synthèses microbiennes (bactéries, levures, moisissures).

C'est un écosystème complexe et un bioréacteur imparfait dont les mécanismes ne sont pas toujours bien définis.

Il est dominé par trois grands phénomènes biochimiques :

- ❑ La fermentation du lactose
- ❑ L'hydrolyse de la matière grasse
- ❑ La dégradation des protéines.

Ces transformations confèrent à la pâte fromagère des caractères nouveaux. Elles la modifient dans son aspect, dans sa consistance, dans sa composition. Simultanément, saveur, arôme et texture se développent.

Les paramètres susceptibles d'agir sur le développement des micro-organismes, la production d'enzymes et les activités enzymatiques, jouent un rôle déterminant au cours de l'affinage.

Quatre paramètres sont particulièrement influant :

- **La température.** C'est le facteur majeur de développement des micro-organismes, et de l'activité enzymatique au cours de l'affinage. Les températures optimales de développement microbien varient selon les espèces : 20-25°C pour les levures, moisissures et bactéries de surface, 30-35°C pour les bactéries lactiques mésophiles et 40-45°C pour les bactéries lactiques thermophiles.

Les activités enzymatiques sont maximales dans l'intervalle 35°C (lipases) à 45°C (protéases).

A basse température, l'activité enzymatique peut-être encore appréciable, notamment la lipase du *Penicillium camemberti* qui conserve 50% de son activité maximale à 1°C. Les températures d'affinage des fromages sont très inférieures à ces maxima. Elles se situent entre 5 et 20 °C. En dehors du cas des pâtes persillées, les températures d'affinage sont d'autant plus basses que la pâte du fromage est humide.

- **le pH.** D'une manière générale, les levures et les moisissures sont capables de se développer en milieu acide à pH 4.5 et au-dessous. Les bactéries préfèrent les milieux neutres, et peu d'espèces en dehors des bactéries lactiques sont aptes à se multiplier à pH inférieur à 5.0. L'activité enzymatique des micro-organismes est très sensible aux variations de pH.

- **l'activité de l'eau** (a_w) est un paramètre important de sélection microbienne et de l'action des enzymes. Certains micro-organismes sont aptes à se développer dans des milieux à faible a_w : c'est le cas des microcoques, des corynébactéries, et la plupart des levures, des *Penicillium* notamment. D'autres ne supportent pas des pressions osmotiques élevées comme les bactéries coliformes et *Geotrichum candidum*. Dans les fromages, l' a_w est réglée essentiellement par les teneurs en sel et en eau. Au cours de l'affinage, l' a_w diminue. Les pâtes humides s'affinent donc plus vite que les pâtes fortement égouttées.
- **les caractéristiques de l'atmosphère**. La présence d'oxygène joue un rôle important dans la croissance des micro-organismes. Les moisissures, les levures, les Micrococcaceae, les bactéries corynéformes sont aérobies strictes ; les bactéries propioniques et les *Clostridia* sont anaérobies strictes et les bactéries lactiques (notamment les lactobacilles) sont microaérophiles et se développent dans un milieu à teneur en oxygène limitée. La composition de l'atmosphère peut jouer un rôle dans l'affinage des fromages (notamment la présence d'ammoniac ou de CO₂ et l'humidité relative).

Le développement de la saveur et de l'arôme des fromages résultent d'un certain nombre de transformations choisies et contrôlées qui se sont produites au cours de l'affinage.

IV. La qualité hygiénique

En production fromagère, les analyses chimiques et microbiologiques peuvent porter sur toutes la chaîne de production ; depuis les matières premières et les auxiliaires de fabrications (lait et dérivés sous toutes ses formes, enzymes coagulants, ferments, saumure), jusqu'aux produits finaux et intermédiaires (fromages, sérums), sans oublier les contrôles de l'environnement (matériaux, locaux, atmosphère) et les déchets.

Les contrôles chimiques et microbiologiques réalisés sur les fromages ont des objectifs technologiques (contrôle des opérations de fabrication) et réglementaires ou commerciaux afin de s'assurer que les fromages fabriqués répondent aux normes de composition et d'hygiène imposées par la législation ou l'acheteur.

1. Les contrôles chimiques

Les contrôles de fabrication se limitent généralement à un petit nombre de mesures de composition physicochimique, comme le pH, l'extrait sec, la matière grasse et la teneur en sel.

a. Le dosage de la matière sèche (extrait sec)

La norme FIL 4A : 1982, à laquelle correspond la norme AFNOR V04-282 est reconnue comme méthode de référence. Elle consiste à déterminer la masse d'un échantillon de fromage après élimination de l'eau par évaporation en présence de sable dans une étuve à 102°C.

b. Le dosage de la matière grasse

La méthode gravimétrique SBR correspondant à la norme FIL-5B-1986 ou AFNOR V04-286 est utilisée comme méthode de référence pour les fromages.

Le taux de MG est indiqué sur le poids total et non plus sur l'extrait sec. L'objectif est de fournir une information plus réaliste directement compréhensible par le consommateur.

Toutefois, en cas de problème de fabrication ou de qualité des fromages, d'autres contrôles peuvent être entrepris, portant soit sur des critères biochimiques plus complexes comme le dosage des acides gras volatils ou la mesure de la protéolyse (que l'on ne traitera pas ici), soit sur des flores d'affinage ou des germes de contamination.

2. Les contrôle de sécurité microbiologiques

L'arrêté du 30 mars 1994 fixe les critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché.

La directive CEE N°92-46 arrête les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait.

Avant 2005, aucune épidémie de grande ampleur n'avait été rapportée en France. Cependant en novembre de cette année, une épidémie incriminant du camembert au lait cru contaminé par *E. coli* O26:H11 est survenue. En effet, le 25 novembre 2005, le service de réanimation pédiatrique du centre hospitalier universitaire de Caen a signalé à l'institut de veille sanitaire (InVS) la survenue en une semaine de 3 cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU) pédiatrique. Le même service signalait 3 autres cas entre le 29 novembre et le 1^{er} décembre. Ces 6 enfants, âgés de 10 mois à 2 ans avaient présenté une diarrhée glairo-sanglante entre le 10 et 28 novembre, compliquée par un SHU entre le 17 novembre et 1^{er} décembre. Tous résidaient en Normandie. L'examen des selles des 6 enfants avait permis d'isoler 2 souches d'*E. coli* O26:H11 et la présence de Shiga-toxines par PCR dans les selles de tous les enfants (Espié *et al.*, 2006).

Suite à cette épidémie, un plan de surveillance a été mené en 2009 concernant la contamination par les STEC des fromages au lait cru (DGAI, 2010). Les analyses ont montré que :

- La prévalence apparente de contamination des fromages au lait cru par des STEC pathogènes est d'environ 1%, tous sérotypes confondus.
- Parmi les 17 souches identifiées, 1 seule appartient au sérotype O157:H7, qui est le sérotype majeur impliqué dans les cas humains (Karmali *et al.*, 2003a).
- Les 16 autres souches identifiées appartiennent au sérotype O26:H11 (65% des souches isolées), suivi de O103:H2 (23%) et de O145:H28 (6%).
- Le sérotype O26:H11 est très majoritaire dans les fromages au lait de vache (10 des 12 souches isolées), les quatre sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2 et O145:H28 sont retrouvés dans les fromages au lait de chèvre, et le seul sérotype O103:H2 a été identifié dans les fromages de brebis.

- Aucune conclusion en termes d'impact sur la santé publique n'a pu être donnée à ce stade.
- Etant donné l'origine supposée des contaminations, l'accent doit être porté sur la mise en place de mesures de maîtrise en amont de la filière, au stade de l'élevage et de la production du lait.

Les données obtenues dans ce plan de surveillance concernant la prévalence des STEC dans les fromages au lait cru Français associé au fait qu'une épidémie impliquant du camembert au lait cru a été décrite en 2005 a engendré une inquiétude de la filière. En effet, de nouvelles épidémies impliquant des fromages au lait cru pourraient impacter lourdement l'économie de cette filière « typiquement Française ».

Mais les études relatives aux devenir des STEC ainsi que leur détection dans les fromages sont peu nombreuses. Le mémoire expérimental tentera d'apporter des connaissances supplémentaires sur ces deux points.

Références bibliographiques

Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. (2008). Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* *127*, 200–208.

Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., et al. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.* *177*, 1588–1593.

AFSSA (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia Coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).

Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, A., Dierich, M.P., Friedrich, A.W., and Karch, H. (2001). *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill.* *6*, 147–151.

Amirlak, I., and Amirlak, B. (2006). Haemolytic uraemic syndrome: an overview. *Nephrology (Carlton)* *11*, 213–218.

ANSES (2011). AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'état des connaissances scientifiques et aux informations disponibles permettant de formuler des recommandations, suite à la survenue de plusieurs cas de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) observés en France en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées. Maisons Alfort, France: Anses.

Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S., and Makino, S. (2008). Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res. Microbiol.* *159*, 709–717.

Auvray, F., Lecureuil, C., Taché, J., Leclerc, V., Deperrois, V., and Lombard, B. (2007). Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia*

coli in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.* *45*, 646–651.

Baylis, C.L. (2009). Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology* *62*, 293–307.

Bettelheim, K.A. (2005). Reliability of O157:H7 ID agar (O157 H7 ID-F) for the detection and isolation of verocytotoxigenic strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157. *J. Appl. Microbiol.* *99*, 408–410.

Bettelheim, K.A. (2007). The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* *33*, 67–87.

Bettelheim, K.A., Evangelidis, H., Pearce, J.L., Sowers, E., and Strockbine, N.A. (1993). Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J. Clin. Microbiol.* *31*, 760–761.

Beutin, L., Steinrück, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G., and Appel, B. (2007). Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 630–639.

Boerlin, P. (1999). Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Life Sci.* *56*, 735–741.

Bolduc, D., Srour, L.F., Sweet, L., Neatby, A., Galanis, E., Isaacs, S., and Lim, G. (2004). Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002. *Can. Commun. Dis. Rep.* *30*, 81–88.

Bolton, F.J., Chapman, P., Farthing, M., Mani-Saada, J., O'Brien, S., Painter, M.J., Salmon, R.L., Sebastian, M., Smith, H.R., Trevena, B. (2000). Guidelines for the control of infection with Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC). *Communicable Disease and Public Health* *3*, 14–23.

Bosch, X. (2000). Spain's *E. coli* outbreak highlights mistakes. *Lancet* *356*, 1665.

Brett, K.N., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker, M.J., and Djordjevic, S.P. (2003). Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb subtypes. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 2716–2722.

Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Flodgaard, L.R., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Givskov, M., and Gram, L. (2004). Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 4293–4302.

Calderwood, S., Akeson, D., Keusch, G., Barrett, T., and Griffin, P. (1996). Proposed New nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 118–119.

Caplice, E., and Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* *50*, 131–149.

Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., and Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* *36*, 289–311.

Casenave, P.-A.-D Grimont, and P. Mariani (1993). Eclosion de syndrome hémolytique et urémique (SHU) dans une commune rurale du Cher. *BEH* *48*,.

CDC (2010). Investigation Update: Multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility. Center for Disease Control and Prevention.

Cebula, T.A., Payne, W.L., and Feng, P. (1995). Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* *33*, 248–250.

Chapman, P.A., Siddons, C.A., Cerdan Malo, A.T., and Harkin, M.A. (2000). A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiol. Infect.* *124*, 207–213.

Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Kourkoutas, Y., and Nychas, G.-J.E. (2010). Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 2018–2022.

CNIEL (1999). *L'économie laitière en chiffres* (Paris).

CNIEL (2010). *L'économie laitière en chiffres*. (Paris).

Coombes, B.K., Wickham, M.E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B.B., and Karmali, M.A. (2008). Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 2153–2160.

Coton, M., Delbés-Paus, C., Irlinger, F., Desmasures, N., Le Fleche, A., Stahl, V., Montel, M.-C., and Coton, E. (2012). Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol.* *29*, 88–98.

Crampin, M., Willshaw, G., Hancock, R., Djuretic, T., Elstob, C., Rouse, A., Cheasty, T., and Stuart, J. (1999). Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 286–288.

Craun, G.F., Calderon, R.L., and Craun, M.F. (2005). Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res* *15*, 243–262.

Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.

Crump, J.A., Sulka, A.C., Langer, A.J., Schaben, C., Crielly, A.S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D.M. (2002). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N. Engl. J. Med.* 347, 555–560.

D’Amico, D.J., Druart, M.J., and Donnelly, C.W. (2010). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *J. Food Prot.* 73, 2217–2224.

D’Amico, D.J., Groves, E., and Donnelly, C.W. (2008). Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J. Food Prot.* 71, 1580–1589.

Decludt, B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B., and Loirat, C. (2000). Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. *The Société de Néphrologie Pédiatrique. Epidemiol. Infect.* 124, 215–220.

Delbès, C., Ali-Mandjee, L., and Montel, M.-C. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1882–1891.

Delbès-Paus, C., Pochet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Bord, C., Lebecque, A., Coton, M., Desmasures, N., Coton, E., Irlinger, F. (2012). Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiol.* 30, 74–82.

DGAI. (2010). Bilan 2009 des plans de surveillance et de contrôle mis en œuvre par la DGAI.

Duffy, G., Whiting, R., and Sheridan, J. (1999). The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 16, 299–307.

Dunière, L. (2012). Stratégies de limitation du portage sain des STEC par les bovins. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en alimentation animale. Thèse de doctorat de l’université d’Auvergne, 318p.

EFSA (2011). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *EFSA Journal* 9, 2390.

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., and Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow’s milk. *Food Microbiol.* 26, 228–231.

Espié, E., Grimont, F., Vaillant, V., Montet, M.P., Carle, I., Bavai, C., de Valk, H., and Vernozy-Rozand, C. (2006a). O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clin. Microbiol. Infect.* *12*, 992–998.

Espié, E., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Pihier, N., Vaillant, V., Francart, S., Capek, I., and De Valk, H. (2006b). Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurized cows cheese, France, 2005. In Abstract of the 6th International Symposium on Shigatoxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. ed. Sofronidis, J. Melbourne, Australia, 2006. Oct. 30–Nov. 1. West Leederville, WA: Cambridge Publ.

Espié, E., Vaillant, V., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Martin-Schaller, R., De Valk, H., and Vernozy-Rozand, C. (2006c). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol. Infect.* *134*, 143–146.

Evans, J., Chalmers, R.M., Chart, H., Salmon, R.L., Kench, S.M., Coleman, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Softley, P., Sillis, M. (2000). Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. *Eur. J. Epidemiol.* *16*, 885–889.

Feng, P., Lampel, K.A., Karch, H., and Whittam, T.S. (1998). Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* *177*, 1750–1753.

Fernandez, G.C., Lopez, M.F., Gomez, S.A., Ramos, M.V., Bentancor, L.V., Fernandez-Brando, R.J., Landoni, V.I., Dran, G.I., Meiss, R., Isturiz, M.A. (2006). Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clin. Exp. Immunol.* *146*, 76–84.

Fortin, N.Y., Mulchandani, A., and Chen, W. (2001). Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Biochem.* *289*, 281–288.

Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A. (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* *365*, 1771–1780.

Frankel, G., Candy, D.C., Fabiani, E., Adu-Bobie, J., Gil, S., Novakova, M., Phillips, A.D., and Dougan, G. (1995). Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* *63*, 4323–4328.

Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D., and James, M.N.G. (2004). Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* *279*, 27511–27517.

Fu, Z., Rogelj, S., and Kieft, T.L. (2005). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* *99*, 47–57.

Garmendia, J., Frankel, G., and Crepin, V.F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* *73*, 2573–2585.

Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., Siebenmann, R.E., and Oechslin, R. (1955). [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr* *85*, 905–909.

Ghebru, H. (1988). Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire De Maitrise Des Sciences Vétérinaires En Microbiologie Immunologie, Nantes.

Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P., and Doyle, M.P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* *58*, 2513–2516.

Gordon, D., Oliver, E., and Littlefield-Wyer, J. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria. In *Bacteriocins*, M.A. Riley, and M.A. Chavan, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 5–18.

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

Griffin, P.M., Olmstead, L.C., and Petras, R.E. (1990). *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* *99*, 142–149.

Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* *13*, 60–98.

Grimont, P.A.D. (1987). Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine et maladies infectieuses* *17*, 6–10.

Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* *85*, E45–62.

Hauri, A., Gotsch, U., Strotmann, I., Krahn, J., Bettge-Weller, G., Westbrook, H., Bellinger, O., and Uphoff, H. (2011). Secondary transmissions during the outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 in Hesse, Germany, 2011. *Euro Surveill.* *16*.

Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T., van den Biggelaar, F.L., van Leeuwen, W.J., and de Boer, E. (1999). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* *52*, 67–75.

Horne, D.S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* *11*, 148–153.

Howie, H., Mukerjee, A., Cowden, J., Leith, J., and Reid, T. (2003). Investigation of an outbreak of *Escherichia coli* O157 infection caused by environmental exposure at a scout camp. *Epidemiol. Infect.* *131*, 1063–1069.

Hrudey, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W., and Hrudey, E.J. (2003). A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci. Technol.* *47*, 7–14.

Hurley, B.P., Jacewicz, M., Thorpe, C.M., Lincicome, L.L., King, A.J., Keusch, G.T., and Acheson, D.W. (1999). Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* *67*, 6670–6677.

Huys, G., Cnockaert, M., Abbott, S.L., Janda, J.M., and Vandamme, P. (2010). *Hafnia paralvei* sp. nov., formerly known as *Hafnia alvei* hybridization group 2. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *60*, 1725–1728.

Ihekweazu, C., Barlow, M., Roberts, S., Christensen, H., Guttridge, B., Lewis, D., and Paynter, S. (2006). Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Euro Surveill.* *11*, 128–130.

Imamovic, L., and Muniesa, M. (2012). Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS ONE* *7*, e32393.

InVs (2011). Cas groupés de syndrome hémolytique et urémique (SHU) Nord, juin 2011 - Point au 8 juillet 2011. *Actualités De l'InVS*.

Jokinen, C.C., Schreier, H., Mauro, W., Taboada, E., Isaac-Renton, J.L., Topp, E., Edge, T., Thomas, J.E., and Gannon, V.P.J. (2010). The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *J Water Health* *8*, 374–386.

Jordan, S.L., Glover, J., Malcolm, L., Thomson-Carter, F.M., Booth, I.R., and Park, S.F. (1999). Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 1308–1311.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 123–140.

van de Kar, N.C., Roelofs, H.G., Muytjens, H.L., Tolboom, J.J., Roth, B., Proesmans, W., Reitsma-Bierens, W.C., Wolff, E.D., Karmali, M.A., Chart, H. (1996). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in hemolytic uremic syndrome in part of western Europe. *Eur. J. Pediatr.* *155*, 592–595.

Karch, H., Rüssmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., and Heesemann, J. (1995). Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J. Clin. Microbiol.* *33*, 1602–1605.

Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., and Kaper, J.B. (2003a). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 4930–4940.

Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Arbus, G.S., and Lior, H. (2004). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. 1985. *J. Infect. Dis.* *189*, 556–563.

Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., and Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* *1*, 619–620.

Kauffmann, F. (1947). The Serology of the Coli Group. *J Immunol* *57*, 71–100.

Khan, M.M.T., Pyle, B.H., and Camper, A.K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 5088–5096.

King, L.A., Filliol-Toutain, I., Mariani-Kurkidjian, P., Vaillant, V., Vernozy-Rozand, C., Ganet, S., Pihier, N., Niaudet, P., and de Valk, H. (2010). Family outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O123:H-, France, 2009. *Emerging Infect. Dis.* *16*, 1491–1493.

Kokai-Kun, J.F., Melton-Celsa, A.R., O'Brien, A.D., (2000). Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J. Biol. Chem.* *275*, 3713–3721.

Kovacs, M.J., Roddy, J., Grégoire, S., Cameron, W., Eidus, L., and Drouin, J. (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Med.* *88*, 177–179.

Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* *28*, 655–661.

Lea, N., Lord, J.M., and Roberts, L.M. (1999). Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology (Reading, Engl.)* *145 (Pt 5)*, 999–1004.

Leclercq, A., and Mahillon, J. (2003). Farmed rabbits and ducks as vectors for VTEC O157:H7. *Vet. Rec.* *152*, 723–724.

- Lee, K., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., and Kumagai, S.** (2012). *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* enhance the growth and survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 under mild acidic conditions. *J. Food Sci.* *77*, M102–107.
- Leistner, L.** (1995). Stable and safe fermented sausages world-wide. In *Fermented Meats*, (Glasgow: G. Campbell-Platt and P.E. Cook, Editors. Black Academic & Professional), pp. 160–175.
- Levine, M.M.** (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* *155*, 377–389.
- Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S., and Karmali, M.** (1987). Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* *262*, 8834–8839.
- Livak, K.J.** (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet. Anal.* *14*, 143–149.
- Louise, C.B., and Obrig, T.G.** (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect. Dis.* *172*, 1397–1401.
- Loukiadis, E.,** (2007). Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC). Thèse de doctorat d'université de Toulouse III, 225p.
- Ludwig, K., Bitzan, M., Zimmermann, S., Kloth, M., Ruder, H., and Müller-Wiefel, D.E.** (1996). Immune response to non-O157 Vero toxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* *174*, 1028–1039.
- Ludwig, K., Petric, M., Blanchette, V., and Karmali, M.** (1998). Isolated thrombocytopenic purpura associated with infection due to verocytotoxin (Shiga toxin)-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11. *Clin. Infect. Dis.* *27*, 660–661.
- Luukkonen, J., Kempainen, A., Kärki, M., Laitinen, H., Mäki, M., Sivelä, S., Taimisto, A.-M., and Ryhänen, E.-L.** (2005). The effect of a protective culture and exclusion of nitrate on the survival of enterohemorrhagic *E. coli* and *Listeria* in Edam cheese made from Finnish organic milk. *International Dairy Journal* *15*, 449–457.
- Mackay, I.M.** (2007). *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization* (Horizon Scientific Press).
- Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., and Auvray, F.** (2010). Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with

enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* *109*, 1696–1705.

Mahaut, M. (2000). Initiation a la technologie fromagere - Mathilde Mahaut sur Fnac.com.

Mailles, A. (2006). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of ground beef, France, 2005. 6th International Symposium on Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia Coli* Infections. Melbourne, Australia.

Matthews, K.R., Murdough, P.A., and Bramley, A.J. (1997). Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* *82*, 197–203.

McWilliam Leitch, E.C., and Stewart, C.S. (2002a). *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates are more susceptible to L-lactate than to D-lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 4676–4678.

McWilliam Leitch, E.C., and Stewart, C.S. (2002b). Susceptibility of *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates to lactate. *Lett. Appl. Microbiol.* *35*, 176–180.

Michel, P., Wilson, J.B., Martin, S.W., Clarke, R.C., McEwen, S.A., and Gyles, C.L. (1999). Temporal and geographical distributions of reported cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Ontario. *Epidemiol. Infect.* *122*, 193–200.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., and Yanagawa, H. (1999). Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* *150*, 787–796.

Le Minor, L., Popoff, M.Y., and Bockemühl, J. (1990). Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* *141*, 1173–1177.

Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. TEC & DOC.

Monday, S.R., Whittam, T.S., and Feng, P.C. (2001). Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of beta-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* *184*, 918–921.

Montet, M.P., Christieans, S., Thevenot, D., Coppet, V., Ganet, S., Muller, M.L.D., Dunière, L., Miszczycha, S., and Vernozy-Rozand, C. (2009). Fate of acid-resistant and non-acid resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in experimentally contaminated French fermented raw meat sausages. *Int. J. Food Microbiol.* *129*, 264–270.

Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., and Caprioli, A. (1998). Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* *36*, 840–842.

Møretrø, T., Heir, E., Mo, K.R., Habimana, O., Abdelgani, A., and Langsrud, S. (2010). Factors affecting survival of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* on abiotic surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* *138*, 71–77.

Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B., and Majid, F. (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol. Infect* *111*, 181–187.

Moschcowitz, E. (2003). An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: an undescribed disease. 1925. *Mt. Sinai J. Med.* *70*, 352–355.

Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R., and Chikindas, M.L. (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* *44*, 255–261.

Murinda, S.E., Roberts, R.F., and Wilson, R.A. (1996). Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 3196–3202.

Nangaku, M., Nishi, H., and Fujita, T. (2007). Pathogenesis and prognosis of thrombotic microangiopathy. *Clin. Exp. Nephrol.* *11*, 107–114.

Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 142–201.

Naylor, S.W., Gally, D.L., and Low, J.C. (2005). Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* *295*, 419–441.

Nielsen, E.M., and Andersen, M.T. (2003). Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol* *41*, 2884–2893.

O'Brien, S.J., Adak, G.K., and Gilham, C. (2001). Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerging Infect. Dis.* *7*, 1049–1051.

Oberst, R.D., Hays, M.P., Bohra, L.K., Phebus, R.K., Yamashiro, C.T., Paszko-Kolva, C., Flood, S.J., Sargeant, J.M., and Gillespie, J.R. (1998). PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 3389–3396.

Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J.C., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M., and Pennington, T.H. (2002). Long-term survival of *Escherichia coli*

O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett. Appl. Microbiol.* *34*, 100–104.

Ohtsuka, K., Tanaka, M., Ohtsuka, T., Takatori, K., and Hara-Kudo, Y. (2010). Comparison of detection methods for *Escherichia coli* O157 in beef livers and carcasses. *Foodborne Pathog. Dis.* *7*, 1563–1567.

Paton, A.W., Ratcliff, R.M., Doyle, R.M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J.A., and Paton, J.C. (1996). Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 1622–1627.

Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., and Paton, J.C. (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* *69*, 6999–7009.

Pavia, A.T., Nichols, C.R., Green, D.P., Tauxe, R.V., Mottice, S., Greene, K.D., Wells, J.G., Siegler, R.L., Brewer, E.D., and Hannon, D. (1990). Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J. Pediatr.* *116*, 544–551.

Peng, S., Tasara, T., Hummerjohann, J., and Stephan, R. (2011). An overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production. *J. Food Prot.* *74*, 849–864.

Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., and Fach, P. (2004). Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes* *18*, 185–192.

Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* *409*, 529–533.

Pohl, P. (1993). Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales De Médecine Vétérinaire* *137*, 325–333.

Poitras, E., and Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* *2*, 2–11.

Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., and Herman, L. (2008). Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *FEMS Microbiol. Lett.* *282*, 124–131.

Priest, F.G., and Barker, M. (2010). Gram-negative bacteria associated with brewery yeasts: reclassification of *Obesumbacterium proteus* biogroup 2 as *Shimwellia pseudoproteus* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Escherichia blattae* to *Shimwellia blattae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *60*, 828–833.

Pritchard, G.C., Willshaw, G.A., Bailey, J.R., Carson, T., and Cheasty, T. (2000). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal bacteriological study. *Vet. Rec.* *147*, 259–264.

R Development Core Team, 2007. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. (ISBN 3-900051-07-0) (<http://www.R-project.org>).

Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., and Griffiths, M.W. (1998). Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* *81*, 1810–1817.

Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., and Swerdlow, D.L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerging Infect. Dis.* *11*, 603–609.

Reida, P., Wolff, M., Pöhls, H.W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksić, S., Karch, H., and Bockemühl, J. (1994). An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl. Bakteriol.* *281*, 534–543.

Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* *308*, 681–685.

Riley, M.A., and Wertz, J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* *84*, 357–364.

Roberts, C.L., Mshar, P.A., Cartter, M.L., Hadler, J.L., Sosin, D.M., Hayes, P.S., and Barrett, T.J. (1995). The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.* *115*, 447–454.

Rossen, L., Holmstrøm, K., Olsen, J.E., and Rasmussen, O.F. (1991). A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* *14*, 145–151.

Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., and Rasmussen, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* *17*, 37–45.

Rozand, C., and Feng, P.C.H. (2009). Specificity analysis of a novel phage-derived ligand in an enzyme-linked fluorescent assay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* *72*, 1078–1081.

Sablé, S., Portrait, V., Gautier, V., Letellier, F., and Cottenceau, G. (1997). Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. *Enzyme and Microbial Technology* *21*, 212–220.

Savoie, F., Feng, P., Rozand, C., Bouvier, M., Gleizal, A., and Thevenot, D. (2011). Comparative evaluation of a phage protein ligand assay with real-time PCR and a reference method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef and trimmings. *J. Food Prot.* *74*, 6–12.

Schlessner, J.E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J., and Teo, A.Y.L. (2006). Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J. Food Prot.* *69*, 990–998.

Schmidt, H. (2001). Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* *152*, 687–695.

Schüller, S., Frankel, G., and Phillips, A.D. (2004). Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell. Microbiol.* *6*, 289–301.

Sharma, V.K., Dean-Nystrom, E.A., and Casey, T.A. (1999). Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli*. *Mol. Cell. Probes* *13*, 291–302.

Sharp, J.C., Ritchie, L.D., Curnow, J., and Reid, T.M. (1994). High incidence of haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157 in one Scottish town: clinical and epidemiological features. *J. Infect.* *29*, 343–350.

Siegler, R.L. (1995). The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Clin. North Am.* *42*, 1505–1529.

Singh, J., Batish, V.K., and Grover, S. (2009). A scorpion probe-based real-time PCR assay for detection of *E. coli* O157:H7 in dairy products. *Foodborne Pathog. Dis.* *6*, 395–400.

Söderström, A., Lindberg, A., and Andersson, Y. (2005). EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August–September 2005. *Euro Surveill.* *10*, E050922.1.

Stenutz, R., Weintraub, A., Widmalm, G., 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* *30*, 382–403.

Stephan, R., and Untermann, F. (1999). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 1570–1572.

- Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M.S., and Ogden, I.D.** (2006). *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int. J. Food Microbiol.* *112*, 129–137.
- Strockbine, N.A., Jackson, M.P., Sung, L.M., Holmes, R.K., and O'Brien, A.D.** (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.* *170*, 1116–1122.
- Su, C., and Brandt, L.J.** (1995). *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann. Intern. Med.* *123*, 698–714.
- Sugiyama, A., Iwade, Y., Akachi, S., Nakano, Y., Matsuno, Y., Yano, T., Yamauchi, A., Nakayama, O., Sakai, H., Yamamoto, K.** (2005). An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *Jpn. J. Infect. Dis.* *58*, 398–400.
- Tarr, P.I.** (1995). *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* *20*, 1–8; quiz 9–10.
- Tarr, P.I., Gordon, C.A., and Chandler, W.L.** (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* *365*, 1073–1086.
- Tobe, T., Beatson, S.A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C.M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G.** (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 14941–14946.
- Usajewicz, I., and Nalepa, B.** (2006). survival of *escherichia coli* O157 in milk exposed to high temperatures and high pressure. *Food Technol. Biotechnol.* 33–39.
- Uyttendaele, M., Grangette, C., Rogerie, F., Pasteau, S., Debevere, J., and Lange, M.** (1998). Influence of cold stress on the preliminary enrichment time needed for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 1640–1643.
- Vernozy-Rozand, C., and Montet, M.-P.** (2001). *Escherichia coli* O157 (Tec & Doc).
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Montet, M.P., Bonin, V., Dernburg, A., and Richard, Y.** (2005a). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int. J. Food Microbiol* *105*, 83–88.
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Berardin, M., Bavai, C., and Beutin, L.** (2005b). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett. Appl. Microbiol.* *41*, 235–241.

Viana, E.S., Campos, M.E.M., Ponce, A.R., Mantovani, H.C., and Vanetti, M.C.D. (2009). Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. *Biol. Res.* *42*, 427–436.

Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Bavai, C., Fremaux, B., and Delignette-Muller, M.-L. (2007). Growth of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. *Vet. Microbiol.* *123*, 274–281.

De Vuyst, L., and Vandamme, E.J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* *138*, 571–578.

Wachtel, M.R., Whitehand, L.C., and Mandrell, R.E. (2002). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J. Food Prot.* *65*, 18–25.

Wang, G., Zhao, T., and Doyle, M.P. (1997). Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Unpasteurized and Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection* *60*, 610–613.

Wendel, A.M., Johnson, D.H., Sharapov, U., Grant, J., Archer, J.R., Monson, T., Koschmann, C., and Davis, J.P. (2009). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clin. Infect. Dis.* *48*, 1079–1086.

Wertz, J.E., and Riley, M.A. (2004). Chimeric nature of two plasmids of *Hafnia alvei* encoding the bacteriocins alveicins A and B. *J. Bacteriol.* *186*, 1598–1605.

Wick, L.M., Qi, W., Lacher, D.W., and Whittam, T.S. (2005). Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* *187*, 1783–1791.

Zhao, B., and Houry, W.A. (2010). Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. *Biochem. Cell Biol.* *88*, 301–314.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Croissance, survie et détection des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans différents types de matrices fromagères

Sarah GANET

7 novembre 2012

RÉSUMÉ

Les *E. coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) sont reconnus à l'échelon international comme des pathogènes émergents. Selon la définition de l'AFSSA (avis du 15 juillet 2008), les STEC considérés comme pathogènes appartiennent aux 5 sérotypes O157:H7, O26:H11, O111:H8, O103:H2, O145:H28. Ils sont à l'origine de colites hémorragiques sévères, mais également de Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU). Ces SHU sont à ce jour, la principale cause d'insuffisance rénale aigüe chez l'enfant entre 1 mois à 3 ans.

Les fromages au lait cru font partie intégrante de la richesse et de la diversité de la gastronomie française. En France, en novembre 2005, 11 enfants ont développé une infection à *E. coli* O26:H11 après avoir consommé du camembert contaminé. Les épidémies recensées ont pointé du doigt l'urgence de mieux connaître le comportement des STEC dans les matrices alimentaires et ainsi de mieux pouvoir les détecter.

Ainsi, une nouvelle méthode de PCR en temps réel a été mise en place afin de détecter *E. coli* O157:H7 dans les fromages au lait cru. La spécificité et la sensibilité de cette méthode permet d'identifier en une seule et unique réaction PCR le sérotype O157:H7 sans avoir à tester séparément l'antigène somatique O157 et flagellaire H7.

Nos travaux sur la croissance des STEC dans les matrices fromagères ont permis de mettre en évidence trois comportements différents pendant les fabrications fromagères : (i) une forte prolifération des STEC au cours des 24 premières heures de fabrication puis stabilisation de la croissance (Pâtes Pressées Non Cuites (PPNC) à affinage court), (ii) une forte prolifération des STEC au cours des 24 premières heures de fabrication, puis diminution au cours de l'affinage (Pâtes Persillées (PP) et Pâtes Pressées Non Cuites à affinage long), (iii) une absence de prolifération au cours des 24 premières heures de fabrication (Pâtes Lactiques ou des Pâtes Pressées Cuites (PPC)).

La cinétique de croissance d'*E. coli* O26:H11 nous a également permis de mettre en évidence un effet potentiellement antagoniste de *H. alvei* sur une souche d'*E. coli* O26:H11 en présence du consortium technologique dans les fromages à pâte pressées non cuites à croûte fongique dont les flores annexes étaient maîtrisées.

MOTS-CLÉS : STEC, fromage, croissance, survie, inhibition, détection.